**CARACTERIZAÇÃO DE DUAS VARIEDADES DE
CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS GENETICAMENTE
COM O GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA *CRYIA(B)* DE
Bacillus thuringiensis (Bt) PARA RESISTÊNCIA A *Diatraea*
saccharalis (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

DANIELLA PASCON VIANNA BRAGA

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho – 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Braga, Daniella Pascon Vianna

Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína *CRYIA* (B) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) - Piracicaba, 2001.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.

Bibliografia.

1. Bactéria entomopatogênico 2. Biolística 3. Broca-de-cana-de-açúcar 4. Cana-de-açúcar 5. Transformação genética I. Título

CDD 633.61

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedicada à minha mãe

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho, pela orientação, confiança e amizade demonstradas durante a realização do projeto.

Ao Dr. Eugênio César Ulian, pela experiência transmitida, orientação e amizade nesses dez anos de trabalho em equipe.

Ao Dr. Enrico De Beni Arrigoni, pela amizade e co-orientação deste trabalho.

Ao Dr. William Lee Burnquist, por ter possibilitado a realização do curso de mestrado junto à Copersucar.

Aos amigos Jorge A. G. da Silva, Daniela C. Volpato, Rosemeire Zem e Carla Barsalobres, da Seção de Biologia Molecular da Copersucar, pelo incentivo, dedicação, amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas da Divisão de Fitotecnia da Copersucar, em especial Irani A. de Oliveira, Celma C. de Lemos, Georgete Negri, Rubens Braga, José Antônio Bressiani e técnicos das Seções de Melhoramento e Entomologia, que contribuíram de diversas maneiras para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial à Prof. Dra. Maria Lúcia C. Vieira, pela participação na banca do exame de qualificação, e ao Prof. Dr. Ricardo A. de Azevedo, pelo auxílio com a documentação fotográfica.

Aos meus colegas e amigos da ESALQ/USP e UNICAMP, em especial Maria Cristina Falco, Sabrina M. Chabregas, Márcia Ometto José, Reinaldo M. Barata, Ana Lúcia B. Delneri, Patrícia Pompermayer, Maria Imaculada Zucci e Andréa Navarro, que contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Marcelo Barata, Telma B. Costa, Paulo e Lea Velho, pelo incentivo para a realização do mestrado.

Aos meus pais e irmãos, pessoas às quais devo grande parte de minhas conquistas, pelo incentivo, carinho e compreensão que têm demonstrado em todos esses anos de profissão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A situação dos transgênicos no mundo.....	3
2.2. A transformação genética de cana-de-açúcar.....	4
2.3. A transformação genética de cana-de-açúcar na Copersucar.....	6
2.4. As endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.5. Desenvolvimento de resistência a <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.6. Espécies transformadas com a toxina de <i>Bt</i>	11
2.7. Efeitos das plantas <i>Bt</i> sobre outros níveis tróficos.....	12
2.8. A importância e o controle da praga <i>Diatraea saccharalis</i>	14
2.9. Transformação de cana-de-açúcar para resistência a insetos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material vegetal.....	17
3.2. Parâmetros dos experimentos de bombardeamento.....	20
3.3. Plasmídeos.....	22
3.4. Seleção <i>in vitro</i> para resistência ao antibiótico geneticina.....	24
3.5. Seleção em estufa para resistência ao antibiótico canamicina.....	26

3.6. Análise de DNA - método PCR	27
3.7. Análise de DNA - método Southern Blot.....	28
3.8. Quantificação de proteína total – método Bradford	29
3.9. Análise da expressão da toxina – método ELISA sanduíche	29
3.10. Bioensaios.....	31
3.11. Estudos de campo	31
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 34
 4.1. Análises moleculares	 34
4.1.1. PCR	34
4.1.2. Southern Blot.....	36
4.1.3. ELISA sanduíche.....	42
4.2. Bioensaios.....	46
4.3. Avaliações de campo	51
4.3.1. Intensidade de infestação de brocas	51
4.3.2. Características quantitativas	56
 5. CONCLUSÕES	 59
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 61

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Variedade comercial SP80-1842 utilizada nos experimentos de transformação para resistência a <i>Diatraea saccharalis</i>	18
2 Variedade comercial SP80-3280 utilizada nos experimentos de transformação para resistência a <i>Diatraea saccharalis</i>	18
3 Indução de calos de material proveniente do campo. A figura mostra os calos após 2 semanas em meio de cultura CI-3 clav.....	19
4 Calos embriogênicos da variedade SP80-3280, após 4 repicagens (16 semanas) em meio de cultura com 2,4-D	19
5 Calos embriogênicos da variedade SP80-1842, após 4 repicagens (16 semanas) em meio de cultura com 2,4-D	20
6 Revólver de genes utilizado na transformação genética de cana-de-açúcar na Copersucar. Este aparelho foi construído conforme especificações de FINER et al. (1992).....	21
7 Equema representativo do plasmídeo pCIB4421 (gentilmente cedido pela Novartis Seeds), que contém o promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) de milho e o gene que codifica para a proteína <i>CryIA(b)</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23

- 8 Esquema representativo do plasmídeo pCIB4426 (gentilmente cedido pela Novartis Seeds), que contém o promotor de tecido condutor (“pith”) de milho e o gene que codifica para a proteína *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* 23
- 9 Esquema representativo do plasmídeo pHA9 (gentilmente cedido pelo Dr. Henrik Albert, HARC, Honolulu, Hawaii, EUA), contendo o promotor de ubiquitina de milho (*ubi-1*) e o gene *neo* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II (*nptII*) 24
- 10 Plantas potencialmente transformadas, regeneradas de calos que foram selecionados em meio CIGen35 (sem 2,4-D), suplementado com cinetina e NAA. A pressão de seleção foi mantida durante esta etapa para que plantas escape fossem identificadas e descartadas 25
- 11 Plantas que sofreram seleção em geneticina sendo enraizadas em meio CIGen35. A pressão de seleção foi mantida e, após 1 mês, estas plantas foram transferidas para a estufa, em copos plásticos 25
- 12 Plantas selecionadas in vitro, em fase de aclimação na estufa. As touceiras foram desmembradas e 10 mudas de cada frasco foram plantadas individualmente em copos plásticos 26
- 13 Teste de resistência ao antibiótico canamicina, aplicado na concentração de 1% em plantas transformadas. As plantas que apresentaram brotação anormal e clorose das folhas, foram descartadas. Plantas resistentes foram mantidas em estufa para análises posteriores 27
- 14 Feixes de cana amostrados para avaliação tecnológica e de intensidade de infestação por broca. Dez colmos de cada linha de 6 metros foram

- retirados do campo, procedendo-se medições de altura, peso e número de entrenós. Os colmos foram quebrados longitudinalmente para a determinação da intensidade de infestação e processados para as avaliações tecnológicas das características de interesse agrônomo..... 33
- 15 Corte longitudinal de colmos para avaliação de intensidade de infestação. Os colmos com sintomas de infestação são da variedade original SP80-1842 utilizada como controle, e os sadios são de uma planta transformada (planta 7) da mesma variedade. Após esta avaliação, estes colmos foram amarrados nos seus feixes originais, para as análises posteriores..... 33
- 16 Plantas transformadas analisadas por PCR, usando iniciadores (“primers”) específicos para os promotores PEPC (A) e “pith” (B), e para os genes *Bt* (C) e *neo* (D). Os resultados mostram que houve integração dos genes que conferem resistência a antibióticos e insetos. A planta 7 não apresenta amplificação do DNA quando utilizados os iniciadores específicos para o promotor “pith”, o que pode significar que todas as cópias do gene *Bt* referem-se à construção dirigida pelo promotor PEPC..... 36
- 17 Southern Blots mostrando o número variado de cópias dos genes *neo* (A) e *Bt* (B) introduzidos nas variedades SP80-1842 e SP80-3280. Os controles positivos são resultantes da digestão dos plasmídeos pH9 com a enzima BamHI e pCIB4421 com as enzimas BamHI/SacI, gerando os fragmentos com os tamanhos indicados. As plantas controle não apresentam bandas, como era esperado. Plantas 7, 41, 53, 68, 157 e 99 são originárias da variedade SP80-1842. Plantas 219, 220, 228, 239, 241, 242, 106 e 107 são originárias da variedade SP80-3280..... 41

- 18 Evolução da mortalidade das brocas nos bioensaios. Cada barra corresponde à média da porcentagem de brocas mortas em 24 repetições, com intervalo de 2 dias entre as avaliações..... 48
- 19 Seções de folhas utilizadas nos bioensaios. **A:** extensa área de raspagem na folha controle (seta), onde as larvas permaneceram juntas, se alimentando, mesmo na presença de fungos (regiões avermelhadas) **B:** pequenas mordidas em folha transgênica (seta), observadas após dois dias de infestação com brocas neonatas 49
- 20 Larvas de *Diatraea saccharalis* após bioensaios. **A:** a larva maior alimentou-se de folhas da planta controle SP80-1842. As mortas foram alimentadas com folhas transgênicas. **B:** a larva de coloração mais escura alimentou-se de folha transgênica 49
- 21 Brocas após quatro dias nos bioensaios. **A:** as brocas colocadas nos tratamentos controles se desenvolveram e ficaram ativas mesmo quando as folhas estavam secas, com a qualidade nutricional alterada. **B:** as brocas que se alimentaram de folhas transgênicas morreram rapidamente. Em tratamentos onde a mortalidade não foi 100%, as brocas afetadas pelos efeitos da toxina e ainda vivas não eram encontradas sobre as folhas 50
- 22 A eficiência do controle realizado pela introdução do gene *Bt* em cana é mostrada pela ausência de danos nos colmos da planta transgênica (planta 7). A variedade original SP80-1842 apresenta intensidade de infestação alta, com a maior parte dos entrenós brocados, além da presença de fungos oportunistas. Estas plantas foram avaliadas no campo após infestação artificial com brocas neonatas 52

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Primeira quantificação por ELISA da expressão da toxina <i>CryIA(b)</i> (ngBtk/mg proteína total) em diferentes tecidos das plantas transgênicas e respectivos controles	43
2 Quantificação da toxina <i>CryIA(b)</i> por ELISA, avaliando extratos de folha, colmo, bainha e casca das plantas após 22 meses de plantio no campo. São apresentadas as médias de expressão das repetições e respectivos desvios- padrões	46
3 ^a Plantas 7, 53 e 99 são eventos de transformação com a variedade SP80-1842; plantas 219, 228 e 106 são eventos com a variedade SP80-3280. ^b Número de repetições de cada planta, com 10 larvas inoculadas por tratamento. ^c Média da mortalidade corrigida para 24 repetições, calculada pela fórmula: $MC = \frac{(MT - MCtrl) \times 100}{(100 - MCtrl)}$ (MC: mortalidade corrigida; MT: mortalidade nas plantas transgênicas; MCtrl: mortalidade nas plantas controle).....	50
4 Intensidade de infestação (I.I.%) nos experimentos de campo, após inoculação artificial de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> na região do “dewlap”. Foram realizadas duas amostragens, a primeira após 10 meses do plantio (sem repetições) e a segunda após 22 meses (média de 4 repetições). Algumas plantas não foram avaliadas aos 22 meses de idade (na).....	53

- 5 Resultados preliminares obtidos nos estudos de campo, após 10 meses de plantio. A nota de diâmetro tem escala de 1 (colmos mais grossos) a 9 (colmos mais finos). Com relação à morfologia, todas as plantas transgênicas não apresentaram diferenças significativas (N) com relação às variedades originais (O). 58

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	2,4- ácido diclorofenoxiacético
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BSA	Albumina de soro bovino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ácido etileno diamono tetracético
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
Kda	Quilodáltons
NAA	Ácido naftol acético
<i>Neo</i>	“Neomycin phosphotransferase”
PCR	“Polymerase chain reaction”
PEPC	“Phosphoenolpyruvate carboxylase”
RPM	Rotação por minuto
TBE	Tampão Tris-borato/EDTA
TE	Tampão Tris/EDTA
Tris	“(Hydroxymethyl) Aminomethane”

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS GENETICAMENTE COM O GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA *CRYIA(B)* DE *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) PARA RESISTÊNCIA A *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Autora: Daniella Pascon Vianna Braga
Orientador: Prof. Dr. Marcio de Castro Silva-Filho
Co-orientadores: Dr. Eugênio César Ulian
Dr. Enrico De Beni Arrigoni

Resumo

Variedades transgênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.), resistentes a *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), foram obtidas por bombardeamento de calos embriogênicos com partículas de tungstênio cobertas com os plasmídeos pCIB4421 (construção contendo o gene que codifica a toxina *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e o promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho), pCIB4426 (construção contendo o gene que codifica a toxina *CryIA(b)* de *Bt* e o promotor de um gene expresso especificamente em vasos condutores de milho) e pHA9 (construção do gene *neo*, que confere resistência a antibióticos).

Estes plasmídeos foram usados em experimentos de co-transformação, e a seleção *in vitro* foi feita com o antibiótico geneticina. A eficiência de co-transformação foi alta, sendo que foram obtidas plantas transgênicas de duas variedades comerciais brasileiras.

A primeira etapa envolveu a produção *in vitro* de calo, a partir de folhas jovens em meio CI-3clav (MS modificado, suplementado com 2,4-ácido diclorofenoxiacético e Clavulin®). Calos embriogênicos foram repicados e selecionados no mesmo meio, sendo subseqüentemente bombardeados com os plasmídeos citados acima.

Calos e plantas foram selecionados para resistência a antibiótico em meio CI-3 contendo geneticina (CI-3Gen35). As plantas regeneradas foram enraizadas em meio CIGen35 (sem 2,4-D) e transferidas para a casa-de-vegetação, onde foram testadas para resistência ao antibiótico canamicina. As plantas transformadas foram analisadas através de bioensaios, Southern Blot, PCR, ELISA e experimentos de campo.

Plantas transgênicas das variedades comerciais SP80-1842 e SP80-3280 foram multiplicadas, estabelecidas no campo e avaliadas quanto à similaridade fenotípica com as variedades originais, intensidade de infestação de brocas e características tecnológicas.

Este estudo mostra a eficiência do gene que codifica a proteína *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* quando introduzido no genoma da cana-de-açúcar, expressando resistência a *Diatraea saccharalis*.

CARACTERIZATION OF TWO SUGARCANE VARIETIES GENETICALLY TRANSFORMED WITH THE GENE ENCODING A *CRYIA(B)* PROTEIN FROM *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) FOR RESISTANCE TO *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Author: Daniella Pascon Vianna Braga
Adviser: Prof. Dr. Marcio de Castro Silva-Filho
Co-adviser: Dr. Eugênio César Ulian
Dr. Enrico De Beni Arrigoni

Summary

Transgenic sugarcane (*Saccharum* ssp.) varieties resistant to *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer) were obtained by bombardment of embryogenic calli with tungsten particles coated by plasmids pCIB4421 (construct of *CryIA(b)* toxin gene from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) with a maize phosphoenolpyruvate carboxylase promoter), pCIB4426 (construct of *CryIA(b)* toxin gene from *Bt* with a pith promoter) and pHA9 (construct of *neo* gene, conferring resistance to antibiotics).

These plasmids were used in co-transformation experiments and *in vitro* selection was done with the antibiotic geneticin. Co-transformation efficiency was high and several transgenic plants of two Brazilian commercial varieties were recovered.

In vitro calli cultures were started from young leaf roll on medium CI-3clav (modified MS medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and Clavulin®). Embryogenic calli were subcultured and selected on CI-3clav medium, being subsequently bombarded with the plasmids above listed.

