

Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga

Cry genes from *Bacillus thuringiensis* applied to crop genetic engineer, for insect resistance improvement

Laura Massochin Nunes Pinto¹
lauramnp@yahoo.com.br

Lidia Mariana Fiuza¹
fiuza@unisinos.br

Resumo

Este trabalho apresenta uma síntese de pesquisa bibliográfica sobre o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* e a aplicação dos seus genes *cry* – que codificam proteínas inseticidas – na engenharia genética de plantas cultivadas. Na última década, a importância das cultivares transgênicas, denominadas plantas-Bt, têm crescido comercialmente, fato que as leva a ocupar o segundo lugar entre as plantas geneticamente modificadas (GM), devido aos índices de maior emprego e distribuição. Na última safra (2006), o total de plantas-Bt atingiu 19 milhões de hectares e, no âmbito mundial, o milho-Bt apresentou 16 aprovações comerciais, se comparado ao primeiro plantio comercial de arroz-Bt, efetuado em 2005, no Irã. O desenvolvimento de tecnologias limpas, como os cultivares GM, apresenta diversas vantagens em relação aos inseticidas formulados, os quais dependem de métodos adequados de aplicação, conforme a cultura ou o modo de vida do inseto, e causam impacto a organismos não alvo e ao ambiente. Nesse sentido, o arroz-Bt tem o potencial de aumentar a produtividade, diminuir a aplicação de pesticidas e, conseqüentemente, melhorar a qualidade ambiental nas áreas de cultivo, as quais estão interligadas a áreas de conservação ambiental, como as regiões inundadas do Rio Grande do Sul. Os potenciais de benefícios que o arroz-Bt pode oferecer, com base nos resultados já obtidos com o algodão-Bt e o milho-Bt, devem se tornar motivadores para as novas pesquisas e para o desenvolvimento de diferentes cultivares de arroz-Bt. Assim, será possível acelerar a aprovação e a liberação dessa tecnologia aos orizicultores.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, insetos, genes *cry*, plantas transgênicas.

Abstract

This study presents a bibliographic synthesis about the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* and the *cry* genes application on the genetic engineering of cultivated crops which codify insecticide proteins. Over the last decade, the importance of the transgenic crops – named Bt crops – has increased commercially, leading them to take the second place among genetically modified (GM) crops most used and distributed. In the last harvest

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos. Av. Unisinos, 950, 93022-000, São Leopoldo, RS, Brazil.

(2006), total *Bt* crops reached 19 million hectares worldwide, and the *Bt*-corn already presented 16 commercial approvals, given that the first commercial *Bt*-rice plantation was made in Iran, 2005. The clean technology development, such as GM cultivars, presents several advantages in comparison to formulated insecticides, which depends on appropriated application methods according to the crop culture or the insect behavior, and the impacts over the nontarget organisms and the environment. In this sense, the *Bt*-rice has the potential to increase productivity, decrease the pesticide application and thus improve the environmental quality on the agricultural systems, which are highly related to environment conservation areas such as flooded regions of Rio Grande do Sul. The potential benefits that *Bt*-rice can offer, based on already obtained results with *Bt*-cotton and *Bt*-corn, should motivate new researches and the development of different varieties of *Bt*-rice. As a result, it could accelerate the approval and release of this technology to the rice farmers.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, insects, *cry* genes, transgenic plants.

Introdução

A população mundial está em constante crescimento e isso faz com que sejam necessárias novas estratégias para utilizar as áreas agrícolas cultivadas e os recursos naturais de forma eficiente e também sustentável (High *et al.*, 2004).

Uma das dificuldades que a agricultura enfrenta e que contribui para a diminuição da sua produtividade é o ataque de insetos fitófagos. Portanto, tem sido uma necessidade constante, em diversos grupos de pesquisas, a busca por métodos alternativos de controle desses insetos, com menor impacto ambiental (Ferry *et al.*, 2006).

