

# PLANTAS TRANSGÊNICAS RESISTENTES A INSETOS - PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES

LUIZ ANTONIO BARRETO DE CASTRO<sup>1</sup>

**RESUMO** - Os investimentos realizados para o controle de doenças, pragas e ervas daninhas por métodos químicos em nível mundial evoluiu de 850 milhões de dólares em 1960 para 17,4 bilhões de dólares em 1986. Esta tendência de aumento reduziu-se nos últimos quatro anos para 2,4% ao ano, provavelmente em função de fortes pressões sociais para conservação ambiental. A estes fatores se somarão certamente os métodos modernos de Biologia Molecular que permitem atualmente não só a engenharia genética de microorganismos entomopatogênicos, como a própria produção de plantas transgênicas com estas características. Estas pesquisas são limitadas atualmente por dois fatores principais. O primeiro diz respeito a dificuldades de manipulação de leguminosas e gramíneas em nível de cultura de tecidos, transformação e regeneração de plantas. O segundo corresponde a insuficiente disponibilidade de genes provenientes de *B. thuringiensis* que codifiquem para toxinas entomocidas principalmente para Coleopteros. Essas limitações serão analisadas neste trabalho, bem como as perspectivas para superação dessas dificuldades.

Termos para indexação: controle biológico, engenharia genética, biotecnologia.

## TRANSGENIC PLANTS RESISTANT TO INSECTS - LIMITATIONS AND PERSPECTIVES

**ABSTRACT** - The investments on pest, plant diseases and weed control using chemicals, increased from 850 million US\$ dollars in 1960 to 17,4 billion US\$ dollars in 1986. This trend has been reduced in the last four years at the rate of 2,4%/year, probably as a result of the social movements for environment preservation. In addition this trend will also be influenced in the future by modern methods of Molecular Biology which allow the genetic engineering of entomopathogenic microorganisms and the production of transgenic plants with those characteristics. The research on these area are now limited by two main factors: the difficulties in the manipulation of grasses and legumes concerning the tissue culture and the transformation and regeneration of plants; the small availability of genes from *B. thuringiensis* which produce entomocide toxins mainly to Coleoptera. In this study we analyse these limitations as well as the possibilities of overcoming these difficulties.

Index terms: biological control, genetic engineering, biotechnology.

## CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS, PRAGAS E ERVAS DANINHAS

Os investimentos realizados para o controle de doenças, pragas e ervas daninhas por méto-

dos químicos a nível mundial evoluiu de 850 milhões de dólares em 1960 para 17,4 bilhões de dólares em 1986. Este crescimento corresponde a um índice de 4,3% ao ano, (Woodburn 1987 citado por Valk & Koeman 1988). Esta tendência de aumento reduziu-se nos últimos 4 anos para 2,4% ao ano, provavelmente em função de fortes pressões sociais para conservação ambiental, nos países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, a expectativa de aumento do uso de agrotóxicos,

<sup>1</sup> Pesquisador do CENARGEN - Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, e Coordenador do Programa Nacional Pesquisas em Biotecnologia Agropecuária da EMBRAPA, Caixa Postal 102372, CEP 70770, Brasília, DF - Brasil.

de 9,0% ao ano (Barney 1980), não se confirmou. Entretanto países como a Índia e o Brasil aumentaram o uso de agrotóxicos acima da média mundial, enquanto os Estados Unidos, França, Reino Unido e Alemanha diminuíram.

Ainda assim 19 bilhões de dólares serão investidos neste setor em 1990. Deste total, mais de 50% serão dispendidos no Japão, Estados Unidos e França e 20 a 25% constitui a participação dos países em desenvolvimento. (Woodburn 1986a, 1986b citado por Valk & Koeman 1988). Os herbicidas contribuem com 44% dos investimentos globais de agrotóxicos e os inseticidas com pouco mais de 30%. No Brasil os dispêndios com agrotóxicos atingirão cerca de 1 bilhão de dólares em 1990, superado apenas pelos três países citados acima e pela União Soviética. Entre as culturas o maior consumo de inseticidas se observa em algodão, frutas, hortaliças e arroz (Woodburn 1987 citado por Valk & Koeman 1988).