Calli and plantas were selected for antibiotic resistance on CI-3 with geneticin (CI-3Gen35). Plants recovered were rooted on CIGen35 (without 2,4-D) and transferred

to the greenhouse, where they were tested for kanamycin resistance. Transformed plants were tested through bioassays, Southern Blot, PCR, ELISA and field studies.

Transgenic plants from SP80-1842 and SP80-3280 commercial varieties had been multiplied, set up in the field and screened for phenotypic similarity to the original varieties, borer infestation level and technological traits.

This study reports the efficiency of the gene encoding the *CryIA(b)* protein from *Bacillus thuringiensis*, which once introduced in the sugarcane genome, expresses resistance to *Diatraea saccharalis*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil cultiva cana-de-açúcar desde o seu descobrimento, utilizando mudas provenientes de outros continentes (NUNES JÚNIOR, 1987), sendo que a cultura se estabeleceu de forma definitiva nas regiões Centro-Sul e Nordeste do país (CARVALHO, 1993). Esta é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais e, além da importância das indústrias do açúcar e álcool, a cana-de-açúcar constitui-se base de produção de matérias-primas como bagaço, melaço, e outras de utilização crescente (STUPIELLO, 1987).

A indústria sucro-alcooleira brasileira produz, além do álcool, um açúcar cuja competitividade internacional é indiscutível. Programas de melhoramento como o do IAC (criado em 1935), do IAA-Alagoas/PLANALSUCAR (criado em 1968) e da Copersucar - CTC (criado em 1970) foram iniciados com o objetivo de produzir-se variedades comerciais que proporcionassem um retorno econômico mais vantajoso para os produtores (MACHADO JÚNIOR, 1987).

Com o passar dos anos e com o desenvolvimento de técnicas modernas de análise e manipulação genética em plantas, o melhoramento tradicional de cana-de-açúcar ganhou o suporte da biotecnologia. Isto tem proporcionado o aparecimento de soluções para problemas do melhoramento tradicional que não podem ser resolvidos através de cruzamentos, seja por indisponibilidade dos genes de interesse ou por necessidade de obtenção de novas variedades em prazos mais curtos. A transformação genética figura como uma ferramenta das mais poderosas, capaz de produzir variedades cada vez mais competitivas. Uma estratégia de produção de resistência a insetos em plantas é a transformação com o gene da toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Anterior a esta tecnologia, pesticidas biológicos vêm sendo utilizados no controle de insetos

(ARONSON, 1986 citado por LEMOS, 2000). Este tipo de controle, além de caro, acarreta problemas de impacto ambiental como a contaminação do solo e da água, a toxicidade sobre organismos não-alvo, o acúmulo em cadeias alimentares e problemas de saúde nas populações vizinhas (FRUTOS et al., 1999). A alternativa de produção de plantas resistentes expressando a toxina de *Bt* tem como principais vantagens a redução do uso de pesticidas químicos e a especificidade do biopesticida ao inseto-alvo (LEMOS, 2000). Esta é toxina ativada pelas proteinases do intestino das larvas e quebra a integridade das membranas, causando a morte dos insetos em poucos dias. Atualmente, outras estratégias utilizando inibidores de enzimas digestivas (proteinases e amilases) (POMPERMAYER et al., 2001; SILVA-FILHO & FALCO, 2000) e lectinas (SCHULER et al., 1998) estão sendo estudadas.

Na introdução da característica de resistência a pragas em cana-de-açúcar, foram utilizados dois plasmídeos contendo o gene da endotoxina *CryIA(b)* de *Bt*, mas construídos com promotores distintos. As variedades comerciais SP80-1842 e SP80-3280 foram transformadas com este gene, que confere resistência a *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar). A variedade SP80-3280 é uma das mais utilizadas em cruzamentos normais na Copersucar por causa de suas características agrônômicas e a SP80-1842 foi a variedade mais plantada na safra 1998/99 pelos produtores do Estado de São Paulo, ocupando 12,9% da área de plantio (Centro de Tecnologia Copersucar, 1999). Para avaliação em campo das plantas transformadas, foi solicitada junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) a liberação de ensaios em áreas pré-definidas dentro da estação experimental da Copersucar, em Piracicaba. Algumas plantas, representantes de eventos de transformação distintos, foram caracterizadas através de bioensaios, Southern Blot, ELISA, PCR e estudos de campo.

Os resultados que serão apresentados confirmam a integração do gene *Bt* no genoma das plantas, a sua expressão em diferentes tecidos e sua eficiência no controle do ataque desta importante praga da cana-de-açúcar, até hoje realizado através de manejo integrado, pelo uso de controle biológico e aplicação de inseticidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A situação dos transgênicos no mundo

Existem várias técnicas de transformação genética, mas estas devem seguir alguns critérios para que o sucesso dos experimentos seja alcançado (HANSEN & WRIGHT, 1999). Dentre eles ressalta-se o uso de um método eficiente de introdução de DNA exógeno na planta, o uso de tecidos competentes para propagação ou regeneração, a escolha de agentes de seleção eficientes, o uso de protocolos simples, reproduzíveis e que possuam um tempo reduzido de cultura *in vitro*, evitando variação somaclonal e esterilidade. Atualmente, as técnicas que preenchem estes requisitos são a transformação de protoplastos, a mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e o bombardeamento de micropartículas.

Uma das técnicas mais utilizadas é o bombardeamento de genes, que permitiu uma transformação eficiente de monocotiledôneas, uma vez que protocolos de transferência de genes utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vetor não eram efetivos para estas plantas, as quais não respondiam à infecção por esta bactéria. Em estudos mais recentes, entretanto, a estratégia de co-cultivo com *A. tumefaciens* tem mostrado-se aplicável para a transformação de monocotiledôneas como a cana-de-açúcar (ELLIOT et al., 1998; ARENCIBIA et al., 1998).

A utilização da tecnologia de transformação genética cresceu mais de 25 vezes entre 1996 e 2000, de acordo com o Relatório do ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) de dezembro de 2000 (MONSANTO, 2001). Do total de 44,2 milhões de hectares plantados em 13 países em 2000, 68% (30,0 milhões de hectares) pertencem aos Estados Unidos e 59% (25,8 milhões de hectares)

foram cultivados com soja transgênica. A dominância da soja resistente a herbicida ocorre nos Estados Unidos, Argentina, Canadá, México, Romênia e Uruguai. O milho resistente a insetos (milho *Bt*) figura como o segundo colocado, ocupando uma área de 6,8 milhões de hectares (15% da área global com transgênicos). Levando-se em consideração todas as culturas geneticamente modificadas plantadas em 2000, a principal característica introduzida foi a tolerância a herbicidas em soja, canola, milho e algodão (74%), seguida pela resistência a insetos em milho e algodão (19%), insetos e herbicidas em milho e algodão (7%) e resistência a vírus (menos de 1%). A introdução das características de resistência a insetos e herbicidas ao mesmo tempo, feita em algodão e milho, tem aumentado a cada ano, e esta tendência deve continuar. Em 2000, esta tecnologia alcançou 7% (3,2 milhões de hectares) da área plantada com transgênicos, enquanto que a introdução isolada da característica de resistência a insetos decresceu.

O potencial dos alimentos transgênicos é ilimitado e as próximas gerações de produtos deverão suprir não apenas preocupações agronômicas, mas também trarão benefícios aos consumidores (GRAZIANO, 2000). As multinacionais da biotecnologia em plantas têm investido alto na pesquisa de produtos que agreguem valores nutricionais e farmacológicos às culturas transgênicas, abrindo espaço para a utilização desta tecnologia em outras áreas, além da agroindústria. Isto irá possibilitar que, por exemplo, o custo de determinados produtos farmacêuticos seja diminuído em função da sua produção em larga escala em lavouras comerciais e não mais em laboratórios.

2.2. A transformação genética de cana-de-açúcar

BOWER & BIRCH (1992), da Austrália, relataram as primeiras canas transformadas através da técnica de bombardeamento. No caso, as plantas foram transformadas com os genes *neo* (codifica a enzima neomicina fosfotransferase, que confere resistência a antibióticos aminoglicosídicos como geneticina e canamicina) e *uid-A* (codifica a enzima beta-glucuronidase, que permite a visualização do sucesso da transformação ou expressão transiente). Pesquisadores havaianos (SUN et al., 1993)

transformaram calos de *Saccharum spontaneum* com o gene *bar* (codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase). Este foi o primeiro gene de interesse agrônômico a ser utilizado para transformar células de cana, e confere resistência aos herbicidas glufosinato de amônio e bialafós.

Calos de uma variedade híbrida de cana foram estavelmente transformados com o gene *bar* através de bombardeamento, mas plantas não foram regeneradas por causa da idade avançada dos calos utilizados (CHOWDHURY & VASIL, 1992).

Outros trabalhos mostraram expressão transiente do gene *uid-A* em suspensão de células de *S. officinarum* (TAYLOR et al., 1993) e brotos regenerados de meristemas de cana (GAMBLEY et al., 1993). GALLO-MEAGHER & IRVINE (1993) demonstraram bons resultados de expressão transiente do gene *uid-A* em calos embriogênicos de *Saccharum* spp.

BIRCH et al. (1996) apresentaram um estudo de otimização das condições de bombardeamento, demonstrando alta eficiência de co-transformação em cana usando dois genes. BIRCH (1996) citou o bombardeamento como sendo um sistema bastante eficiente para inserção de genes nas variedades de cana e ressaltou a importância de tecnologias como esta para que os produtores atinjam uma maior competitividade no mercado internacional. FALCO et al. (2000) utilizaram o bombardeamento de partículas para co-transformar duas variedades comerciais brasileiras com os genes de resistência a antibióticos e ao glufosinato de amônio.

Observa-se que a otimização e a utilização da técnica de bombardeamento para a transformação de cana-de-açúcar estão sendo amplamente estudadas e atualmente existem plantas transgênicas para as mais variadas características. Apesar disso, este método apresenta problemas quanto à complexidade de integração do transgene, pois um grande número de cópias do gene é inserido em regiões onde não ocorre uma transcrição ativa. Assim, é importante citar que alguns pesquisadores (ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOT et al., 1998) têm estudado a aplicação da transformação de cana-de-açúcar mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, técnica que promove a inserção de poucas cópias em sítios altamente expressos do genoma.

IRVINE & MIRKOV (1997) relataram que, com a evolução dos procedimentos de transformação de cana-de-açúcar, fica evidente o potencial desta espécie para a indústria farmacêutica. A obtenção de produtos de alto valor agregado em plantas transgênicas não deixa de ser um dos objetivos de todos os estudos que vêm sendo desenvolvidos. BIRCH (1996) também relacionou a obtenção de produtos como ceras, bioplásticos, novos açúcares e fibras digestíveis como aplicações da transformação genética de cana-de-açúcar.

As perspectivas de inúmeros trabalhos em transformação genética de cana-de-açúcar foram incrementadas com o Projeto Genoma da Cana, financiado pela FAPESP e Copersucar. Este projeto identificou milhares de etiquetas de seqüências expressas (ESTs: “expressed sequence tags”) em cana-de-açúcar, que serão utilizadas através de transformação para que se possa estudar de maneira mais completa a biologia da planta. Assim, novas variedades poderão ser produzidas num espaço de tempo inferior àquele necessário no melhoramento tradicional para a seleção dos melhores clones, o que representará milhões de dólares de economia por parte dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

2.3. A transformação genética de cana-de-açúcar na Copersucar

Canas transformadas foram obtidas do bombardeamento de tungstênio recoberto com os genes de resistência a antibióticos e herbicida em calos embriogênicos. O gene *bar*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, foi utilizado nos primeiros experimentos, resultando em apenas duas plantas transformadas do clone SP81-2068. Em seguida, outras variedades foram co-transformadas com os genes de resistência a antibióticos (*neo*) e ao glufosinato de amônio (*bar*). As primeiras plantas transformadas foram liberadas pela CTNBio para os ensaios no campo em 1997 e a Copersucar figura como a pioneira no Brasil na liberação de transgênicos para estes testes.

Mais recentemente, além dos acima citados, outros genes de interesse foram introduzidos no trabalho de transformação. Experimentos com os genes que conferem

resistência aos herbicidas glifosato e imidazolinonas, o gene da toxina *CryIA(b)* de *Bt* (que confere resistência à broca e outros insetos), o gene de capa protéica do vírus do mosaico da cana (SCMV) (confere resistência ao vírus do mosaico), e o gene da replicase do vírus do amarelecimento da folha da cana (SCYLV) (confere resistência ao vírus do amarelecimento) têm sido conduzidos rotineiramente.

ULIAN & BRAGA (1997) mostraram que o bombardeamento em calos embriogênicos de cana-de-açúcar é bastante eficiente na obtenção de plantas transformadas com genes que conferem características de resistência a insetos, herbicidas e doenças. A técnica foi utilizada para transformar variedades de cana para resistência ao herbicida glifosato (ULIAN et al., 2000). Neste trabalho, as plantas mostraram-se resistentes a aplicações três vezes mais concentradas do herbicida do que aquela usada no controle de plantas daninhas.

O gene da toxina *CryIA(b)* do *Bt*, usado neste trabalho, tem sido utilizado em um dos projetos desenvolvidos na Copersucar. O objetivo é avaliar a eficiência deste gene no controle da broca em plantas transformadas, caracterizando os eventos distintos através da metodologia disponível e mostrando a integração do gene exógeno no genoma da cana-de-açúcar.

2.4. As endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva que é encontrada naturalmente no solo e possui genes que codificam proteínas inseticidas. Durante o processo de esporulação, são produzidos cristais paraesporais inativos, de 130 kDa conhecidos como δ -endotoxinas, que podem chegar a 30% da proteína total contida na bactéria. A ativação se dá pela combinação do pH alcalino (que dissolve os cristais e libera as protoxinas) com as proteinases existentes no intestino dos insetos (que clivam e processam as toxinas na sua forma ativa, formando uma toxina de 65-75 kDa).

Os efeitos da toxina começam minutos após sua ingestão e a cascata de eventos inicia-se com a paralisação das atividades intestinais, seguida da ruptura irreversível das células (BRUNKE & MEEUSEN, 1991). A ruptura do balanço osmótico por formação

de poros nas membranas das células epiteliais leva os insetos rapidamente à morte (FRUTOS et al., 1999; GILL et al., 1992).

A especificidade das toxinas a diferentes insetos reflete a capacidade de reconhecimento de diferentes sítios de ligação existentes na superfície da membrana das células do epitélio intestinal. A toxina ativada possui uma região N-terminal, que consiste de várias regiões hidrofóbicas conservadas constituindo o domínio tóxico, uma região C-terminal conservada, e uma região variável entre as outras duas, onde são encontrados os domínios de ligação, que conferem a especificidade da toxina pelas diferenças entre os aminoácidos (GILL et al., 1992). Estudos indicam a existência de uma distribuição variável dos sítios de ligação no intestino de lepidópteros e coleópteros, o que faz com que diferentes toxinas fiquem retidas em partes distintas do órgão, não sendo transportadas para outros tecidos ou células do inseto (BRAVO et al., 1992).

Existem diferentes tipos de proteínas de membranas funcionando como receptores das toxinas *Cry*. Pode acontecer que um mesmo sítio funcione como receptor de várias espécies de toxina ou que cada uma tenha afinidade por um sítio diferente. SCHNEPF et al. (1998) fazem uma breve revisão sobre os efeitos sinérgicos e antagônicos entre diferentes toxinas, concluindo que os dois mecanismos parecem ocorrer por intermédio de uma interação inseto-específica, por causa de diferenças nas afinidades dos receptores para cada toxina.