O controle dos insetos-praga tem sido realizado, essencialmente, mediante a aplicação de produtos químicos, como os piretróides e carbamatos (SOSBAI, 2005). Considerando os problemas relacionados à ação desses inseticidas sobre organismos não-alvo, a contaminação de águas e resíduos em alimentos (Schulz, 2004; Kamel *et al.*, 2007), tornam-se necessários estudos que propiciem métodos alternativos de controle, os quais podem ser aplicados no manejo integrado de pragas (MIP). Uma alternativa dentro do controle biológico de insetos é a aplicação de entomopatógenos, que podem ser bactérias, vírus e fungos (Alves, 1998). As práticas de controle biológico de insetos representam uma opção viável que permite a redução da aplicação de

produtos (SOSBAI, 2005; Crickmore, 2006).

Entre os entomopatógenos utilizados no controle biológico, as pesquisas com a bactéria *Bacillus thuringiensis* tornam-se promissoras na busca de proteínas inseticidas e, conseqüentemente, na obtenção dos genes codificantes (Bobrowski *et al.*, 2003; High *et al.*, 2004; Crickmore, 2006). Diversos grupos de pesquisa avaliam o potencial inseticida dessa bactéria a insetos-praga que atacam diferentes culturas, como soja, milho, algodão, arroz, entre outras (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005).

Considerando as plantas cultivadas, o arroz é a cultura alvo para diversos programas de melhoramento, pois é a base da dieta para, aproximadamente, dois bilhões de pessoas em todo o mundo e, além disso, é o alimento mais importante para metade dos asiáticos (Khush, 1997; Datta, 2004). Cerca de 114 países cultivam arroz e mais de 50 têm uma produção anual de 100 mil toneladas desse cereal. O Brasil ganha destaque porque está entre os dez países com maior produção de arroz no panorama internacional. Produziu, em 2005, cerca de 13 milhões de toneladas desse grão (IBGE, 2007).

O estado do Rio Grande do Sul é o líder nacional de produção de arroz irrigado, totalizando 46,3% da produção nacional (IBGE, 2007). Apesar da alta produção, a orizicultura gaúcha sofre

freqüentemente o ataque de insetos, os quais têm sido encontrados em níveis de densidade populacional elevados, fato que ocasiona perdas de produtividade de 10 a 35% (EMBRAPA, 2007). A ampla aplicação de inseticidas químicos não apenas aumenta os custos da produção de arroz como também contribui para a preocupação com a saúde dos orizicultores e a deterioração dos agroecossistemas (Datta, 2004; High *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005).

A utilização de produtos à base de *B. thuringiensis* no controle de insetos-praga do arroz já está sendo recomendada no manejo integrado de pragas (MIP) desta cultura (SOSBAI, 2005). Além disso, pesquisas com a engenharia genética de diversas plantas cultivadas, incluindo arroz, têm sido um atrativo com grande progresso para o controle de insetos, por introduzirem os genes *cry* de *B. thuringiensis* que codificam as proteínas inseticidas (Wang *et al.*, 2002). Esta é a segunda característica mais comum, após resistência a herbicidas, procurada em culturas geneticamente modificadas (O'Callaghan *et al.*, 2005).

Nesse contexto, este artigo de revisão bibliográfica apresenta dados sobre a bactéria *B. thuringiensis*, descreve como agem suas toxinas, estuda a utilização dos genes *cry* na engenharia genética de plantas, especialmente da orizicultura, e esclarece aspectos de biossegurança das plantas-*Bt*.

A bactéria *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva caracterizada pela produção de um cristal paraesporal na célula-mãe, durante sua esporulação, o qual contém delta-endotoxinas ativas a diversas ordens de insetos (Höfte e Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998). Essas toxinas são altamente específicas contra seus insetos-alvo, mas são inócuas a humanos, vertebrados e plantas, além de serem completamente biodegradáveis. Em razão desses fatos, *B. thuringiensis* torna-se uma alternativa segura no controle de insetos-praga de importância agrícola, bem como de importantes vetores de doenças humanas (Bravo *et al.*, 2005).