### CONTROLE BIOLÓGICO E ENGENHARIA GENÉTICA COMO ALTERNATIVAS

O primeiro produto alternativo a base de *Bacillus* para o controle biológico de insetos, (*Bacillus popilliae*) foi registrado em 1950. Como a bactéria não cresce a 37 graus e os esporos não germinam ou crescem no solo, os problemas de segurança para o homem e para o meio ambiente foram considerados mínimos. O primeiro *Bacillus thuringiensis* foi registrado em 1960, (Rogoff 1980 citado por Burgues 1981). A bactéria é filogeneticamente próxima do *Bacillus cereus*, que por sua vez tem afinidades bioquímicas com o *Bacillus anthracis*. As possibilidades de contaminação das culturas, mutações, e a potencialidade de contaminação em mamíferos tornaram a liberação do *B. thuringiensis* mais difícil. Superadas estas dificuldades, verificou-se após a liberação dos dois primeiros produtos comerciais, que apesar do efeito entomocida da bactéria ser devida a uma endotoxina ( $Z_0$ ) proteica, algumas estirpes da bactéria também produzem exotoxina  $\beta$  thuringiensina tóxica para mamíferos.

O uso comercial destas estirpes foi proibido, conforme a regulamentação federal dos Estados Unidos (Commerce Clearing House citado per Burgues 1981), e atualmente, dezenas de produtos comerciais a base de *Bacillus thuringiensis* estão liberados para uso em todo o mundo. No Brasil apenas o Dipel está registrado no Ministério da Agricultura. O uso destes agentes de controle biológico é portanto ainda muito restrito em comparação com outros países. A nível mundial, é possível que, além das preocupações ambientalistas, o uso de produtos biológicos alternativos a base de *Bacillus thuringiensis* tenha influído na tendência de redução do uso de inseticidas químicos, cujos investimentos relativos caíram de 40 para 30% nos últimos 30 anos. A estes fatores se somarão certamente os métodos modernos de Biologia Molecular que permitem atualmente não só a engenharia genética de microorganismos, que conferem resistência a insetos em plantas, como a própria produção de plantas transgênicas com estas características.

Esta perspectiva é improvável com relação ao uso de herbicidas. Os investimentos relativos com herbicidas aumentaram de 22 para 43,7% nos últimos trinta anos, e correspondem a 7,6 bilhões de dólares em 1990. A Biotecnologia moderna não reverte e, ao contrário aumentará esta tendência. De cerca de 100 plantas transgênicas que foram liberadas para uso pelo United States Department of Agriculture (USDA) nos últimos três anos, 30% correspondem a plantas resistentes a herbicidas. Estas plantas estimularão o uso de herbicidas. Por outro lado, cerca de 25% das plantas transgênicas liberadas são resistentes a insetos e contribuirão para a redução do uso de inseticidas.

A tendência a utilização de plantas transgênicas resistentes a insetos é estimulada pela crescente resistência de insetos a inseticidas além dos fatores já citados, (Georghiou 1986). O número de espécies de insetos resistentes a inseticidas aumentou de 7 em 1938 para 447 em 1984. Este aumento tem ocorrido para todas as classes de inseticidas, mesmo entre os

mais tóxicos. A classe 2 inclui inseticidas clorados como o DDT e fosforados como o Malathion, que na década de 1950 não apresentava nenhuma espécie de inseto resistente. Atualmente cerca de 120 espécies de insetos tem resistência aos seus efeitos. A genética convencional não produziu resultados tão eficientes para a resistência a insetos em plantas, quanto para a obtenção de plantas resistentes a doenças: fungos bactérias e vírus. Estes fatores estimulam a investigação voltada a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos.

Estas pesquisas eram limitadas no passado por dois fatores principais. O primeiro diz respeito a dificuldades de manipulação de leguminosas e gramíneas a nível de cultura de tecidos, transformação e regeneração de plantas. O segundo corresponde a insuficiente disponibilidade de genes provenientes de *Bacillus thuringiensis* que codifiquem para toxinas entomocidas principalmente para alguns Coleopteros, pragas. Estas dificuldades estão sendo superadas a curto prazo por duas razões. Primeiramente porque apesar dos gastos realizados com inseticidas nos últimos 40 anos, cerca de 13% das perdas agrícolas que ocorrem a nível mundial são devidas a insetos pragas. Em segundo lugar porque os investimentos para pesquisa em Biotecnologia aumentam significativamente nos países desenvolvidos (3.6 bilhões de dólares nos USA, - FY91). O USDA investirá 150 milhões de dólares para pesquisas em Biotecnologia em 1991, (BBEP News 1990).