As principais proteínas de *Bt* são tóxicas para lepidópteros (*CryI*), lepidópteros e dípteros (*CryII*), coleópteros (*CryIII*) e dípteros (*CryIV*) (AGAISSE & LERECLUS, 1995). As toxinas *CryI*, específicas para lepidópteros, são as mais estudadas, existindo 20 seqüências diferentes de aminoácidos, codificadas por 6 genes (*CryIA* (a), *CryIA*(b), *CryIA*(c), *CryIB*, *CryIC* e *CryID*) (HÖFTE & WHITELEY, 1989). SCHULER et al. (1998) também citam que linhagens diferentes de *Bt* produzem uma variedade de cristais tóxicos que afetam os hospedeiros (ou insetos-alvo) de maneira distinta. Os mesmos autores mostram que pelo menos 10 genes codificando diferentes toxinas *Bt* foram usados para transformação genética de 26 espécies de plantas.

B. thuringiensis produz uma variedade de toxinas, o que reflete sua capacidade adaptativa, expandindo desta forma o seu espectro de hospedeiros. Os mecanismos utilizados pela bactéria para produzir toxina em quantidade suficiente para matar os insetos mostram a evolução de um sofisticado sistema, integrando desde a localização dos genes *Cry* até a utilização de proteínas acessórias para o processo de cristalização (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

2.5. Desenvolvimento de resistência a *Bacillus thuringiensis*

A primeira geração de plantas inseticidas, ou seja, que expressam a toxina de *Bt* como forma de proteção contra insetos, ocorreu em 1996 (ESTRUCH et al., 1997). GOULD (1998) cita que naquele ano, mais de 1,8 milhões de acres foram plantados com algodão transgênico, enquanto que milho e batata também foram cultivados, porém em menor escala. Mesmo antes da liberação comercial dessas plantas transformadas com *Bt*, muitas questões sobre a segurança para o meio ambiente, outros níveis tróficos e população já eram levantadas.

As principais preocupações, até hoje existentes, são quanto às possibilidades das toxinas afetarem os insetos não-alvo e levarem ao desenvolvimento de resistência ao *Bt* por causa da pressão de seleção criada sobre os insetos-alvo (MAAGD et al., 1999). Para isso, várias formas de manejo têm sido utilizadas em conjunto com a característica inseticida introduzida nas plantas, para que sejam alcançados os resultados esperados. Essas estratégias têm como objetivo atrasar a adaptação dos insetos à toxina expressa nas plantas.

GOULD (1988) relacionou algumas das alternativas que devem ser utilizadas para que o não desenvolvimento de resistência ao *Bt* por parte dos insetos. Numa delas, deve-se intercalar plantas transformadas e não transformadas para que existam refúgios para os insetos. Outra possibilidade é o uso de mais de uma toxina em cada planta, o que é discutível pela presença de resistência cruzada entre os diferentes tipos de toxinas *Cry*. Uma terceira ação é a utilização de baixas doses da toxina que, em conjunto com inimigos naturais, levaria à diminuição da população do inseto-alvo. Por último, uma

estratégia de utilização de promotores específicos em lugar dos promotores constitutivos seria uma boa alternativa para solucionar o problema de adaptabilidade dos insetos às toxinas de *Bt*. Desta forma, na própria planta existiriam tecidos funcionando como refúgios, onde a toxina não seria expressa e, portanto, não estaria selecionando os insetos mais resistentes.

Pragas provavelmente irão adaptar-se a *Bt*, independente da forma que ele seja utilizado (McGAUGHEY & WHALON, 1992), mas a eficiência de técnicas de manejo será efetiva na restauração da susceptibilidade da praga, seja por rotação das toxinas *Bt* com outras toxinas ou inseticidas, por estratégias de controle biológico ou culturais. A combinação complexa de estratégias parece ser a melhor forma de barrar o desenvolvimento de resistência, mas pode não ser a maneira mais fácil de se obter a liberação para uso comercial das plantas transgênicas resistentes a insetos.

Simulações em computador mostram que a alternância de campos tratados e não tratados pode atrasar a evolução da resistência da broca do milho e diminuir os danos nos campos não tratados (ALSTAD & ANDOW, 1995). Uma revisão mais atualizada mostra a necessidade da integração dos conhecimentos sobre a ecologia do inseto-alvo e da performance das plantas transformadas no campo para avaliar os efeitos que o cultivo prolongado destas plantas pode causar na dinâmica populacional da praga e seus inimigos naturais (GOULD, 2000).

Não há dúvidas da importância das plantas resistentes a insetos através da expressão de *Bt* para a agricultura. Entretanto, existem áreas de conhecimento que precisam ser mais bem estudadas, para que a confiança neste tipo de tecnologia aumente e sua implementação seja efetiva. É necessário que os mecanismos genéticos e de resistência das pragas sejam bem entendidos, que se conheçam os mecanismos de resistência cruzada entre as toxinas *Bt* e de outros microrganismos, que se conheça a ecologia das pragas, que se investiguem os aspectos práticos da utilização de estratégias de refúgios e, principalmente, que se desenvolva uma forma eficiente de detecção da resistência, assim que ela apareça (McGAUGHEY et al., 1998).

Para alcançar os benefícios que as plantas transformadas com *Bt* podem gerar, é essencial que haja colaboração entre a indústria da biotecnologia, as empresas

produtoras de sementes e os agricultores (PEFEROEN, 1997). A utilização destas plantas transgênicas tem como pontos positivos a redução dos danos causados por insetos e a diminuição do uso de pesticidas químicos. Assim, todos os esforços devem ser concentrados no sentido de manter essas características de interesse e assegurar a sua viabilidade a longo prazo (MAAGD et al., 1999). No entanto, não se pode esquecer que, embora a tecnologia de transformação genética com os genes *Bt* seja uma alternativa ao uso de pesticidas químicos, a integração das duas práticas deve levar a melhores resultados para o controle efetivo das pragas e o retardamento do desenvolvimento de resistência pelos insetos (GILL et al., 1992).

2.6. Espécies transformadas com a toxina de *Bt*

Em 1996, a Sandoz Seeds (que mais tarde uniu-se à empresa CIBA-Geigy para formar a Novartis Seeds) recebeu aprovação para comercializar o milho híbrido geneticamente modificado com o gene *Bt* para tolerância à broca européia do milho (“European Corn Borer” ou ECB). A expectativa era de que os produtores economizassem, anualmente, cerca de 1 bilhão de dólares com a diminuição das perdas em produtividade e dos gastos com inseticidas químicos (NOVARTIS, 2000).

Plantas de tabaco e tomate foram transformadas com uma fusão dos genes *Bt* *CryIA(b)* e *CryIC*, mostrando-se resistentes a *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* e *Manduca sexta* (VAN DER SALM et al., 1994). A δ -endotoxina de *Bt* foi também expressa em tabaco, conferindo resistência a lepidópteros. Verificou-se que o gene foi transmitido à progênie e que a toxicidade foi mantida, o que caracteriza a metodologia como sendo de grande utilidade para o controle do ataque de pragas (BARTON et al., 1987).

VAECK et al. (1987) usaram 4 genes *Bt* quiméricos para transformar tabaco e encontraram diferenças nos níveis de toxicidade de acordo com a construção utilizada, embora também tenham concluído que a estratégia é eficiente para o controle de pragas. Pesquisadores da Monsanto utilizaram a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para introduzir em tabaco genes quiméricos contendo formas truncadas de

Bt, conseguindo não só expressar a toxina em plantas, mas também transferi-la para a progênie (FISCHHOFF et al., 1987).

O gene da toxina *CryIIIA* foi inserido em batata e resultou em drástica redução dos danos causados pelo ataque do besouro do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)) em diversos experimentos de campo (PERLAK et al., 1993). A expressão em batata de uma fusão de *Bt* com o gene *neo* (que codifica para neomicina fosfotransferase ou *npt II*) mostrou que mais estudos sobre as construções gênicas são necessários para que a expressão das toxinas nas plantas transformadas seja alta (CHENG et al., 1992).

Outros trabalhos relatam o sucesso da transformação genética de várias espécies utilizando diferentes toxinas de *Bt* (STEWART et al., 1996; KOZIEL et al., 1993; DATTA et al., 1998; FUJIMOTO et al., 1993).

2.7. Efeitos das plantas *Bt* sobre outros níveis tróficos

Embora a tecnologia de transformação genética com o gene da toxina de *Bt* venha sendo amplamente utilizada, são necessários estudos sobre as interações que estas plantas transgênicas possam ter com insetos benéficos, inimigos naturais dos insetos-alvo e de outros artrópodes.

As plantas fazem parte do primeiro nível trófico, que alimenta o segundo nível, formado pelos insetos-alvo (neste caso, herbívoros ou pragas), os quais possuem inimigos naturais (parasitóides ou predadores), caracterizando o terceiro nível trófico. Existe uma intrincada relação entre os níveis tróficos para que as populações de insetos sejam mantidas em equilíbrio através de um controle biológico natural. Pesticidas, assim como plantas transgênicas, têm o potencial de destruir direta ou indiretamente este equilíbrio. Os parasitóides, geralmente himenópteros ou dípteros, são bastante específicos quanto ao inseto hospedeiro e completam seu ciclo em apenas um deles. Os predadores são mais generalistas e também podem pertencer a outros grupos de artrópodes (SCHULER et al., 1999). Estas características de especificidade são importantes, pois ajudam a prever o impacto que as plantas transgênicas podem exercer sobre outros grupos de insetos.

Um exemplo em cana-de-açúcar é o parasitóide larval *Cotesia flavipes*, um dos mais utilizados no controle biológico da broca. Se o manejo integrado de plantas transgênicas é uma estratégia de retardamento do aparecimento de resistência, torna-se importante avaliar se a toxina *CryIA(b)*, que confere resistência à broca da cana-de-açúcar, produz alguma alteração no comportamento dos parasitóides utilizados no controle biológico.

Hospedeiros que são pragas-alvo das plantas transgênicas têm qualidade nutricional reduzida pela ação da toxina *Bt*, afetando indiretamente os parasitóides, que ficam expostos à proteína inseticida ao se alimentarem (SCHULER et al., 1999). Existe, por outro lado, a possibilidade de que doses subletais da toxina aumentem a ação do parasitóide pelo impedimento da resposta imune do hospedeiro (WRIGHT & VERKERK, 1995 citado por SCHULER et al., 1999).

Outro comportamento dos parasitóides que pode ser alterado é com relação à atração produzida através de substâncias voláteis, liberadas pelas plantas ao sofrerem danos pelos insetos herbívoros. A atração pode ser diminuída, uma vez que a planta menos atacada libera menores quantidades dessas substâncias (JOHNSON et al., 1997 citado por SCHULER et al., 1999).

Percebe-se que alterações comportamentais do hospedeiro, causadas pela ingestão de plantas transformadas com *Bt*, podem causar tanto aumento quanto diminuição do ataque de parasitóides. Esta hipótese, se confirmada, mostra mais uma vez a necessidade de manejos integrados para um controle mais eficiente das pragas-alvo. É importante verificar também se a toxicidade atinge outros insetos benéficos, que têm como habitat natural as plantações de transgênicos ou vizinhas a elas. Estudos têm monitorado esta possibilidade, com resultados muitas vezes controversos.

Lagartas da borboleta Monarca (*Danaus plexippus*) que ingeriram pólen de milho transgênico disperso sobre sua alimentação natural, cresceram menos, mais lentamente e tiveram maior taxa de mortalidade do que os tratamentos controle em estudos de laboratório (LOSEY et al., 1999). Entretanto, em ensaio de campo não foi demonstrada toxicidade à lagarta (SHELTON & ROUSCH, 1999). Resultados semelhantes foram observados em um outro estudo envolvendo a toxina *Bt* e a borboleta

Papilio polyxenes, no qual não foi observado qualquer efeito potencial sobre um inseto não alvo (WRAIGHT et al., 2000).

Em outro estudo não foi observado efeito algum em joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae) que se alimentaram de pulgões (Homoptera: Aphididae) espalhados em plantações de batata transformada com *Bt* (DOGAN et al., 1996). Os autores mostraram que a população de joaninhas não teve alteração nas taxas de mortalidade, desenvolvimento, reprodução e consumo de pulgões, mas não descartam a possibilidade da detecção de efeitos indesejáveis se amostras maiores forem estudadas.

De toda forma, fica evidente a importância de estudos em todos os níveis tróficos da cadeia alimentar que mostrem a existência ou não de riscos. Existe a necessidade de uma interpretação real dos resultados numa perspectiva sócio-econômica, considerando o impacto que esta tecnologia pode ter no sentido de diminuição do uso indiscriminado de inseticidas de amplo espectro (SCHULER et al., 1999). É relevante lembrar que, no melhoramento tradicional, os híbridos superprodutivos perdem sua rusticidade e exigem quantidades altas de defensivos químicos, o que causa sérios riscos ao ambiente e à saúde humana (GRAZIANO, 2000).

2.8. A importância e o controle da praga *Diatraea saccharalis*

A quebra de produtividade da cana-de-açúcar no Brasil é causada por vários fatores, dentre eles a ocorrência de pragas como *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) e *D. flavipennella* (Box, 1931). *D. saccharalis* é a espécie que pode ser encontrada em todas as regiões canavieiras do Brasil. Suas lagartas causam a morte da gema apical (“coração morto”) em canas de até 4 meses de idade, provocando a morte da planta. Já em plantas adultas, os danos provocados causam brotações laterais, enraizamento aéreo, perda de peso, afinamento e quebra do colmo, atrofia de entrenós, entrada de fungos causadores da “podridão vermelha” e morte da planta, o que leva a uma acentuada queda da produção (MENDONÇA, 1996; PARRA, 1993). A entrada de fungos como *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* causa a inversão da sacarose, levando

à diminuição da pureza do caldo e contaminação na fermentação alcoólica (PARRA, 1993).

O controle biológico tem sido a estratégia principal utilizada no manejo integrado desta praga, com a criação e liberação de parasitóides larvais como a espécie *Cotesia flavipes* (Cam.), que foi introduzida no Brasil pelo IAA-Alagoas/PLANALSUCAR, em 1974. Este parasitóide mostrou-se o mais eficiente na redução da infestação por broca, levando a ganhos significativos em áreas onde o controle é realizado (ALMEIDA et al., 1997). Em locais onde o manejo integrado da broca da cana-de-açúcar é realizado, foi verificada uma intensidade de infestação média de 2,3% de entrenós brocados, sendo o mais baixo índice registrado desde 1980 (Centro de Tecnologia Copersucar, 1999). Este resultado reflete a eficiência alcançada pela liberação de 1,27 bilhão de adultos do parasitóide numa área de 196.000 ha de cana-de-açúcar, em 1998.

Os danos causados pela broca da cana-de-açúcar são constantemente avaliados para que se possa quantificar o valor econômico da ação das pragas e a aplicação de recursos para o seu controle efetivo (ARRIGONI, 2000). Experimentos com 20 variedades comerciais em 15 locais de plantio, mostraram que houve uma redução de 0,18% em pol % de cana, 0,25% na produção de açúcar e 0,20% na produção de álcool a cada 1% de entrenós brocados, acrescidos de 0,77% de redução na produção agrícola (Centro de Tecnologia Copersucar, 1997).

Outro estudo, realizado em condições de campo com 4 variedades comerciais infestadas com brocas, mostrou uma perda média de 1,70% na produção agrícola, 0,20% na produção de açúcar e 0,11% na produção de álcool a cada 1% de intensidade de infestação. A variedade SP80-1842 é classificada como suscetível e tem sido usada em experimentos de transformação genética na Copersucar. Esta variedade mostrou os índices mais elevados de perda verificados neste estudo, chegando a 2,12% na produção agrícola (ARRIGONI, 2000). A variedade SP80-3280 é classificada como intermediária quanto à suscetibilidade e também vem sendo utilizada em experimentos de transformação com o gene da toxina de *Bt*.

