

PRODUÇÃO DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO PARA RESISTÊNCIA A INSETOS: ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS À TECNOLOGIA BT

Silva, M. R.¹; Ceccon, C.²; Didoné, D. A.³; Teixeira, T.⁴; Grando, M. F.⁵

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância no cenário mundial, por ser uma fonte rica em carboidratos, proteínas e óleo, servindo de alimento para humanos e animais. Um dos principais fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção desta cultura é a incidência de pragas.

A principal medida de manejo dos insetos pragas tem sido o controle químico, entretanto a utilização incorreta deste método pode ocasionar problemas ambientais e à saúde humana. Para resolver estas limitações, dentre outras táticas utilizadas para o controle de pragas está o uso de plantas geneticamente modificadas. No Brasil, híbridos de milho geneticamente modificados, foram inicialmente aprovadas para uso comercial em 2007, e a cada ano sua utilização tem aumentado, chegando na safra 2015/2016 a 15,7 milhões de hectares cultivados, representando, cerca de 88,4% da área total plantada (CÉLERES, 2016). Atualmente, no Brasil existem liberados comercialmente 26 eventos de milho geneticamente modificado que apresentam na sua composição proteínas para o controle de insetos-praga (CTNBio 2017).

Os genes *cry* utilizados para conferir esta característica são de *B. thuringiensis* (Bt), que confere alta resistência a algumas espécies de lepidópteros e coleópteros praga (ARMSTRONG et al., 1995). Entretanto, segundo Mcgauhey e Whalon (1992), a expressão contínua de genes *cry* em plantas transgênicas, exerce forte seleção para o surgimento de resistência em populações de pragas. Essa evolução da resistência em insetos-alvo pode reduzir os benefícios econômicos e ambientais dos cultivos transgênicos à base de Bt (FARIAS et al., 2013), o que já foi verificado em alguns estados como Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, onde as primeiras tecnologias liberadas comercialmente estão apresentando baixa porcentagem de controle (CZEPAK et al., 2013), necessitando de programas de pulverizações de inseticidas de modo semelhante aos híbridos convencionais.

Assim, há necessidade de outros genes e outras alternativas de controle de insetos para prevenir ou retardar a seleção de indivíduos resistentes.

Alternativa 1: genes derivados da Urease

A urease é uma proteína naturalmente produzida por algumas plantas. Quando ingerida pelos insetos essa proteína libera peptídeos entomotóxicos causando a morte de alguns tipos de lagartas, percevejos e bruqueideos, podendo também ter efeito fungicida. Desta forma, as ureases vegetais com propriedades inseticidas podem ser utilizadas na produção de transgênicos para a obtenção de plantas resistentes a insetos (CARLINI & POLACCO, 2008) para somar estratégias para controle de lagartas insetos da ordem Lepidoptera,

¹ Engenheira Agrônoma Dra. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

² Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

³ Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁴ Biólogo, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁵ Bióloga, Ph. D., Professora e Pesquisadora do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

ou como uma estratégia adicional para resistência a outros tipos de insetos (bruqueídeos e percevejos) que não são afetados pela toxina Bt.

Os genes responsáveis pela produção de dois peptídeos entomotóxicos Jaburetox-V5 e Jaburetox-Del da urease vegetal foram isolados do feijão-deporco (*Canavalia ensiformis*) pela equipe da Dra. Celia Carlini (Centro de Biotecnologia da UFRGS). As construções gênicas, ou seja, plasmídeos contendo estes genes de interesse foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (LBMV-UFRGS) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Alternativa 2 - RNAi para silenciamento de genes de insetos

A tecnologia do RNA de interferência (RNAi) é uma ferramenta nova para o silenciamento de genes ao nível pós-transcricional, através da expressão de RNAs dupla-fita (RNAdf). Quando detectado na célula, o mecanismo de defesa celular assume que estes RNAdf são de origem viral e passa a destruí-los; o mecanismo irá também destruir qualquer RNAm que apresenta a mesma sequência de nucleotídeos complementares ao RNAdf. A exploração desta via para bloquear a expressão de genes alvos específicos é uma promessa considerável para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo integrado de pragas (PRICE & GATEHOUSE, 2008). Quando o inseto que apresenta a sequência complementar se alimenta da planta transgênica, acaba ingerindo o RNAdf. Estes são então transportados para o citoplasma das células do inseto e silenciam a expressão de genes que apresentam a sequência complementar ao RNAdf. Se estes genes produzem proteínas que são essenciais para sobrevivência do inseto, este processo de silenciamento de gene pode causar mortalidade e interferir no desenvolvimento do inseto.