### PLANTAS TRANSGÊNICAS RESISTENTES A LEPIDOPTEROS - ESTUDO DO CASO Nº 1

A liberação pelo USDA, de uma planta transgênica resistente a lepidoptero, a partir de gene que codifica toxina entomocida proveniente do *Bacillus thuringiensis*, para testes de campo em caráter experimental, data de 1986 (McKeogh 1986). A permissão foi obtida pela ROHM AND HASS COMPANY para fumo.

Desde então já foram liberadas para uso no meio ambiente além de fumo, tomate, algodão e batata. Em todos os casos o método consiste em subclonar em um vetor desarmado de *Agrobacterium tumefaciens* (Ti), gene proveniente do *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, que codifica a delta-endotoxina entomocida, transformar "in vitro" e regenerar a planta de interesse. O gene se insere no DNA cromossomal da planta de forma estável, por mecanismos que são ditados pela bactéria *A. tumefaciens*, e se expressa de forma constitutiva ou tecido específica em maior ou menor quantidade dependendo dos comandos que resultam da ação de promotores utilizados na construção do vetor de transferência e expressão. A liberação de plantas transgênicas com estas características nos Estados Unidos depende de uma avaliação do impacto ambiental previsível (Environmental Assessment) que tais plantas podem provocar.

Esta avaliação é regulada sob o título 7 do Código de Regulamentos Federais Parte 340 (7 CFR 340), que condiciona a introdução (importação, transferência interestadual, ou liberação no meio ambiente) de certos organismos engenheirados, inclusive plantas. O processo de liberação leva em média 2 anos e meio a 3 anos. Vamos analisar um caso específico de liberação obtida pela Monsanto Agricultural Company, para tomate com resistência a lepidopteros. O documento de liberação firmado pelo USDA permite o teste de campo mas o limita a 3.000 m<sup>2</sup>, porque a *A. tumefaciens* está na lista de patógenos de plantas; e porque o promotor utilizado para expressão da delta-endotoxina é oriundo do vírus do mosaico da couve-flor, uma doença de plantas. As plantas foram previamente testadas em casa de vegetação para teste de estabilidade.

O objetivo do teste de campo é avaliar a eficiência das plantas resistentes, em comparação com o controle químico de pragas de tomate por inseticidas. O documento apresenta uma descrição detalhada dos genes que codificam para a endotoxina, seu modo de ação, bem como dos vetores utilizados na transfor-

mação das plantas de tomate, e de evidências experimentais indicando a sua expressão em plantas de tomate em níveis variáveis – cerca 20 ng/mg de proteína total.

Até o presente o uso de plantas transgênicas resistentes a lepidopteros é limitado, e possivelmente, por esta razão, não foram ainda constatados casos de resistência de insetos as toxinas que são expressadas nestas plantas. É provável entretanto que o uso intensivo destas plantas constitua circunstância favorável ao aparecimento de insetos com resistência à ação da toxina. A resistência ao DIPEL, produto comercial a base de Bt. que produz a mesma toxina, foi obtida em laboratório para insetos de grãos armazenados (McGaughey 1987). Entretanto a especificidade de ação de diferentes estirpes de Bt. permite a expressão de diferentes toxinas em uma mesma planta dificultando o desenvolvimento simultâneo de resistência por parte do inseto a mais de uma toxina. O caminho mais seguro para produção de plantas transgênicas com resistência a lepidopteros, bem como a outros insetos, requer conhecimento detalhado do modo de ação das toxinas no organismo do inseto incluindo a identificação dos receptores celulares que nas células dos insetos interagem com as toxinas.

## RESISTÊNCIA DE MILHO A INSETOS POR ENGENHARIA GENÉTICA - ESTUDO DO CASO Nº 2

O consumo anual de inseticidas nos Estados Unidos e Europa para controle das pragas do milho constitui uma despesa anual de 350 milhões de dólares. No Brasil que produz 10 milhões de toneladas de milho, um mercado da ordem de 3 bilhões de dólares, as perdas devidas a insetos pragas do milho apesar do uso de inseticidas foi estimado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho-CNPMilho e Sorgo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em 450 milhões de dólares anualmente, 30% dos quais devidos às pragas de grãos armazenados.