2.9 Transformação de cana-de-açúcar para resistência a insetos

Inúmeros têm sido os esforços para a obtenção de variedades de cana-de-açúcar transformadas, que expressem resistência às pragas causadoras de danos nos colmos, resultando em prejuízos para a produtividade agrícola e, conseqüentemente, redução na obtenção de açúcar e álcool.

Na Austrália, uma praga bastante importante é a larva de escarabeídeo conhecida como “pão de galinha” (Coleoptera: Scarabaeidae), um coleóptero que causa perdas consideráveis na indústria sucro-alcooleira. SHEPHERD et al. (1997) identificaram inibidores de proteinase e lectinas que apresentam atividade contra estas larvas, e construíram plasmídeos com estes genes, que foram usados em experimentos de bombardeamento. As plantas regeneradas foram caracterizadas pela expressão da proteína exógena, o que mostrou a integração do gene no genoma das mesmas.

IRVINE & MIRKOV (1997) relataram estudos feitos com lectinas como estratégia de resistência a vários insetos, mostrando a possibilidade do uso dos genes que codificam estas proteínas na transformação e melhoramento de cana-de-açúcar.

Uma população de clones transformados com o gene *CryIA(b)*, que codifica uma δ -endotoxina de *B. thuringiensis*, foi avaliada no campo e apresentou alta resistência à broca da cana-de-açúcar (ARENCIBIA et al., 1997), além de poucas alterações na estrutura genômica, o que pôde ser visto por análises de AFLPs (polimorfismos em tamanho de fragmentos amplificados).

POMPERMAYER et al. (2001) demonstraram em ensaios biológicos que inibidores de proteinases de soja interferem no desenvolvimento e reprodução de lagartas de *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), podendo portanto ser utilizados para a transformação genética da cana-de-açúcar (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Palmitos de folhas jovens das variedades SP80-1842 (Figura 1) e SP80-3280 (Figura 2) foram coletados na estação experimental da Copersucar, em Piracicaba, SP. Este material foi extraído de plantas com 6 a 12 meses de idade e levado ao laboratório, onde as folhas mais externas foram retiradas manualmente, mantendo-se as mais novas e enroladas.

A região do meristema foi preservada no processo de desinfecção através de lavagem com álcool (95%) seguida de hipoclorito de cálcio (10%) com 200µl de Tween 20 por 10 minutos. As folhas jovens mais externas foram retiradas em aparelho de fluxo laminar, onde seções de 3mm foram cortadas logo acima da região meristemática.

Cerca de 20 explantes foram retirados de cada cartucho e colocados em placas de Petri contendo 25ml de meio de cultura sólido CI-3clav (modificado de MURASHIGE & SKOOG (1962), com 3mg.l⁻¹ de 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 5% de água de coco, 150mg.l⁻¹ de ácido cítrico, 250mg.l⁻¹ de Clavulin® Beecham e solidificado com 7g.l⁻¹ de Agar). A Figura 3 mostra explantes da variedade SP80-3280, com duas semanas em cultura e formação inicial de calos.

Estes calos foram mantidos em sala escura a 27°C por 30 dias, quando a primeira repicagem foi realizada. Os calos foram repicados a cada 3 semanas, selecionando-se o material embriogênico. Calos com cerca de 1 a 19 semanas de cultivo foram utilizados nos experimentos de bombardeamento. As figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, calos embriogênicos das variedades SP80-3280 e SP80-1842 após 4 repicagens.

Figura 1 - Variedade comercial SP80-1842 utilizada nos experimentos de transformação para resistência a *Diatraea saccharalis*.

Figura 2 - Variedade comercial SP80-3280 utilizada nos experimentos de transformação para resistência a *Diatraea saccharalis*.

Figura 3 - Indução de calos de material proveniente do campo. A figura mostra os calos após 2 semanas em meio de cultura CI-3 clav.

Figura 4 - Calos embriogênicos da variedade SP80-3280, após 4 repicagens (16 semanas) em meio de cultura com 2,4-D.

Figura 5 - Calos embriogênicos da variedade SP80-1842, após 4 repicagens (16 semanas) em meio de cultura com 2,4-D.

3.2. Parâmetros dos experimentos de bombardeamento

Na técnica de bombardeamento de micropartículas utilizada, o DNA plasmidial que contém o gene de interesse foi purificado (DNA Purification System- Wizard® Plus Maxipreps- Promega) e ressolubilizado em água milliQ estéril (Biocel, Millipore) numa solução final de concentração $1\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$. Este DNA ($8,33\mu\text{l}$ de cada plasmídeo, somando um total de $25\mu\text{l}$ de DNA) foi precipitado sobre partículas de tungstênio ($50\mu\text{l}$ de solução $60\text{ng}.\mu\text{l}^{-1}$) através de mistura com cloreto de cálcio ($50\mu\text{l}$ de solução $2,5\text{M}$) e espermidina “free-base” ($20\mu\text{l}$ de solução $0,1\text{M}$). Esta mistura foi centrifugada por 2 minutos a 12.000rpm s (centrífuga Jouan MR1822) e o “pellet” lavado duas vezes em etanol absoluto e duas vezes em etanol 95%, sendo finalmente ressolubilizado em $25\mu\text{l}$ de etanol 95%.

Quatro microlitros desta mistura foram usados no bombardeamento de cada placa de Petri. Os calos embriogênicos foram posicionados no centro das placas, formando uma área alvo circular de cerca de 2cm de diâmetro. As partículas, recobertas com o DNA de interesse, foram aceleradas em direção aos calos embriogênicos.

Os disparos foram realizados numa câmara de vácuo para minimizar a resistência do ar. A aceleração das partículas foi dada pela pressão de saída de gás hélio comprimido ($4,5\text{kgf.cm}^{-3}$). A distância entre a saída das partículas e a placa contendo os calos embriogênicos foi a mesma para todos os experimentos (8cm), assim como a pressão do gás. Os calos bombardeados foram mantidos em meio de cultura sem seleção (CI-3clav) por 1 semana, seguindo-se a transferência para o meio seletivo contendo 35mg.l^{-1} do antibiótico geneticina (CI-3Gen35).

Este protocolo foi estabelecido com base nos resultados de eficiência de expressão transiente em experimentos com o gene *uid-A* realizados no início dos trabalhos com transformação na Copersucar. O revólver de genes (Figura 6), utilizado nos experimentos foi construído a partir de um trabalho publicado por FINER et al. (1992).

Figura 6 - Revólver de genes utilizado na transformação genética de cana-de-açúcar na Copersucar. Este aparelho foi construído conforme especificações de FINER et al. (1992).

3.3. Plasmídeos

Duas construções do gene *CryIA(b)* foram cedidas pela empresa Novartis Seeds e a construção do gene *neo* foi cedida pelo Dr. Henrik Albert, do Hawaiian Agricultural Research Center, Honolulu, Hawaii, EUA. Nas co-transformações utilizou-se 8,33 µl de cada um dos DNAs plasmidiais na concentração 1 µg.µl⁻¹.

3.3.1. Plasmídeos contendo o gene da toxina de *Bt CryIA(b)*, que confere resistência à broca da cana-de-açúcar:

pCIB4421 - possui o promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) de milho e o gene *CryIA(b)* (Figura 7).

pCIB4426 - possui o promotor de um gene expresso especificamente em vasos condutores de milho (“pith”) e o gene *CryIA(b)* (Figura 8).

3.3.2. Plasmídeo contendo o gene *neo*, que confere resistência aos antibióticos aminoglicosídicos geneticina e canamicina:

pHA9 - possui o promotor da ubiquitina do milho (*ubi-1*) e o gene *neo* que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II (*nptII*) (Figura 9).

Figura 7 - Esquema representativo do plasmídeo pCIB4421 (gentilmente cedido pela Novartis Seeds), que contém o promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) de milho e o gene que codifica para a proteína *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis*.

Figura 8 - Esquema representativo do plasmídeo pCIB4426 (gentilmente cedido pela Novartis Seeds), que contém o promotor de tecido condutor (“pith”) de milho e o gene que codifica para a proteína *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis*.

Figura 9 - Esquema representativo do plasmídeo pHA9 (gentilmente cedido pelo Dr. Henrik Albert, HARC, Honolulu, Hawaii, EUA), contendo o promotor de ubiquitina de milho (*ubi-1*) e o gene *neo* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II (*npt II*).

3.4. Seleção *in vitro* para resistência ao antibiótico geneticina

A seleção de calos e plantas em meio de cultura contendo o antibiótico geneticina é um procedimento de rotina na Copersucar, no caso de experimentos de co-transformação utilizando o gene *neo*. Um estudo mais detalhado, utilizando doses crescentes do agente seletivo, foi mostrado no trabalho de FALCO (1998).

No presente estudo, as células bombardeadas foram selecionadas em meio de cultura contendo 35mM de geneticina (meio de cultura CI-3Gen35). Após 6 semanas, com trocas regulares de meio de cultura a cada duas semanas, os calos foram transferidos para uma sala com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 27°C. O meio de cultura utilizado nesta etapa de regeneração teve o 2,4-D retirado da sua composição, enquanto que cinetina e NAA (5 e 2mg.l⁻¹, respectivamente) foram adicionados (meio de cultura CIGen35KN). Os calos foram mantidos nestas condições por um mês, com o meio de cultura sendo trocado a cada duas semanas.

Os embriões resistentes originaram plantas potencialmente transformadas (Figura 10), que foram selecionadas e colocadas em frascos para enraizamento (meio sem cinetina e NAA na sua composição, chamado CIGen35) (Figura 11). As plantas foram transferidas para a estufa após um mês, individualizadas em copos plásticos contendo um composto de terra e vermiculita (Figura 12).

A pressão de seleção para resistência ao antibiótico foi mantida durante toda a fase de cultura *in vitro* após o bombardeamento. O tempo médio necessário entre a indução dos calos embriogênicos e a transferência para a casa de vegetação de plantas resistentes foi de, aproximadamente, 30 semanas.

Figura 10 - Plantas potencialmente transformadas, regeneradas de calos que foram selecionados em meio CIGen35 (sem 2,4-D), suplementado com cinetina e NAA. A pressão de seleção foi mantida durante esta etapa para que plantas escape fossem identificadas e descartadas.

Figura 11 - Plantas que sofreram seleção em geneticina sendo enraizadas em meio CIGen35. A pressão de seleção foi mantida e, após 1 mês, estas plantas foram transferidas para a estufa, em copos plásticos.

Figura 12 - Plantas selecionadas *in vitro*, em fase de aclimação na estufa. As touceiras foram desmembradas e 10 mudas de cada frasco foram plantadas individualmente em copos plásticos.

3.5. Seleção em estufa para resistência ao antibiótico canamicina

Da mesma forma que no trabalho de FALCO (1998), as plantas foram testadas para resistência ao antibiótico canamicina após atingirem cerca de 30cm de altura (Figura 13), procedimento este realizado como rotina no caso de co-transformações com o gene *neo*.

Para este teste, todos os perfilhos das plantas foram retirados, mantendo-se apenas a folha +1 (a folha mais nova que apresenta “dewlap” visível, ou seja, a região de inserção da folha na bainha). Dois cortes foram feitos lado a lado na folha, deixando-se intacta a região da nervura central. Cem microlitros de uma solução 1% de canamicina, contendo 200µl de Tween-20, foram aplicados em um pedaço de papel-toalha, que foi colocado em volta dos cortes e recoberto com filme plástico, para evitar evaporação rápida da solução.

Após 10 dias, as plantas foram avaliadas e aquelas que apresentaram clorose e brotação anormal das folhas jovens foram descartadas por não serem resistentes ao

antibiótico. As plantas resistentes selecionadas foram individualmente transplantadas para vasos maiores e mantidas em estufa até a liberação para plantio.

Figura 13 - Teste de resistência ao antibiótico canamicina, aplicado na concentração de 1% em plantas transformadas. As plantas que apresentaram brotação anormal e clorose das folhas, foram descartadas. Plantas resistentes foram mantidas em estufa para análises posteriores.

3.6. Análise de DNA – método PCR

Pares de iniciadores (“primers”) específicos para os genes *neo* e *CryIA(b)* e para os promotores PEPC e “pith” foram desenhados e produzidos por Gibco/BRL LifeTechnologies. As amplificações geraram fragmentos de 199, 200, 204 e 203bp que identificaram a presença do promotor PEPC, do promotor de vasos (“pith”), do gene do *Bt* e do gene *neo*, respectivamente. Os DNAs das plantas transgênicas e dos controles (variedades originais) foram extraídos, a partir de folhas jovens congeladas, segundo o método usado para arroz (McCOUCH et al., 1988). Após a extração, a concentração de DNA foi estimada visualmente, utilizando DNAs de concentrações conhecidas. A amplificação por PCR foi feita em um aparelho PT100 (MJ Research, Inc.).

O ciclo de amplificação utilizado foi: 1) 94°C, 3 minutos; 2) 94°C, 1 minuto; 3) 59°C, 1 minuto; 4) 72°C, 1,5 minuto; 5) ir para etapa 2 por 40 vezes; 6) 72°C, 3 minutos. A reação de amplificação foi montada conforme procedimento padrão: 2,5µl de tampão para PCR 10X; 1,5µl de MgCl₂ 50mM; 0,5µl de mistura de dNTPs 2,5mM; 15pmoles de cada “primer”; 0,3µl de Taq DNA polimerase; 0,2µl de DNA da planta e 19µl de água milliQ estéril, totalizando 25µl de reação.

As amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,2%, 1X TBE, corrida a 50 Volts, por aproximadamente 2 horas. Os resultados foram visualizados sobre luz UV e fotografados para análises posteriores.

3.7. Análise de DNA - método Southern Blot

A caracterização molecular das plantas resistentes à broca foi feita pela análise Southern Blot, através da qual foram obtidas informações sobre a complexidade de inserção do gene, evidenciando o número de cópias introduzidas.

Os protocolos utilizados para extração de DNA, digestão com endonucleases de restrição, eletroforese em gel de agarose, transferência do DNA para membranas de nylon (Hybond+, Amersham Pharmacia) e hibridização radioativa com P³² estão descritos em DA SILVA (1993), modificados apenas para a utilização do sistema de marcação RediPrime® (Amersham Pharmacia Biotech). O DNA foi extraído a partir de folhas jovens congeladas em nitrogênio líquido, segundo o método usado para arroz (McCOUCH et al., 1988).

Os DNAs das plantas controle e transformadas foram digeridos com as enzimas *Hind*III (para verificar número de cópias inseridas do gene *neo*) e *Eco*RI (para verificar o número de cópias inseridas do gene *CryIA(b)*). As digestões foram separadas por eletroforese (a 20 Volts por 20 hs.) em gel de agarose (1%) e os DNAs foram transferidos para as membranas usando a solução 0,4M de NaOH. Foram feitas duas membranas, cada uma contendo os DNAs digeridos com apenas uma das enzimas (10µg de DNA por amostra).

Para as plantas digeridas com *Hind*III, utilizou-se como sonda o fragmento de PCR (203bp de tamanho) gerado por amplificação com “primers” específicos para o gene *neo*. Esta sonda teve homologia no controle positivo existente na membrana, ou seja, uma diluição do fragmento de 0,8kb purificado da digestão de pHA9 com a enzima *Bam*HI. Para as plantas digeridas com *Eco*RI a sonda utilizada foi o fragmento de PCR (204bp) gerado por amplificação com “primers” específicos para o gene do *Bt*. Esta sonda foi homóloga ao controle positivo da membrana, ou seja, uma diluição do fragmento de 2kb, purificado a partir da dupla digestão do pCIB4421 com *Bam*HI e *Eco*RI. As sondas (25ng de DNA) foram marcadas com $^{32}\text{P}\alpha\text{-dCTP}$ RedivueTM utilizando-se o sistema RediPrime[®] (ambos APBiotech).