Já foram isoladas milhares de cepas de *B. thuringiensis*, as quais, na sua maioria, produzem uma ou mais δ -endotoxinas com atividade específica às ordens de insetos avaliadas (Schnepf *et al.*, 1998; Pinto e Fiuza, 2002; Monnerat *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008). O modo de ação dessas proteínas, denominadas *cry*, em larvas suscetíveis tem sido estudado, principalmente, em lepidópteros (Figura 1). A ação primária de tais proteínas ocorre após a ingestão e solubilização das inclusões paraesporais no ambiente alcalino do intestino. Em seguida, essas protoxinas solubilizadas são clivadas pelas proteases do intestino médio do inseto, originando peptídeos resistentes às proteases que são capazes de se ligar aos receptores das microvilosidades das células colunares do intestino médio. Essa inserção leva à formação de poros nas membranas apicais das microvilosidades e subsequente lise e ruptura do epitélio do intestino médio, o qual libera seu conteúdo celular que proporciona um meio de germinação para os esporos de *B. thuringiensis*. Esses acontecimentos levam à septicemia e à morte do inseto (de Maagd *et al.*, 2001; Fiuza, 2004; Bravo *et al.*, 2007). As proteases que cada grupo de inseto possui são responsáveis pelos diferentes níveis de toxicidade de cada cepa

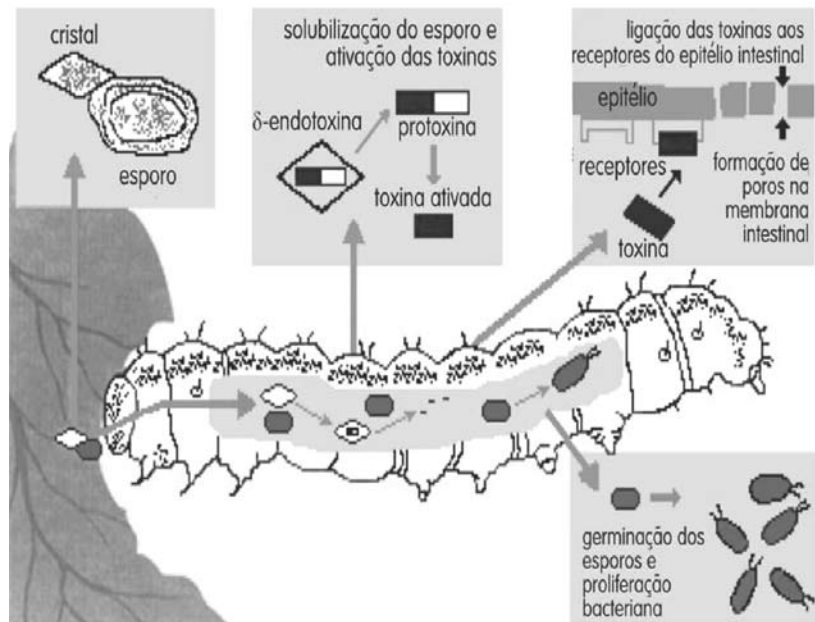


Figura 1. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis* (WHO, 1999).

Figure 1. Mechanism of toxicity of *Bacillus thuringiensis* (WHO, 1999).

nos diversos insetos (Lightwood *et al.*, 2000; Bravo *et al.*, 2004).

Os genes *cry* de *B. thuringiensis*

Os genes *cry* foram classificados por Höfte e Whiteley (1989) de acordo com sua estrutura molecular, bem como seu alcance de hospedeiros. Na época, os referidos autores mencionaram a classificação de 13 genes *cry*, os quais foram distribuídos em quatro classes. Em 1998, foi realizado um trabalho de revisão da nomenclatura dos genes *cry*, mencionando a existência de aproximadamente 100 desses genes, agrupados em 22 classes (Crickmore *et al.*, 1998). Nesta nomenclatura, os numerais romanos que apareciam em primeiro lugar após a sigla *cry*, foram trocados por numerais arábicos, a fim de comportar o crescente número de novas proteínas. Atualmente, os referidos autores atualizam os dados referentes aos genes *cry* de *B. thuringiensis* no site: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt. Até o momento, constam, nessa base de dados, mais de 400

genes *cry*, os quais estão distribuídos em 55 classes.