A dificuldade de transformação de milho por intermédio da *A. tumefaciens*, aliada a dificuldade de regeneração de plantas a partir de cultura de células e tecidos “in vitro” adiaram por muitos anos a obtenção de plantas transgênicas de milho com resistência a insetos. Por esta razão o primeiro produto da engenharia genética dirigido a obter resistência a inseto praga em milho não foi uma planta transgênica, e sim um microorganismo engenhariado: *Clavibacter xyli subsp. cynodontis*.

A bactéria vive livremente no sistema endofítico de gramíneas como a grama bermuda e também no milho, de forma obrigatória. Nesta bactéria foi clonado e expressado o mesmo gene que foi utilizado para expressão da delta-endotoxina proveniente de Bt. em plantas transgênicas.

O produto denominado “INCIDE” e produzido pela Crop Genetic, foi inicialmente testado em condição de campo em julho de 1988, em 12.000 m<sup>2</sup>. Os resultados foram controversos. O produto não foi tão efetivo como se esperava e além do mais diminuiu o rendimento das plantas inoculadas. A bactéria foi encontrada em insetos, e a preocupação inicial de que por este veículo o gene pudesse ser introduzido de volta na grama bermuda (erva daninha de cana-de-açúcar e algodão) aumentou. Entretanto estes insetos foram incapazes de realizar esta transferência. Por outro lado a bactéria não é transmitida por sementes. A Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR) acredita que a baixa eficiência do produto se deve ao nível de expressão insatisfatória de delta-endotoxina e realizará um segundo teste de campo este ano e no próximo, com uma versão melhorada da bactéria (Witt 1990).

Em abril de 1990 a Dekalb Pfizer Genetics anunciou o domínio da tecnologia para produção de plantas transgênicas de milho. A solução para o problema de transferência de genes de forma estável, e sem a participação da *A. tumefaciens*, foi obtida pelos métodos de transferência direta utilizando formas diversas de aceleradores de partículas, que projetam e

transferem para células e tecidos de plantas microprojéteis, e com eles os veículos de transferência e expressão. São os chamados métodos biolísticos ("Particle gun"), que acrescentam uma vantagem aos métodos de eletroporação previamente disponíveis, qual seja o de permitir a transferência de genes, não só para protoplastos cuja regeneração em Gramíneas e principalmente em Leguminosas nem sempre é possível, mas também para tecidos vegetais, cuja regeneração é de domínio de vários laboratórios, tanto para Gramíneas quanto para Leguminosas. Existem vários "Particle Guns" disponíveis atualmente, sendo o mais popular o da DuPont: BIOLISTIC™ PDS-1000, que pode ser alugado sob contrato de leasing.

Existem também métodos eletroforéticos de aceleração de partículas que no entanto não produzem aceleração de partículas equivalente aos chamados "Particle Gun" e por esta razão não são tão efetivos na transferência de genes para tecidos vegetais, como para células e protoplastos (Rech 1989). No CENARGEN/EMBRAPA estes métodos estão sendo testados em feijão e mandioca. A obtenção de plantas de milho transgênicas resistentes a insetos será conseguida a curto prazo por estas técnicas, provavelmente pela Monsanto, e pela Dekalb Pfizer. Os genes e as técnicas de transferência, expressão e regeneração de plantas estão dominados por estas empresas, que já obtiveram plantas transgênicas de milho resistentes a herbicidas por estes métodos.

### O ALGODÃO RESISTENTE AO BICUDO-ESTUDO DO CASO Nº 3

O bicudo (*Anthonomus grandis* Boheman), que existe em alguns países como nos Estados Unidos há quase um século (foi encontrado pela primeira vez no Texas em 1892), foi "introduzido" no Brasil em 1983, na região de Campinas, São Paulo. Em 1985 ele havia se disseminado em mais de 1 milhão de ha prin-

cipalmente no Nordeste do Brasil tornando a sua erradicação inviável.

Em 1987 a área cultivada com algodão no Nordeste foi reduzida em 54% e a produção de algodão em caroço, de 473 mil toneladas para 218 mil toneladas. A área plantada com algodão no Nordeste que atingia 3 milhões de ha em 1987 está reduzida a menos de 1 milhão em anos recentes. O algodão arbóreo cuja produção na safra de 1974/75 chegou a 470 mil toneladas está reduzida a um décimo desde quantitativo. Dependem do algodão no Nordeste 13 a 14 milhões de nordestinos. O controle químico do bicudo exige um investimento equivalente à metade do valor da produção. O custo da aplicação de inseticidas inviabiliza a produção de algodão no Nordeste. Por outro lado o plantio de 1 milhão de ha de algodão exige 25 toneladas de sementes. O valor de custeio de algodão de alta tecnologia (rendimento na faixa de 1000 a 2200 kg/ha) foi estimado para o Nordeste em 55.84 BTN para algodão herbáceo. A preços de hoje este custo se aproxima de 4 mil cruzeiros/ha.