3.8. Quantificação de proteína total- método Bradford

A concentração de proteínas das plantas foi quantificada pelo método descrito por BRADFORD (1976) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro, com absorbância de 595nm.

3.9. Análise da expressão da toxina - método ELISA sanduíche

Foi utilizado o protocolo descrito em CLARK et al. (1988) (citado por KOZIEL et al., 1993) para quantificação da expressão da toxina *CryIA(b)* nas plantas transformadas. Os anticorpos foram cedidos pela Dra. Nadine Carozzi (Novartis Seeds), assim como a proteína pura usada nas diluições da curva-padrão. Algumas modificações foram necessárias, sendo que o protocolo de ELISA sanduíche utilizado segue as etapas abaixo relacionadas:

1- Cobertura da placa ELISA com o anticorpo anti-*Bt* produzido em coelho ($4\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ em BBS- 100mM ácido bórico, 25mM tetraborato de sódio, 75mM cloreto de sódio, pH 8,5), $50\mu\text{l}$ / poço. Incubação por 12 horas a 4°C. Lavagem da placa 3 vezes com o tampão de lavagem 1X (tampão 10X: 100mM Tris, 0,5% Tween-20, 0,2% azida sódica, pH 8,0).

2- Cobertura da placa com 100µl/ poço do tampão bloqueador (10mM fosfato de sódio, 140mM cloreto de sódio, 1% BSA, 0,02% azida sódica, pH 7,4)- incubação por 60 minutos, à temperatura ambiente. Lavagem da placa 3 vezes com o tampão 1X.

3- Adição da curva-padrão de *Bt* (40, 30, 20, 15, 10, 5, 2,5 e 1ng.ml⁻¹) e das amostras de folha (diluição 1:10), de bainha de folha, casca e colmo (sem diluição) em triplicatas (folha: 50µl/ poço; bainha de folha, casca e colmo: 100µl/ poço). A diluição, quando necessária, foi feita em tampão diluente ELISA (10mM fosfato de sódio, 140mM cloreto de sódio, 0,05% Tween-20, 1% BSA, 0,02% azida sódica, pH 7,4) - incubação por 12 horas, a 4°C. Lavagem da placa 3 vezes com o tampão 1X.

Obs.: o extrato das plantas foi feito utilizando-se um tampão carbonato de sódio (mistura 50mM Na₂CO₃/ NaHCO₃ pH 8,0; 10mM EDTA; 0,05% Tween-20; 0,05% Triton-X; e 100mM NaCl). Sessenta miligramas do tecido foram adicionados a 1,0ml de tampão e o material foi triturado num aparelho Mini-beadbeaterTM (Biospec Products).

4- Adição do anticorpo anti-*Bt* produzido em cabra (0,75µg.ml⁻¹ em tampão de diluição ELISA, 50µl/ poço)- incubação por 1,5 hora a 37°C. Lavagem da placa 3 vezes com o tampão 1X.

5- Adição do anticorpo anticabra, conjugado com fosfatase alcalina, produzido em coelho (Kirkegaard & Perry Laboratories) na diluição 1:1500 em tampão de diluição ELISA (50µl/ poço)- incubação por 1 hora a 37°C. Lavagem da placa 3 vezes com o tampão 1X.

6- Adição de 50µl/ poço do substrato pNPP (15mg substrato fosfatase/ 25ml do tampão substrato fosfatase- 96ml dietalonamina, 0,49g cloreto de magnésio, pH 9,8)- incubação no escuro, à temperatura ambiente por 8 minutos.

A primeira leitura a 405nm de absorbância foi feita após 8 minutos, e 3 leituras posteriores foram feitas com o mesmo intervalo de tempo. As médias das replicatas foram utilizadas nos cálculos dos resultados que serão apresentados.

3.10. Bioensaios

Foram realizadas três repetições de bioensaios utilizando folhas provenientes de estufa. Colmos de seis plantas transgênicas escolhidas (representando eventos de transformação distintos) e das duas variedades originais foram retirados do campo. As gemas foram isoladas e plantadas em vasos, os quais foram mantidos em estufa.

Após dois meses, o primeiro bioensaio foi montado utilizando-se bandejas especiais (Rearing Tray Bio-RT-32[®], C-D International, Inc.). Foram montados oito blocos, sendo que cada um deles continha as plantas originais e transgênicas inteiramente casualizadas.

Três seções de folha +1 (com 3 cm de comprimento) foram colocadas em cada parcela da bandeja. O material foi coletado na estufa e mantido em recipiente com água destilada para que as folhas não ressecassem durante a montagem do ensaio. As brocas neonatas foram cedidas pelo Laboratório de Entomologia da Copersucar e foram inoculadas em número de 10 por parcela. A vedação foi feita com um adesivo próprio para este tipo de bandeja (Bio-CV-4, C-D International, Inc.), o qual permite suficiente aeração do ambiente e evita a fuga das brocas. As bandejas foram colocadas em caixas plásticas com vedação hermética (tipo Tupperware[®]) contendo filtro umedecido para evitar que as folhas secassem rapidamente. As caixas foram mantidas em sala escura a 27°C, com a umidade relativa sendo anotada (média de 56%).

As avaliações foram realizadas nos tempos 2, 4 e 7 dias após a inoculação, sendo que os filtros foram umedecidos novamente nas mesmas datas. Não houve troca das folhas a cada avaliação.

3.11. Estudos de campo

Plantas controle e transgênicas das variedades SP80-1842 e SP80-3280, foram avaliadas no campo, em um talhão de 0,17ha localizado na estação experimental da Copersucar, em Piracicaba, SP. Doze mudas de cada planta foram cultivadas em

delineamentos de 6 metros, com 0,5 metro de espaçamento entre elas. O espaçamento entre linhas foi de 1,4 metro, com carregadores de 2 metros de frente e 1 metro de fundo.

O fenótipo destas plantas foi avaliado após 10 meses do plantio. A infestação artificial com brocas neonatas foi iniciada 3 meses após o plantio de modo que, a cada 15 dias, 5 larvas foram inoculadas em cada planta, para avaliação de sintomas característicos do ataque desses insetos. Para as avaliações dos danos causados pelas brocas e das características de interesse agrônomo, foram retirados 10 colmos de cada linha de 6 metros (Figura 14). As plantas foram analisadas tecnologicamente para brix, teor de fibra, pol, pureza, açúcar redutor e outras características quantitativas, através de procedimentos rotineiramente utilizados na Copersucar.

A verificação de danos internos causados por brocas foi feita através da quebra longitudinal dos colmos para contagem de entrenós brocados em cada cana (Figura 15) e pesagem do material, procedimento realizado antes da moagem dos colmos para as avaliações tecnológicas. Informações sobre a intensidade de infestação voltaram a ser coletadas quando as plantas estavam há 22 meses no campo, com mais repetições, para que uma melhor avaliação pudesse ser realizada e eventualmente relacionada com os resultados da expressão da toxina obtidos no ELISA. Na primeira amostragem (plantas com 10 meses de idade) também foram obtidas informações sobre o número de perfilhos, o diâmetro médio dos colmos e a altura das plantas.

A fórmula utilizada no cálculo da intensidade de infestação (I.I.%) foi:

$$\text{I.I.\%} = \frac{\text{Número de entrenós brocados} \times 100}{\text{Número total de entrenós}}$$

Figura 14 - Feixes de cana amostrados para avaliação tecnológica e de intensidade de infestação por broca. Dez colmos de cada linha de 6 metros foram retirados do campo, procedendo-se medições de altura, peso e número de entrenós. Os colmos foram quebrados longitudinalmente para a determinação da intensidade de infestação e processados para as avaliações tecnológicas das características de interesse agrônômico.

Figura 15 - Corte longitudinal de colmos para avaliação de intensidade de infestação. Os colmos com sintomas de infestação são da variedade original SP80-1842 utilizada como controle, e os sadios são de uma planta transformada (planta 7) da mesma variedade. Após esta avaliação, estes colmos foram amarrados nos seus feixes originais, para as análises posteriores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises moleculares

4.1.1. PCR

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram que plantas utilizadas como controles negativos não apresentaram amplificação das seqüências identificadas pelos iniciadores (“primers”), enquanto que as plantas transgênicas tiveram padrão similar ao dos controles positivos.

A integração da construção PEPC/*CryIA(b)* (Figura 16 A) pôde ser confirmada através da técnica de PCR pois os iniciadores foram específicos para amplificar uma seqüência dentro do promotor. Da mesma forma, a integração da construção com o promotor de um gene expresso em vasos condutores (“pith”) foi mostrada pela amplificação de parte de sua seqüência (Figura 16 B). O DNA da planta 7 não foi amplificado quando utilizou-se esta combinação de iniciadores, o que pode indicar que as cópias do gene *Bt* são todas dirigidas pelo promotor PEPC. Os resultados da primeira quantificação da toxina por ELISA, que serão apresentados oportunamente neste capítulo, mostraram que a planta 7 teve a menor expressão em casca, colmo e bainha de folha dentre as plantas analisadas (Tabela 1), o que poderia ser explicado pela baixa expressão do promotor PEPC nestes tecidos não-verdes e pela ausência do promotor “pith”, mostrada pelo PCR. A integração da construção PEPC/*CryIA(b)* na planta 7 foi melhor caracterizada com a quantificação por ELISA, mostrando a alta expressão da toxina em folhas. Como os resultados do PCR, utilizando os pares de iniciadores específicos para a amplificação de seqüências dos promotores, mostraram a

integração deles em todas as plantas (exceto na planta 7), esperava-se quantificar alguma expressão da toxina em todos os tecidos avaliados, dirigida por um dos promotores, ou por ambos. Entretanto, os resultados de ELISA irão mostrar que a avaliação de plantas transgênicas por PCR não é suficiente para fazer qualquer afirmação desta natureza.

A Figura 16 C mostra a presença de pelo menos uma cópia do gene *Bt* em todas as plantas, uma vez que os iniciadores foram desenhados de forma a identificar uma sequência dentro deste gene. O mesmo resultado aparece quando amplificamos os DNAs com iniciadores específicos para identificar uma sequência do gene marcador *neo* (Figura 16 D). Os resultados confirmando a inserção do gene *neo* eram esperados, uma vez que todas as plantas caracterizadas molecularmente por PCR mostraram um fenótipo resistente aos antibióticos geneticina e canamicina (utilizados na seleção *in vitro* e em estufa, respectivamente). Quanto aos resultados para o gene *Bt*, o PCR foi eficiente ao caracterizar a transformação, mais tarde confirmada pelo fenótipo resistente das plantas transgênicas, infestadas artificialmente com brocas em bioensaios e avaliações de campo.

A análise através de PCR permite uma avaliação rápida para identificação de transformantes, mas necessita de comprovação através de outras técnicas que forneçam resultados mais complexos. Existem características, inerentes à técnica, que limitam as conclusões. Uma delas é a facilidade de contaminação da amostra de DNA que está sendo analisada com um DNA qualquer, o que levaria a resultados falso positivos. Esta técnica é pouco robusta e apenas mostra que existem sequências homólogas aos iniciadores utilizados, promovendo a amplificação do DNA. Esta homologia pode não ser realmente com o gene que foi integrado, e sim com sequências existentes no genoma da própria planta. Além disso, a especificidade varia em função das condições da reação de amplificação e tamanho dos iniciadores (REGISTER III, 1997), o que muitas vezes gera o aparecimento de bandas não específicas em todos os DNAs amostrados, inclusive nos controles. As análises por Southern Blot e ELISA são necessárias para que a transformação seja confirmada de maneira mais complexa, uma vez que estas técnicas avaliam a presença ou ausência de sequências e proteínas específicas, respectivamente.

Figura 16 – Plantas transformadas analisadas por PCR, usando iniciadores (“primers”) específicos para os promotores PEPC (A) e “pith” (B), e para os genes *Bt* (C) e *neo* (D). Os resultados mostram que houve integração dos genes que conferem resistência a antibióticos e insetos. A planta 7 não apresenta amplificação do DNA quando utilizados os iniciadores específicos para o promotor “pith”, o que pode significar que todas as cópias do gene *Bt* referem-se à construção dirigida pelo promotor PEPC.

4.1.2. Southern Blot

A integração de um gene exógeno no genoma de um organismo qualquer pode ser analisada através de diferentes métodos moleculares e bioquímicos, além dos

estudos genéticos usados na identificação de possíveis alterações na performance das plantas originais (REGISTER III, 1997). Dependendo do método utilizado, os resultados podem levar a falsas conclusões, e neste caso, podem significar o fracasso de um projeto de muitos anos. Por outro lado, as tecnologias disponíveis atualmente têm o potencial de caracterizar de maneira complexa um evento de transformação genética.

Uma das técnicas utilizadas neste trabalho foi o Southern Blot, que tem potencial para avaliar o número de cópias introduzidas no genoma de uma planta, a complexidade da integração, o número de sítios cromossomais onde o gene foi introduzido, dentre outras avaliações, dependendo da forma como o DNA é digerido e das sondas que são utilizadas nas hibridizações (REGISTER III, 1997). Como o objetivo foi verificar o número de cópias dos genes, o DNA de cada evento foi digerido com uma endonuclease específica, sem sítios de restrição dentro das seqüências dos genes *neo* e *CryIA(b)*. Assim, as cópias dos genes, introduzidas ao acaso (em número e posição) no genoma das plantas, ficaram intactas e puderam ser identificadas por sondas específicas.

A análise, feita separadamente para cada gene, mostrou que a co-transformação foi eficiente. Todas as plantas avaliadas tiveram os dois genes inseridos, embora com um número de bandas (cópias) variável em cada evento de transformação (Figura 17). Este resultado era esperado, uma vez que a co-transformação foi realizada com três construções distintas (plasmídeos diferentes) em um mesmo disparo. As plantas selecionadas *in vitro* para resistência ao antibiótico geneticina, e posteriormente em estufa para resistência a canamicina, deveriam realmente possuir o gene *neo*, como foi verificado na autoradiografia (Figura 17A). Entretanto, a correlação entre o número de cópias e a expressão da proteína exógena não foi determinada, uma vez que este gene foi usado apenas como marcador dos calos e, posteriormente, das plantas potencialmente transformadas, para a que as seleções *in vitro* e em estufa fossem rápidas e eficientes.

Atualmente, devido às pressões da opinião pública sobre os alimentos transgênicos, as empresas de biotecnologia têm buscado novas maneiras de fazer esta seleção *in vitro*, utilizando genes que sejam comprovadamente eficientes em marcar as

plantas transformadas, além de seguros quanto aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Embora tenham sido realizados estudos que mostram que a proteína *nptII*, codificada pelo gene *neo*, sofre degradação no intestino da mesma forma que outras proteínas da dieta, não representando risco para o consumo humano e animal (FUCHS et al., 1993), a expressão constitutiva de genes que conferem resistência a antibióticos em alimentos transgênicos sempre foi alvo de debates. Uma das alternativas para a eliminação deste gene marcador é a utilização de seleção positiva para compostos não-tóxicos adicionados aos meios de cultura, como a manose, por exemplo. Outra alternativa tem sido encontrada na crescente utilização de construções com dois genes, o de resistência a herbicida e outro a insetos, no mesmo plasmídeo (MONSANTO, 2001). Neste caso, o princípio ativo do herbicida é utilizado como agente de seleção *in vitro*, e as plantas transformadas passam a possuir as duas características de interesse agrônomo ao mesmo tempo.