Para que uma estratégia baseada em RNAi inseticida seja eficaz deve ter como alvo um gene necessário para um processo vital dos insetos. A especificidade genética do RNAi deve permitir abordagens ecologicamente corretas para o controle de pragas, além de ser uma estratégia contra uma única praga ou grupo de espécies relacionadas. Dessa forma não irá afetar outros grupos de insetos como é o caso de insetos benéficos (WHYARD et al., 2009). A avaliação de genes alvo e clonagem destes em plasmídeos foi executada no Horticultural Research Laboratory, USDA.

Desta forma, a utilização destas alternativas biotecnológicas a tecnologia bt no desenvolvimento de plantas transgênicas de milho resistentes a insetos vem contribuir como estratégia a ser utilizado no Manejo Integrado de pragas de milho.

A introdução desses genes no milho está sendo realizada pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF (CQB: 0272/08). O método de transferência de genes é via *Agrobacterium tumefaciens* seguindo protocolo de Frame et al. (2011) conforme figura 1. Este processo de transferência de genes envolve (1) o crescimento de bactérias já engenheiradas com os genes de interesse com explantes (tecidos alvos) embriões imaturos de genótipos de milho, (2) co-cultivo de bactérias e embriões em condições ambientais

¹ Engenheira Agrônoma Dra. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

² Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

³ Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁴ Biólogo, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁵ Bióloga, Ph. D., Professora e Pesquisadora do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

específicas, (3) seleção de calos embriogênicos tolerantes ao agente seletivo, (4) regeneração de plantas transgênicas *in vitro*, (5) avaliação das plantas obtidas para detecção e expressão dos genes inseridos pelo emprego de técnicas moleculares (PCR, RT-PCR, q PCR e Southernblot) e (6) bem como bioensaios e ensaios em casa de vegetação para estudo da resistência das plantas transgênicas a diferentes insetos pragas.

A utilização de estratégias alternativas às utilizadas atualmente pode contribuir eficiência de controle de insetos pragas de milho, além de aumentar a durabilidade destas tecnologias reduzindo a pressão de seleção visando uma sustentabilidade da agricultura.



Figura 1. Processo de introdução de genes em embriões imaturos de milho pelo método *A. tumefaciens* a fim de obtenção de plantas geneticamente modificada. Fotos: Laboratório de Biotecnologia Vegetal-UPF.

ARMSTRONG, C.L.; PARKER, G.B.; PERSHING, J.C.; BROWN, S.M.; SANDERS, P.R.; DUNCAN, D.R.; STONE, T.; DEAN, D.A.; De BOER, D.L.; HART, J.; HOWE, A.R.; MORRISH, F.M.; PAJEAU, M.E.; PETERSEN, W.L.; REICH, B.J.; RODRIGUEZ, R.; SANTINO, C.G.; SATO, S.J.; SCHULER, W.; SIMS, S.R.; STEHLING, S.; TAROCHIONE, L.J.; FROMM, M.E. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Science*, Madison, v.35, p.550-557, 1995.

CARLINI, C. R.; POLACCO, J. C. Toxic properties of urease. *Crop Science*, 48: 1665– 1672, 2008.

CÉLERES. Informativo biotecnologia 2o acompanhamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2013/14. Disponível em: < <http://celeres.com.br/post.php?p=184&lang=pt> >. Acesso em 28/abril. 2017.

CTNBio. Comissão técnica nacional de biossegurança. Tabela resumo – Plantas aprovadas, 2017. Disponível em http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/-/document_library_display Acesso em: 17 abril 2017.

¹ Engenheira Agrônoma Dra. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

² Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

³ Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁴ Biólogo, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁵ Bióloga, Ph. D., Professora e Pesquisadora do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

CZEPAK, C.; VIVAN, L.M.; ALBERNAZ, K.C. Praga da vez. Revista Cultivar, Pelotas, ano XV, n. 167, p. 20-27, 2013.

FARIAS, J.R.; COSTA, E.C.; GUEDES, J.V.C.; ARBAGE, A.P.; B. NETO, A.; BIGOLIN, M.; PINTO, F.F. Managing the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, and corn earworm, *Helicoverpa zea*, using Bt corn and insecticide treatments. Journal of Insect Science, Oxford, v.13, p.1-10, 2013.

FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, A.; YEUNG, E. C. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 710, p. 327-341, 2011.

MCGAUGHEY, W. H., WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science, New York, v. 258, p.1451-1555. 1992.

PRICE, D. R., GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. Trends Biotechnol. v.26, p.393-400. 2008.

WHYARD, S., SINGH, A. D., WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. v.39, p.824-832. 2009.

¹ Engenheira Agrônoma Dra. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

² Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

³ Bióloga, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁴ Biólogo, Me, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

⁵ Bióloga, Ph. D., Professora e Pesquisadora do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.