Considerando que sementes de plantas transgênicas resistentes ao bicudo podem ser vendidas a um custo de 400 cruzeiros/ha, ou seja um décimo do custo de produção comparado com 50% que seria o custo do controle químico; o mercado de sementes de plantas transgênicas, apenas para o plantio de 1 milhão de ha que foram reduzidas pela ação do bicudo correspondem a 400 milhões de cruzeiros, ou seja cerca de 4 milhões de dólares, sem falar nos custos sociais desta iniciativa. Um projeto que pode se viabilizar a curto e médio prazo se os genes para resistência ao bicudo forem encontrados em estirpes de Bt.

Até o momento não temos notícias da disponibilidade destes genes. A probabilidade de encontrá-los em estirpes de Bt. no Brasil parece maior do que em outros países, face à introdução recente do inseto praga no Brasil, embora esta afirmação seja passível de discussão. Na nossa opinião o projeto exige cooperação internacional com laboratórios que já dominam as tecnologias de cultivo, transformação e expressão de genes provenientes do

Bt. Pelo menos quatro empresas nos Estados Unidos já dominam esta tecnologia para algodão: MONSATO, CALGENE, AGRACETUS E NORTRUP KING. Aparentemente faltam os genes, mas mesmo se forem obtidos (O CENARGEN/EMBRAPA trabalha atualmente na coleta de BT.) a urgência com que o problema exige solução deixa clara a necessidade de cooperação internacional. O algodão já foi regenerado a partir de cultura de tecidos "in vitro" (Davidonis & Hamilton 1983), (Shoemaker et al 1986) e transformado via *A. tumefaciens* (Umbeck et al 1987).

### REFERÊNCIAS

- BARNEY, G. O. **The global 2000 report to the president.** Entering the twenty-first century. (s.l.): Council on Environmental Quality and the Department of State, US Government Printing Office, 1980.
- BBEP News. Hyattsville: USDA, v.1, n.1, Jun. 1990. 8p.
- BURGES, H. D. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: BURGES, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-80.** London: Academic Press, 1981. p. 737-767.
- DAVIDONIS, G. H.; HAMILTON, R. M. **Plant regeneration from callus of *Gossypium Hirsutum* L.** (s.l.s.n.), 1983. Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station (Paper nº 6653).
- GEORGHIU, G. P. The Magnitude of the resistance problem In: NRC. (s.l.: s.n.), 1986. p.14-43.
- McGAUGHEY, W. H.; Johnson, D. E. Toxicity of different serotypes and toxins of *Bacillus Thuringiensis* to resistant and susceptible Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.80, p.1122-1126, 1987.
- McKEOGH, J.F. **Genetically engineered, caterpillar, resistant plants cleared for Mississippi tests.** (s.l.): Rohm and Hass Company, 1986. News Release.
- RECH, F.E.L. **Electric Fields and agrobacteria for gene transfer into plants.** (s.l.): University of Nottingham, 1989. 742p. Tese Ph.D.
- SHOEMAKER, R. C.; COUCHE, L. J.; GALBRAITH, D. W. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Plant Cell Reports**, v.3, p.178-181, 1986.
- UMBECK, P.; JOHNSON, G.; BARTON, K.; SWAIN, W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Bio/Technology**, v.5, n.3, p.263-266, 1987.
- VALK, H.C.H.G. van der; KOEMAN, J.H. **Ecological impact of pesticide use in developing countries.** The Hague: Ministry of Housing, Physical Planning and Environment, 1988. 102p.
- WITT, S.C. **Brief Book;** Biotechnology, Microbes and Environment Center for Science Information CSI. (s.l:s.n.), 1990. 219p.
- WOODBURN, A. **Agrochemical Service.** Update of the agrochemical overview section. London: Wood Mackenzie, 1986b.
- WOODBURN, A. **Agrochemical Service.** Update of the agrochemical products section. London: Wood Mackenzie, 1987.