Na Copersucar, seguindo a orientação da Novartis Seeds, os experimentos com o gene *Bt* utilizando a resistência a antibióticos (conferida pelo gene *neo*) como característica de marcação foram suspensos. As plantas co-transformadas com os genes *Bt* e *neo* avaliadas neste trabalho não serão lançadas comercialmente, embora todos os estudos genéticos e de campo solicitados pela CTNBio estejam sendo realizados. A análise completa deste material tem como objetivo a comprovação da estabilidade da toxina em longo prazo, da ausência de efeitos sobre outros níveis tróficos, da manutenção das características agrônomicas encontradas nas variedades originais e da segurança dos produtos que chegarão aos consumidores. Existe uma orientação para a utilização de genes para seleção positiva nas fases *in vitro*, assim que estes estejam disponíveis, o que não invalidará os resultados aqui apresentados.

Foram feitas tentativas de se correlacionar o número variável de cópias do gene *Bt*, visualizado no Southern Blot (Figura 17B), com o resultado da quantificação da expressão da toxina, obtido pelo método ELISA. A princípio, pode-se dizer que o número de cópias determinado no Southern Blot não pôde ser correlacionado à concentração de toxina nos extratos avaliados, já que algumas dessas cópias foram provavelmente inseridas em locais não transcritos do genoma. Este é um problema

encontrado quando se utiliza o bombardeamento de genes ao invés da transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. No primeiro caso, a integração do gene exógeno é mais complexa, resultando em integrações múltiplas dos genes e rearranjos do DNA, como foi abordado na revisão deste trabalho. Assim, será visto na discussão dos resultados do ELISA que algumas plantas com um alto número de cópias apresentaram níveis mais baixos da proteína do que plantas com poucas cópias. O inverso também poderia estar acontecendo, já que na transformação por bombardeamento a integração dos genes ocorre totalmente ao acaso, gerando padrões de inserção e expressão bastante variados. Entretanto, silenciamento e rearranjos dos transgenes no genoma das plantas são fenômenos mais prováveis, impedindo análises de correlação entre o número de cópias e a quantificação da expressão da proteína exógena.

O Southern Blot foi utilizado para caracterizar 14 plantas, sendo possível distinguir 12 eventos independentes (Figura 17). Foram identificados 6 eventos da variedade SP80-1842, distintos entre si, com número de cópias variando de 2 a mais de 7 para os genes *Bt* e *neo*. Da variedade SP80-3280, foram avaliadas 8 plantas, sendo 6 eventos distintos. O número de cópias variou de 1 a mais de 12 para os genes *Bt* e *neo*. A qualidade das autoradiografias impede que a determinação do número de cópias para cada evento seja precisa, mas comprova a inserção das mesmas, o que é suficiente para caracterizar a transformação e identificar os diferentes eventos. Foi observado que as plantas 241 e 242 eram representantes um mesmo evento de transformação, assim como as plantas 106 e 107. Isto mostra que as plantas 241 e 242 originaram-se de uma mesma célula transformada que depois, após a regeneração e seleção de plantas, produziu mais de uma muda para o plantio em copos plásticos. O mesmo aconteceu com as plantas 107 e 106, representantes de um outro evento. Resultados assim são comuns quando não se monitora os calos e plantas regeneradas *in vitro* após o bombardeamento, mantendo-os individualizados até o plantio. FALCO et al. (2000) co-transformaram variedades brasileiras de cana-de-açúcar e, das 20 plantas analisadas para presença do gene *bar*, que confere resistência aos herbicidas glufosinato de amônio e bialafós, apenas 3 eventos distintos foram identificados.

Comparando-se a caracterização molecular utilizando as técnicas de PCR e Southern Blot (Figuras 16 e 17, respectivamente), pode-se supor que as cópias visualizadas na planta 7 são da construção com o promotor específico de tecidos verdes, PEPC. Esta planta foi a única que não apresentou amplificação com os iniciadores específicos para uma sequência do promotor “pith”, o que mostra que a mesma não foi integrada no DNA da planta. Por outro lado, os resultados de PCR mostram a integração dos dois genes (*Bt* e *neo*) em todos os eventos analisados, o que foi também comprovado pelo Southern Blot, caracterizando a eficiência da co-transformação.

Figura 17 - Southern blots mostrando o número variado de cópias dos genes *neo* (A) e *Bt* (B) introduzidos nas variedades SP80-1842 e SP80-3280. Os controles positivos são resultantes da digestão dos plasmídios pHA9 com a enzima BamHI e pCIB4421 com as enzimas BamHI/SacI, gerando os fragmentos com os tamanhos indicados. As plantas controle não apresentam bandas, como era esperado. Plantas 7, 41, 53, 68, 157 e 99 são originárias da variedade SP80-1842. Plantas 219, 220, 228, 239, 241, 242, 106 e 107 são originárias da variedade SP80-3280.

4.1.3. ELISA sanduíche

Uma avaliação preliminar da expressão da toxina *CryIA(b)* em extratos de diferentes tecidos foi realizada no intuito de testar e otimizar a metodologia utilizada na Novartis Seeds. As modificações feitas foram descritas no Capítulo 3 deste trabalho.

A Tabela 1 mostra que a expressão em extratos de folha foi mais alta em todos os eventos, com exceção das plantas 106 e 107 (representantes de um mesmo evento). Este resultado pode estar relacionado com a maior eficiência do promotor PEPC em cana-de-açúcar, uma vez que este é específico de tecidos verdes. O fato deste promotor ter sido isolado em milho, cujo genoma apresenta grande homologia com cana, também poderia explicar esta eficiência. Os resultados encontrados com os extratos de folha das plantas 106 e 107 são discutíveis, uma vez que bioensaios realizados posteriormente com a planta 106 mostraram um controle efetivo sobre a ação das brocas, com 100% de mortalidade das mesmas. Assim, se os resultados dos bioensaios tivessem sido obtidos antes, seria esperada alguma expressão da toxina em folhas, já que estas foram fornecidas como alimento para as brocas.

As plantas que tiveram expressão da toxina nos extratos de bainha, apresentaram uma concentração mais homogênea de *CryIA(b)*, se comparadas entre elas, diferente do que foi observado em extratos de colmo e casca, onde a variação é bem maior. Em um estudo comparando diferentes promotores (KOZIEL et al., 1993), a caracterização de plantas transgênicas de milho pelo ELISA também mostrou a eficiência do promotor PEPC, apresentando boa correlação com resultados de campo, expressão bastante semelhante da toxina em diferentes genótipos e alta expressão em folhas. A mesma construção não foi tão eficiente em vasos e raízes, tecidos onde a expressão foi baixa, mas a quantidade de toxina produzida foi suficiente para barrar a entrada da broca (ECB) nos colmos. Os resultados do presente trabalho confirmam estas afirmações, uma vez que a grande variação da concentração da toxina nos diferentes tecidos e entre plantas distintas não limitou o controle dos danos causados pelas brocas, com algumas plantas apresentando 0% de infestação, como será visto na discussão dos resultados de campo.

Tabela 1 – Primeira quantificação por ELISA da expressão da toxina *CryIA(b)* (ng Btk/mg proteína total) em diferentes tecidos das plantas transgênicas e respectivos controles.

Planta	Tecido amostrado			
	Folha	Colmo	Casca	Bainha
SP80-1842	0	0	0	0
7	879,9	0	1,31	69,1
41	211,1	193,3	172,7	152,5
53	1146,5	0	0	0
68	1079,4	0	0	0
99	560,1	0	12,1	117,5
157	707,3	26,2	112,8	99,5
SP80-3280	0	0	0	0
106	0	0	42,6	202,9
107	0	430,9	319,7	262,1
219	444,1	0	0	0
220	985,3	168,3	141,3	273,3
228	573,7	0	0	0
239	2233,1	115,5	116,5	141,9
241	539,3	193,3	300,6	220,7
242	465,7	205,9	172,5	154,5

A segunda avaliação das plantas transgênicas por ELISA foi feita após 22 meses do plantio das mesmas no campo. Os extratos foram preparados com o mesmo material retirado para avaliação de intensidade de infestação. As médias das 4 repetições de cada tecido, para cada planta, são apresentadas na Tabela 2. A idade das plantas e a forma de preparo dos extratos podem ter interferido nos resultados obtidos, que mostram uma expressão em folhas bem menor daquela observada na primeira avaliação (Tabela 1). Neste ensaio, as plantas 68, 241, 242 e 106 não foram coletadas pois não seriam posteriormente multiplicadas para novos estudos de campo. Esta escolha baseou-se em todos os resultados obtidos até aquele momento, que juntos produziram o perfil dos 5 melhores transformantes de cada variedade que seriam mantidos para mais testes de campo.

A única planta que teve a expressão em folha aumentada com relação à primeira avaliação foi a 107. Em todas as outras houve uma diminuição da produção da toxina em folhas. Entretanto, todas as plantas apresentaram-se resistentes às brocas em ensaios de campo, como será visto adiante. Outro resultado que chamou a atenção foi que, em colmo, a concentração da toxina aumentou em todas as plantas originadas a partir da SP80-1842, enquanto que em folha houve um decréscimo, podendo-se pensar em alguma correlação entre eficiência do promotor PEPC em folha e idade do tecido. De toda forma, a expressão da toxina em todos os tecidos da planta 7 foi menor do que nas outras plantas. Isto talvez possa ser explicado pela inserção de poucas cópias do gene *Bt* (Figura 17B), dirigidas apenas pelo promotor PEPC, como visto no PCR (Figura 16).

Das plantas originárias da variedade SP80-3280, as maiores diferenças com relação à primeira quantificação da proteína puderam ser observadas nas plantas 239 e 107. A quantificação da toxina em extrato de folha da 107 mostrou que pode existir mosaicismo entre colmos oriundos da mesma planta, mas de touceiras diferentes. No primeiro ELISA, a toxina não foi detectada nas plantas 106 e 107. Nesta avaliação, apesar da planta 106 não ter sido avaliada, houve uma repetição da planta 107 onde a toxina não foi expressa em folha, enquanto que nas outras repetições o mesmo não aconteceu (dados não apresentados), e a expressão foi alta.

A planta 239 teve um aumento considerável da expressão em colmo e bainha, com diminuição na expressão em folha. Esta planta, apesar de ter apresentado amplificação da sequência do promotor “pith” (Figura 16B), apresentou apenas uma cópia do gene *Bt* (Figura 17B) e boa expressão da toxina em todos os tecidos (Tabelas 1 e 2). Este evento mostra como é errôneo utilizar apenas o PCR para a caracterização molecular de plantas transgênicas, assim como fazer qualquer previsão da expressão de uma proteína exógena baseada no número de cópias do gene introduzidas no genoma analisado.

Os resultados de ELISA aqui apresentados mostraram que a expressão de uma proteína exógena em uma planta não depende apenas da quantidade e da inserção correta das cópias do gene que codifica esta proteína. Entre outros fatores, a eficiência

dos promotores utilizados nas construções plasmidiais interfere de maneira decisiva na expressão. A variação na concentração da toxina em tecidos diferentes encontrada neste trabalho é um dos indícios de que os promotores não possuem a mesma eficiência. Se uma planta tiver a inserção de inúmeras cópias de um determinado gene, mas o promotor utilizado não tiver boa expressão naquela espécie de planta ou no tecido-alvo, então a correlação entre número de cópias e expressão da proteína será baixa. Em cana-de-açúcar, o promotor *ubi-1* de milho é bastante eficiente em experimentos de transformação, contrapondo-se à eficiência do promotor 35S do CaMV (vírus do mosaico da couve-flor), muito utilizado em transformação de outras culturas (GALLO-MEAGHER & IRVINE, 1993). No caso dos promotores utilizados no presente trabalho (PEPC e “pith” de milho), não havia estudo algum sobre a eficiência deles em cana-de-açúcar. Entretanto, o estudo em separado das duas construções com o gene *Bt* poderia levar muito tempo e demandar maiores investimentos por parte das empresas envolvidas (Novartis Seeds e Copersucar), e por este motivo optou-se por fazer co-transformações utilizando as duas construções ao mesmo tempo.

Experimentos utilizando apenas uma das construções com o gene *Bt* seriam importantes não apenas como controles, mas também como forma de avaliação dos promotores. Caracterizar a eficiência de cada um e definir qual deles dirige uma melhor expressão do transgene, poderia abrir perspectivas futuras para novas construções com outros genes de interesse para a transformação de cana-de-açúcar e outras gramíneas. Além disso, a procura por promotores tecido-específicos em monocotiledôneas tem aumentado, uma vez que, na maioria das vezes, o gene exógeno não precisa ser expresso constitutivamente. DATTA et al. (1998) compararam a expressão do gene *CryIA(b)* em arroz, dirigido por quatro promotores distintos (PEPC, “pith”, 35S do CaMV e Actina-1) e mostraram a eficiência da construção pCIB4421, a mesma utilizada no presente trabalho. Estudos com este enfoque são necessários, principalmente quando se pensa na variedade de genes que podem ser introduzidos em tecidos específicos, não apenas com um objetivo aplicado, mas também para se conhecer melhor a biologia das plantas cultivadas. A maior disponibilidade de genes

com o desenvolvimento de projetos como o Genoma da Cana, financiado pela FAPESP, cria a necessidade de melhores estudos na área de promotores.

Tabela 2 – Quantificação da toxina *CryIA(b)* por ELISA, avaliando extratos de folha, colmo, bainha e casca das plantas após 22 meses de plantio no campo. São apresentadas as médias de expressão das repetições e respectivos desvios-padrões.

	Concentração da toxina (ng <i>Btk</i> / mg proteína total)			
	Tecido			
Planta	Colmo	Bainha	Casca	Folha
1842 controle	0	0	0	0
7	7,36 ± 8,53	68,55 ± 38,9	20,51 ± 9,1	76,18 ± 6,03
41	410,84 ± 348,43	146,67 ± 65,6	132,68 ± 29,69	104,73 ± 68,54
53	0	0	0	385,66 ± 245,57
157	43,83 ± 25,32	141,44 ± 37,82	50,1 ± 21,03	124,54 ± 44,44
99	184,55 ± 176,09	184,18 ± 20,25	147,08 ± 61,31	182,56 ± 52,17
3280 controle	0	0	0	0
219	0	0	0	219,01 ± 53,15
220	142,4 ± 16,77	316,3 ± 41,07	123,74 ± 21,68	277,11 ± 112,55
228	0	0	0	113,27 ± 45,57
239	982,5 ± 866,2	368,57 ± 128,28	122,71 ± 98,52	315,05 ± 43,61
107	110,06 ± 97,01	299,72 ± 102,09	157,56 ± 60,46	151,08 ± 213,66

4.2. Bioensaios

Larvas inoculadas em tratamentos controle com plantas não transformadas apresentaram um comportamento alimentar diferente daquele observado nos tratamentos onde larvas se alimentaram de folhas de plantas transgênicas. Em condições de campo, larvas de *Diatraea saccharalis* se alimentam inicialmente de bainha de folha

antes de entrarem nos colmos. Entretanto, a montagem dos bioensaios foi feita com seções de folhas +1, provenientes dos vasos em estufa, pela facilidade de manipulação e contagem das brocas, o que gerou resultados confiáveis e rápidos.

Bioensaios utilizando bainha de folha e casca de colmo, ao invés de folha, foram montados numa tentativa de estabelecimento do protocolo utilizando estes tecidos como alimento. No entanto, observou-se que havia uma maior ocorrência de fungos e liberação de compostos fenólicos já no segundo dia após a inoculação das brocas. Além disso, o comportamento das larvas e a sua localização em ambos os tecidos dificultaram a contagem das mesmas. Assim, optou-se por fazer a avaliação utilizando folha como alimento. Em uma semana foi determinada a taxa de mortalidade de brocas alimentadas com folhas transgênicas, nas condições estabelecidas pelo protocolo. Os três bioensaios, realizados com um mês de intervalo, tiveram oito repetições de cada um dos tratamentos, distribuídas ao acaso.

Os resultados obtidos mostram que, em dois dias, as larvas que se alimentaram de plantas transgênicas estavam sofrendo os primeiros efeitos da ingestão da toxina (Figura 18). Com este tempo após infestação, foram observadas pequenas mordidas (Figura 19B) nas folhas transgênicas ao invés da raspagem de áreas mais extensas, verificada nos controles (Figura 19A), mostrando que as larvas num primeiro momento tentaram se alimentar e então mudaram o comportamento pela presença da toxina *CryIA(b)*. Foi observado que a alteração nutricional das folhas, mesmo em níveis diferenciados, foi suficiente para que a ingestão de alimento fosse interrompida.

Após quatro dias, as larvas dos tratamentos controle foram encontradas juntas, se alimentando do mesmo pedaço de folha, inclusive em situações onde havia contaminação por fungos ou liberação de compostos fenólicos (Figura 19A). Estas larvas apresentaram desenvolvimento normal (Figuras 20A e 21A), podendo-se sugerir que, em alguns casos, houve uma troca de ínstar pela presença de cápsulas encefálicas. Larvas que se alimentaram de SP80-1842 e SP80-3280 nos tratamentos controles apresentaram uma taxa de mortalidade de 5.4%, (Tabela 3).

Nos tratamentos com folhas transgênicas, verificou-se pequeno desenvolvimento das larvas, com aumento rápido da mortalidade (Figura 20B e Tabela

3) já na segunda avaliação. As larvas que ainda estavam vivas, encontravam-se espalhadas por toda a parcela, raramente sobre as folhas, com coloração alterada e ausência quase total de movimentos. Após sete dias, a mortalidade de larvas observada nas plantas transgênicas ficou entre 92-100%, confirmando que a proteína *CryIA(b)* de *Bt* é eficiente para o controle da broca da cana-de-açúcar em condições de laboratório (Tabela 3 e Figura 18).

DATTA et al. (1998) transformaram arroz com uma construção do gene *CryIA(b)* com os promotores de PEPC e de tecido condutor (“pith”) de milho. Cerca de 10% das plantas que se mostraram positivas através de Southern Blot tiveram 100% de mortalidade de larvas de broca amarela do colmo (“YSB”; *Scirpophaga incertulas*). Algumas plantas levaram a uma taxa de mortalidade de brocas entre 70-90%. Nos controles, a mortalidade encontrada foi de 10-40%. O presente trabalho com cana confirma os resultados obtidos em outras culturas, onde o gene *CryIA(b)* mostrou-se eficiente para o controle da broca da cana-de-açúcar, com uma taxa de mortalidade de 92-100% encontrada nos bioensaios (Tabela 3).

Figura 18 - Evolução da mortalidade das brocas nos bioensaios. Cada barra corresponde à média da porcentagem de brocas mortas em 24 repetições, com intervalo de 2 dias entre as avaliações.

Figura 19 - Seções de folhas utilizadas nos bioensaios. **A:** extensa área de raspagem na folha controle (seta), onde as brocas permaneceram juntas, se alimentando, mesmo na presença de fungos (regiões avermelhadas) **B:** pequenas mordidas em folha transgênica (seta), observadas após dois dias de infestação com brocas neonatas.

Figura 20 - Larvas de *Diatraea saccharalis* após bioensaios. **A:** a larva maior alimentou-se de folhas da planta controle SP80-1842. As mortas foram alimentadas com folhas transgênicas. **B:** a larva de coloração mais escura alimentou-se de folha transgênica.

Figura 21 - Brocas após quatro dias nos bioensaios. **A:** as brocas colocadas nos tratamentos controles se desenvolveram e ficaram ativas mesmo quando as folhas estavam secas, com a qualidade nutricional alterada. **B:** as brocas que se alimentaram de folhas transgênicas morreram rapidamente. Em tratamentos onde a mortalidade não foi 100%, as brocas afetadas pelos efeitos da toxina e ainda vivas não eram encontradas sobre as folhas.

Tabela 3 - ^a Plantas 7, 53 e 99 são eventos de transformação com a variedade SP80-1842; plantas 219, 228 e 106 são eventos com a variedade SP80-3280. ^b Número de repetições de cada planta, com 10 larvas inoculadas por tratamento. ^c Média da mortalidade corrigida para 24 repetições, calculada pela fórmula:

$$MC = \frac{(MT - MCtrl) \times 100}{(100 - MCtrl)}$$

(MC: mortalidade corrigida; MT: mortalidade nas plantas transgênicas; MCtrl: mortalidade nas plantas controle).

Planta ^a	N ^b	Média (%) ^c
SP80-1842 ctrl.	24	5.4
7	24	94.6
53	24	99.6
99	24	99.2
SP80-3280 ctrl.	24	5.4
219	24	97.9
228	24	92
106	24	100

O trabalho de KOZIEL et al. (1993) relata os resultados de bioensaios com a broca européia do milho (“ECB”; *Ostrinia nubilalis*), quando foi encontrada uma alta mortalidade após 48 horas, com algumas plantas causando a morte de 100% das larvas. Este mesmo grupo de pesquisadores encontrou uma boa correlação entre mortalidade e expressão da proteína *CryIA(b)* detectada pela técnica de ELISA. No trabalho com cana, também foi possível verificar esta correlação. Apenas 6 das plantas transgênicas avaliadas por técnicas moleculares, foram utilizadas nos bioensaios. A planta 228 foi a que apresentou uma taxa menor de mortalidade (92%) dentre as que foram utilizadas neste experimento. Esta planta, quando avaliada para expressão da proteína através do ELISA, não apresentou expressão da toxina em colmo, bainha de folha e casca, além de não ter apresentado uma expressão tão alta em folha, se comparada a outras plantas. Por outro lado, a planta 53, com taxa de mortalidade de 99,6% nos bioensaios, também não apresentou expressão em colmo, bainha de folha e casca, mas teve uma alta expressão da proteína em folha. Portanto, pode-se inferir que, mesmo folha não sendo o alimento preferencial das brocas em condições de campo, os resultados dos bioensaios são uma prévia dos níveis de expressão da proteína encontrados através do método ELISA.

Encontramos correlação entre os níveis de toxina nas folhas e a mortalidade de brocas, mesmo quando a toxina não foi detectada nos outros tecidos avaliados (bainha, casca e colmo). É o caso das duas plantas citadas anteriormente, a 228 e a 53. Nos bioensaios observamos que, em dois dias, os efeitos da toxina são visíveis, mesmo que a quantidade ingerida de folha transgênica tenha sido pequena. Uma indicação de que os resultados dos bioensaios são confiáveis, são as avaliações do material que foi plantado no campo, como será discutido adiante.

4.3. Avaliações de campo

4.3.1. Intensidade de infestação de brocas

Uma primeira avaliação dos danos causados pela infestação por brocas no campo mostrou o controle obtido pela introdução do gene *Bt* nas duas variedades de

cana-de-açúcar estudadas neste trabalho (Tabela 4). Entretanto, esta coleta de colmos, aos 10 meses de idade, realizada sem repetições, torna a confiabilidade dos dados obtidos questionável, necessitando portanto uma segunda avaliação. Mesmo assim, esta avaliação preliminar mostrou um controle eficiente da infestação por broca realizado pela expressão da toxina *CryIA(b)* nas plantas (Figura 22). Todas as plantas transgênicas da variedade SP80-1842 não apresentaram qualquer dano causado pela praga, enquanto que na planta controle verificou-se uma intensidade de infestação (I.I.) de 10,7%. A maioria das plantas originadas da variedade SP80-3280 também não apresentaram danos, com exceção das plantas 106, 219 e 228, que apresentaram 2,7; 4,7 e 11,1% de I.I., respectivamente. Entretanto, este resultado também confirmou a eficiência do controle através da transformação com o gene *Bt*, uma vez que na variedade controle SP80-3280 a I.I. ficou em 16,1% (acima dos resultados obtidos com as plantas que apresentaram algum dano).

Figura 22 – A eficiência do controle realizado pela introdução do gene *Bt* em cana é mostrada pela ausência de danos nos colmos da planta transgênica (planta 7). A variedade original SP80-1842 apresenta intensidade de infestação alta, com a maior parte dos entrenós brocados, além da presença de fungos oportunistas. Estas plantas foram avaliadas no campo após infestação artificial com brocas neonatas.

Tabela 4 – Intensidade de infestação (I.I.%) nos experimentos de campo, após inoculação artificial de larvas de *Diatraea saccharalis* na região do “dewlap”. Foram realizadas duas amostragens, a primeira após 10 meses do plantio (sem repetições) e a segunda após 22 meses (média de 4 repetições). Algumas plantas não foram avaliadas aos 22 meses de idade (na).

Plantas	I.I.% Avaliação 1 (10 meses)	I.I.% Avaliação 2 (22 meses)
SP80-1842	10,7	8,4
7	0	0
41	0	0
53	0	0
68	0	na
99	0	0
157	0	0
SP80-3280	16,1	12,7
106	2,7	na
107	0	0
219	4,7	3,1
220	0	0
228	11,1	7,8
239	0	0
241	0	na
242	0	na

Parece que o comportamento das brocas inoculadas artificialmente na inserção da folha com a bainha foi importante para o controle eficiente da praga. Embora esta observação não tenha sido feita no local, acredita-se que as larvas tenham alimentado-se de tecidos de folha, com alta expressão da toxina, antes de descerem pela bainha em direção ao colmo, onde os maiores danos são encontrados em plantas não transgênicas. Este comportamento teria sido suficiente para a ingestão da toxina, provocando a morte das brocas antes que estas perfurassem os colmos. Acredita-se que, em ensaios de campo, a toxina tenha a mesma ação rápida encontrada nos bioensaios.

A primeira quantificação por ELISA com este mesmo material mostrou que as plantas originadas da SP80-3280, que apresentaram 100% de controle sobre as brocas (ou seja, 0% de I.I.), tiveram a toxina *CryIA(b)* expressa em todos os tecidos avaliados, embora em concentrações bastante variadas. Já as plantas que apresentaram danos, mostraram expressão da toxina apenas em folha (plantas 219 e 228) ou em casca e bainha de folha (planta 106), sem apresentar expressão nos outros tecidos (Tabela 1).

KOZIEL et al. (1993) realizaram um estudo semelhante no campo, avaliando a intensidade de infestação e formação de galerias nos colmos de milho transgênico resistente a broca européia (ECB). Neste estudo, os eventos continham uma construção do promotor 35S com um gene sintético que codifica a toxina *CryIA(b)*, e outros eventos foram obtidos, contendo duas construções do mesmo gene sintético, mas dirigido por promotores tecido-específicos distintos (PEPC e pólen). Os resultados mostraram que as plantas co-transformadas com as construções dirigidas pelos promotores tecido-específicos apresentaram maior resistência ao ataque das brocas do que aquelas transformadas com o gene dirigido pelo promotor 35S. Os resultados foram bem próximos dos apresentados para as variedades de cana-de-açúcar transformadas na Copersucar, nas quais construções do gene *Bt* com os promotores PEPC e “pith” mostraram-se efetivas no controle de *D. saccharalis*, com boa expressão da toxina na maioria dos transformantes analisados.

Como mencionado no início desta discussão, foi necessária uma segunda avaliação da intensidade de infestação e da expressão da toxina, realizada quando as plantas estavam há 22 meses no campo. Esta foi mais criteriosa quanto à coleta do material com 4 repetições, provenientes de touceiras diferentes na linha de 6 metros. Foram avaliadas as plantas escolhidas para ensaios posteriores, tendo como base todos os estudos feitos até a realização da segunda coleta de material no campo. Procurou-se escolher eventos distintos de transformação, com os fenótipos mais semelhantes aos das suas respectivas variedades originais, com a mesma performance com relação às características de interesse agrônomo, exibindo um menor número de cópias dos genes introduzidos e uma melhor expressão da toxina *CryIA(b)* nos tecidos amostrados. Estes critérios fizeram com que as plantas 68, 106, 241 e 242 não fossem coletadas para a

segunda avaliação, nem multiplicadas para os novos ensaios aprovados pela CTNBio, que substituíram o primeiro ensaio no campo.

Os resultados de I.I.% na segunda avaliação são bem próximos daqueles encontrados nas plantas com 10 meses de idade. Esperava-se uma diminuição dos danos causados pelas brocas (Tabela 4), uma vez que a infestação artificial foi suspensa após a primeira avaliação, a área de plantio não era naturalmente infestada e o número de entrenós avaliados era maior, pela idade das plantas. Os resultados do ELISA realizado com este material (Tabela 3) mostraram, mais uma vez, que as plantas originadas da SP80-1842 expressaram a toxina *CryIA(b)* em todos os tecidos avaliados, com exceção da planta 53, que apresentou expressão apenas em folha. Confirmando os resultados de I.I.% da primeira avaliação, todas as plantas desta variedade não apresentaram dano algum em seus colmos, caracterizando a eficiência do controle conferido pela introdução do gene *Bt*.

As plantas originadas da SP80-3280 tiveram, na segunda avaliação, resultados de I.I.% compatíveis com aqueles encontrados nas canas com 10 meses. A diferença que mais chamou a atenção foi a quantificação de expressão da toxina nas folhas da planta 107, já que no primeiro ELISA este tecido não teve expressão detectável. Este tipo de resultado, e mesmo a ausência de expressão da toxina na folha da planta 106, avaliada na primeira coleta de material, pode ser um problema de mosaicismo dentro de um mesmo evento de transformação (o Southern Blot mostrou que as plantas 106 e 107 representam um evento e são, portanto, originárias da mesma célula transformada). Explica-se, portanto, o fato da planta 107 não apresentar danos por brocas, já que a mesma possui boa expressão da toxina em todos os tecidos avaliados. Supõe-se que, no caso das plantas originadas da SP80-3280, a expressão apenas em folha não tenha sido suficiente para controlar totalmente o ataque do inseto, o que pôde ser observado nas plantas 219 e 228. Nos resultados dos bioensaios, a planta 228 apresentou a menor taxa de mortalidade das brocas, além de uma morte mais lenta do que a encontrada nos ensaios com as outras plantas avaliadas em laboratório. A maior susceptibilidade desta planta ao ataque de brocas foi comprovada nos ensaios de campo, que mostraram uma

I.I. de 11,1% aos 10 meses de idade e 7,8% aos 22 meses, mesmo com a toxina sendo expressa em folhas.

Em um trabalho de transformação de arroz com uma construção dirigida pelo promotor Actina-1 e a fusão de dois genes *Bt*, codificando as toxinas *CryIA(b)* e *CryIA(c)*, verificou-se a eficiência no controle de gafanhotos e broca amarela do colmo (YSB) em arroz. Foram feitas avaliações de campo sob infestação natural e artificial de plantas transgênicas de uma linhagem homozigota e um híbrido originado dela, mostrando que a proteção contra os danos causados pelos insetos foi efetiva e a característica introduzida foi transferida para o híbrido, sem que este mostrasse redução na produtividade, o que torna a tecnologia bastante interessante como forma de controle de pragas em arroz (TU et al., 2000). Em cana-de-açúcar, os resultados de campo também mostraram a eficiência do gene *Bt* no controle da broca, muito embora ainda não tenham sido feitos cruzamentos para verificar se este transgene ocorre na progênie e de que forma isso acontece. No trabalho de KOZIEL et al. (1993), cruzamentos de eventos transformantes de milho com plantas não transformadas apresentaram uma razão de segregação de 1:1 para a resistência a fosfinotricina, expressão da toxina *CryIA(b)* e resistência a ECB. Todos esses dados comprovam a eficiência de genes *Bt* para o controle de insetos em plantas cultivadas em larga escala, mas as avaliações no campo devem ser realizadas também nas progênies, originadas dos cruzamentos dessas plantas com outras que não tenham sofrido transformação.

4.3.2. Características quantitativas

Plantas transgênicas devem apresentar um fenótipo equivalente ao observado nas plantas originais, principalmente no que se refere às características de interesse agrônomo. TU et al. (2000) citam trabalhos realizados com arroz onde a produtividade nas plantas transgênicas foi menor, limitando o valor comercial das mesmas. Nesta mesma publicação, os autores apresentaram resultados mais recentes que contrapõem-se a isso, mostrando que a introdução de uma fusão de genes *Bt* em arroz foi eficaz no

controle de pragas, sem que houvesse redução na produtividade dos híbridos contendo estes genes.

Quando foi realizada a primeira coleta de dados de infestação por brocas e material para os ensaios ELISA, também foram avaliadas características morfológicas e quantitativas das plantas transformadas com o gene *Bt* (dados não apresentados). Estas observações foram feitas sem repetições, apenas com o objetivo de verificar se tais características estavam sendo mantidas após a integração dos genes exógenos nas plantas transformadas, quando comparadas à performance e ao fenótipo esperados nas variedades originais.

Observações morfológicas das plantas não mostraram diferença entre as transgênicas e suas respectivas variedades originais (Tabela 5). Em relação às características agrônômicas, os colmos das plantas transformadas receberam notas de diâmetro mais altas do que as variedades originais, significando um afinamento dos mesmos. Por outro lado, as plantas originadas da variedade SP80-1842 apresentaram maior número de perfilhos, enquanto que as originadas da SP80-3280 tiveram este número reduzido. As duas características resultaram numa diminuição do peso de 10 colmos em todas as plantas transformadas, quando comparadas às originais. É comum observar estas mudanças em laboratórios de micropropagação de cana-de-açúcar. Atribui-se este efeito epigenético à cultura de tecidos, e o mesmo tende a desaparecer após 2 ou 3 ciclos de plantio.

Os resultados de PCC (pol%cana), fibra, pureza, brix e açúcares redutores variaram bastante entre as plantas transgênicas, assim como entre elas e suas variedades originais, sem que fosse observada qualquer alteração drástica na performance das plantas expressando o gene *Bt*. Os dados não serão apresentados pois são insuficientes para uma discussão mais abrangente sobre possíveis alterações nas características de interesse comercial, mas sugerem a inexistência de efeitos deletérios como consequência da introdução dos transgenes.

Tabela 5 – Resultados preliminares obtidos nos estudos de campo, após 10 meses de plantio. A nota de diâmetro tem escala de 1 (colmos mais grossos) a 9 (colmos mais finos). Com relação à morfologia, todas as plantas transgênicas não apresentaram diferenças significativas (N) com relação às variedades originais (O).

	Altura	Nota de	Número de	Peso	
Planta	(m)	Diâmetro	Perfilhos	10 colmos (Kg)	Morfologia
7	3,35	4	87	17,5	N
41	3,25	5	80	12,5	N
53	3,2	6	127	12	N
68	3,2	5	98	16,5	N
157	3,3	5	75	16,6	N
99	2,9	6	87	9,5	N
1842	3,3	4	73	18,9	O
219	2,5	5	100	9,5	N
220	2	5	69	8,5	N
228	2,6	5	80	14,5	N
239	2,9	6	60	10,7	N
241	2,5	6	37	9	N
242	2,9	5	54	14,2	N
106	3	6	52	11,2	N
107	3,1	6	57	11,5	N
3280	2,9	3	84	17,2	O

5. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos resultados e observações apresentados neste trabalho, nas condições em que o mesmo foi desenvolvido, permite as seguintes conclusões:

Foram obtidas plantas transgênicas de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar (SP801842 e SP80-3280) a partir do bombardeamento com os genes *Bt* (que codifica a toxina *CryIA(b)* e confere resistência à *Diatraea saccharalis*) e *neo* (marcador que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II e confere resistência aos antibióticos geneticina e canamicina).

A caracterização molecular, utilizando as técnicas de PCR, Southern Blot e ELISA, mostrou que as 14 plantas avaliadas tiveram os dois genes integrados no seu genoma, embora apresentando variações com relação ao número de cópias de cada gene e à expressão da toxina em diferentes tecidos (folha, bainha, colmo e casca). Foram identificados 6 eventos de transformação distintos para cada uma das variedades originais, comprovando também a eficiência da metodologia de co-transformação em cana-de-açúcar.

Não foi possível determinar com exatidão qual dos dois promotores utilizados nas construções do gene *Bt* (PEPC e “pith”) foi mais eficiente em dirigir uma melhor expressão da toxina. Os resultados sugerem que o promotor PEPC de milho, específico de tecidos verdes, seja mais eficiente. Entretanto, são necessários estudos comparativos mais detalhados para que isso seja comprovado.

Todas as plantas analisadas através de bioensaios apresentaram fenótipo resistente à inoculação de brocas neonatas em condições de laboratório, com taxas de mortalidade variando de 92 a 100% após 7 dias. O comportamento alimentar das brocas foi alterado em função da expressão da toxina nas folhas transgênicas.

Todas as plantas avaliadas no campo, infestadas artificialmente com brocas neonatas, mostraram-se resistentes ao ataque das mesmas. A maioria não apresentou qualquer dano nos colmos, com exceção de 3 plantas originárias da variedade SP80-3280, que apresentaram danos, porém menores do que os verificados no controle.

A toxina *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* mostrou-se eficiente para o controle da broca da cana-de-açúcar em plantas transformadas, o que justifica a continuidade dos trabalhos utilizando o gene *Bt*, visando a liberação comercial de variedades transgênicas contendo a característica de resistência a insetos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v.177, p.6027-6032, 1995.

ALMEIDA, L.C. de; ARRIGONI, E.D.B.; RODRIGUES FILHO, J.P. Modelo de análise econômica para avaliação do controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. In: SEMINÁRIO COPERSUCAR DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 7., Piracicaba, 1997. **Anais**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1997. p.95-104.

ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, v.268, p.1894-1896, 1995.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M-T.; YU, S-M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v.7, p.213-222, 1998.

ARENCIBIA, A.; CARMONA, E.; CORNIDE, M.T.; WANG, G.; CASTIGLIONE, S.; CUZZONI, E.; ORAMAS, P.; SALA, F. Genomic polymorphism analysis of transgenic insect-resistant sugarcane plants. In: PATHOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, KwaZulu-Natal, 1997. **Abstracts**. KwaZulu-Natal: SASAExS, 1997. p.21.

- ARRIGONI, E.D.B. **Perdas agrícolas e industriais causadas pela broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae).** Piracicaba: CTC, 2000. 19p. (Relatório Técnico Copersucar)
- BARTON, K.A.; WHITELEY, H.R.; YANG, N-S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v.85, p.1103-1109, 1987.
- BIRCH, R.G. New gene technologies and their potential value for sugarcane. **Outlook on Agriculture**, v.25, n.4, p.219-226, 1996.
- BIRCH, R.G.; BOWER, R.; ELLIOTT, A.; POTIER, B.; FRANKS, T.; CORDEIRO, G. Expression of foreign genes in sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 12., Cali, 1995. **Proceedings**. Cali: Tecnicãna, 1996. v.2, p.368-373.
- BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v.2, p.409-416, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAVO, A.; JANSENS, S.; PEFFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.237-246, 1992.
- BRUNKE, K.J.; MEEUSEN, R.L. Insect control with genetically engineered crops. **Trends in Biotechnology**, v.9, p.197-200, 1991.

CARVALHO, L.C.C. Perspectivas da cultura de cana-de-açúcar para a década de noventa. In: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA, E.A.M. de (Ed.) **Produção de cana de açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.1-17.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. **Relatório anual 1996/97**. Piracicaba: CTC, 1997. 76p. (Relatório Anual Copersucar)

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. **Relatório anual 1998/99**. Piracicaba, 1999. 80p. (Relatório Annual Copersucar)

CHENG, J.; BOLYARD, M.G.; SAXENA, R.C.; STICKLEN, M.B. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Plant Science**, v.81, p.83-91, 1992.

CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I.K. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports**, v.11, p.494-498, 1992.

DA SILVA, J.A.G. A methodology for genome mapping of autopolyploids and its application to sugarcane (*Saccharum* spp). Ithaca, 1993. 108p. Thesis (Ph.D.) - Cornell University.

DATTA, K.; VASQUEZ, A.; TU, J.; TORRIZO, L.; ALAM, M.F.; OLIVA, N.; ABRIGO, E.; KHUSH, G.S.; DATTA, S.K. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *CryIA(b)* gene in transgenic rice conferring resistance to rice insect pests. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.20-30, 1998.

- DOGAN, E.B.; BERRY, R.E.; REED, G.L.; ROSSIGNOL, P.A. Biological parameters of convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on aphids (Homoptera: Aphididae) on transgenic potato. **Journal of Economic Entomology**, v.89, p.1105-1108, 1996.
- ELLIOT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTELL, R.I.S.; GROF, C.P.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.25, p.739-743, 1998.
- 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.
- FALCO, M.C. Transformação de cana-de-açúcar para resistência ao herbicida glufosinato de amônio, via biolística. Piracicaba, 1998. 129p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ USP.
- FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1188-1194, 2000.
- FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W.; McMULLEN, M.D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, v.11, p.323-328, 1992.
- 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.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v.5, p.807-813, 1987.

- FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.19, n.3, p.227-276, 1999.
- FUCHS, R.L.; REAM, J.E.; HAMMOND, B.G.; NAYLOR, M.W.; LEIMGRUBER, R.M.; BERBERICH, S.A. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (nptII) protein. **Biotechnology**, v.11, p.1543-1547, 1993.
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, v.11, p.1151-1155, 1993.
- GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Effects of tissue type and promoter strength on transiente GUS expression in sugarcane following particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.12, p.666-670, 1993.
- GAMBLEY, R.L.; FORD, R.; SMITH, G.R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing beta glucuronidase. **Plant Cell Reports**, v.12, p.343-346, 1993.
- GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.615-636, 1992.
- GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **BioScience**, v.38, n.1, p.26-33, 1988.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.701-726, 1998.

GOULD, F. Testing *Bt* refuge strategies in the field. **Nature Biotechnology**, v.18, p.266-267, 2000.

GRAZIANO, X. **Transgênicos: o poder da tecnologia**. Brasília: Instituto Teotônio Vilela, 2000. 19p.

HANSEN, G.; WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, v.4, n.6, p.226-231, 1999.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v.53, p.242-255, 1989.

IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. The development of genetic transformation of sugarcane in Texas. **Sugar Journal**, v.6, p.25-29, 1997.

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, K.; 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*. **Biotechnology**, v.11, p.194-200, 1993.

LE MOS, M.V.F. **Novas tecnologias: controle biológico por *Bacillus thuringiensis***. <http://www.biotechnologia.com.br/hp5.htm> (04/02/2000)

LOSEY, J.E.; RAYOR, L.S.; CARTER, M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, v.399, p.214, 1999.

MAAGD, R.A. de; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, n.1, p.9-13, 1999.

MACHADO JÚNIOR, G.R. Melhoria da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. (Coord.) **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.1, p.165-186.

McCOUCH, S.R.; KOCHERT, G.; YU, Z.H.; WANG, Z.Y.; KUSH, G.S.; COFFMAN, W.R.; TANKSLEY, S.D. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.815-829, 1988.

McGAUGHEY, W.H.; WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, v.258, p.1451-1455, 1992.

McGAUGHEY, W.H.; GOULD, F.; GELERNTER, W. *Bt* resistance management. **Nature Biotechnology**, v.16, p.144-146, 1998.

MENDONÇA, A.F.; MORENO, J.A.; RISCO, S.H.; ROCHA, I.C.B. As brocas da cana-de-açúcar. In: MENDONÇA, A.F. (Ed.) **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos e Cia, 1996. p.51-82.

MONSANTO. Área cultivada com plantas geneticamente modificadas no mundo aumenta 11% em 2000.

<http://www.monsanto.com.br/cgi-bin/noticias/noticia.asp?ID=161> (31/01/2001)

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NOVARTIS. Sandoz seeds receives marketing approval for insect-tolerant corn(maize) in the United States.

<http://www.info.novartis.com/media/releases/sandoz96/aug06.html> (14/06/2000)

NUNES JÚNIOR, M.S.D. Variedades de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. (Coord.) **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.1, p.187-259.

PARRA, J.R.P. Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.M S.; OLIVEIRA, E.A.M. de (Ed.) **Produção de cana de açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.184-197.

PEFEROEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.173-177, 1997.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PETERSEN, L.J.; PARKER, G.B.; McPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVR, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOFF, D.A. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.313-321, 1993.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.99, p.79-85, 2001.

REGISTER III, J.C. Approachs to evaluating the transgenic status of transformed plants. **Trends in Biotechnology**, v:15, p.141-146, 1997.

- 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.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.168-175, 1998.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.210-216, 1999.
- SHELTON, A.M.; ROUSCH, T.M. False reports and the ears of men. **Nature Biotechnology**, v.17, p.832, 1999.
- SHEPHERD, K.M.; SMITH, G.R.; JOYCE, P.A.; NUTT, K.A.; McQUALTER, R.B.; McGHIE, T.K.; ALLSOPP, P.G. Engineering canegrub-tolerant transgenic sugarcane. In: PATHOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOP, KwaZulu-Natal, 1997. **Abstracts**. KwaZulu-Natal: SASAExS, 1997. p.16.
- SILVA FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta-inseto. **Biotecnologia**, v.12, p.38-42, 2000.
- STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROTT, W.A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) gene. **Plant Physiology**, v.112, p.121-129, 1996b.

- STUPIELLO, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S.B. (Coord.) **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.2, p.187-259.
- SUN, S.S.M.; MARETZKI, A.; NAGAI, C.; HOUTCHENS, K.; BIDNEY, D. Transformation of *Saccharum spontaneum* by particle bombardment. **Sugarcane**, p.1-7, 1993.
- TAYLOR, M.G.; VASIL, V.; VASIL, I.K. Enhanced GUS gene expression in cereal/grass cell suspensions and immature embryos using the maize ubiquitin-based plasmid pAHC25. **Plant Cell Reports**, v.12, n.9, p.491-495, 1993.
- TU, J.; ZHANG, G.; DATTA, K.; XU, C.; HE, Y.; ZHANG, Q.; KHUSH, G.S.; DATTA, S.K. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1101-1104, 2000.
- ULIAN, E.C.; BRAGA, D.P.V. Transformação genética de cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO COPERSUCAR DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 7., Piracicaba, 1997. **Anais**. Piracicaba: CTC, 1997. p.29-36.
- ULIAN, E.C.; BRAGA, D.P.V.; BAERSON, S.; LAVRIK, P.B. Transgenic sugarcane plants for RoundupTM tolerance obtained through microprojectile bombardment. In: PLANT AND ANIMAL GENOME, 8., San Diego, 2000. **Abstracts**. San Diego: NCGR, 2000. p.205.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v.328, p.33-37, 1987.

VAN DER SALM, T.; BOSCH, D.; HONÉE, G.; FENG, L.; MUNSTERMAN, E.; BAKKER, P.; STIEKEMA, W.J.; VISSER, B. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* *cryIA(b)* and *cryIC* genes: a resistance management strategy. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.51-59, 1994.

WRAIGHT, C.L.; ZANGERL, A.R.; CARROLL, M.J.; BEREMBAUM, M.R. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.97, p.7700-7703, 2000.