O genoma de *B. thuringiensis* varia de 2,4 a 5,7 milhões de pares de bases, sendo que a maioria dos isolados apresenta elementos extracromossômicos lineares ou circulares (Carlson *et al.*, 1994). Os genes *cry* estão localizados em plasmídios e muitos isolados possuem diversos genes *cry* responsáveis pela síntese de diferentes proteínas inseticidas (Lereclus *et al.*, 1993), as quais foram classificadas como Cry1 a Cry55, dependendo da especificidade do hospedeiro e do grau de homologia de seus aminoácidos (Höfte e Whiteley, 1989; Crickmore, 2006).

Durante seu desenvolvimento, *B. thuringiensis* passa por duas fases: a de crescimento vegetativo e a estacionária, etapas semelhantes às do desenvolvimento de *B. subtilis*. A primeira fase caracteriza-se pelo crescimento exponencial das células bacterianas, momento em que há grande disponibilidade de nutrientes no meio. A fase estacionária ocorre quando o meio se torna hostil, e a bactéria adapta-se à diminuição de nutrientes mediante mecanismos genéticos, cessando a reprodução celular. Nesse período, o

endósporo torna-se maduro.

A expressão dos genes *cry* de *B. thuringiensis* geralmente ocorre na fase estacionária da célula, acumulando seu produto na célula-mãe, na forma de uma inclusão cristalífera, a qual é liberada no meio ao final da esporulação (Lereclus *et al.*, 2000). Essa inclusão pode representar cerca de 25% do peso seco de células já esporuladas (Agaisse e Lereclus, 1995). Apesar de a expressão dos genes *cry* estar estreitamente relacionada ao evento da esporulação, existem genes *cry* que se expressam independentemente da esporulação (Agaisse e Lereclus, 1995).

As plantas geneticamente modificadas com genes *cry*

O maior avanço na utilização de *B. thuringiensis* tem sido a transformação de diversas cultivares agrícolas visando a expressão das toxinas Cry. Desde 1996, a importância dessas cultivares transformadas tem crescido comercialmente, levando-as a ocuparem o segundo lugar entre as plantas geneticamente modificadas com maior emprego e distribuição, seguidas das plantas resistentes a herbicidas (Crickmore, 2006).

Essas cultivares transformadas com genes *cry*, também denominadas “plantas-Bt”, apresentam diversas vantagens em relação aos formulados de *B. thuringiensis*, pois não necessitam de pulverização foliar para o controle de certos insetos, já que a toxina é expressa pela própria planta. Além disso, diminuem a quantidade de inseticidas químicos liberados no ambiente, bem como os gases emitidos pelo maquinário agrícola empregado na sua aplicação (James, 2006).

Em 2006, as lavouras de plantas GM somaram 102 milhões de hectares de plantio na escala mundial, dos quais as culturas de plantas-Bt alcançam 19 milhões de hectares (19%). Entre 2005 e 2006, os números indicados representaram um crescimento de

17% do cultivo de plantas resistentes a insetos (James, 2006).

O crescimento mais significativo foi o de milho e o de algodão-Bt. Essas plantas produzem uma forma truncada de proteínas Cry, a qual se assemelha àqueles peptídeos tóxicos ativados após sua clivagem no intestino dos insetos susceptíveis (Crickmore, 2006). Assim, a toxina é sintetizada em sua forma tóxica ou solúvel, preferencialmente às inclusões cristalinas, as quais ainda terão de ser solubilizadas pelo pH alcalino do intestino.

Cabe salientar que o milho resistente a insetos, ou milho-Bt, já tem 16 aprovações comerciais no mundo inteiro. Atualmente, existem 13 espécies de plantas transformadas com genes de *B. thuringiensis* (Tabela 1).

Genes *cry* em plantas de arroz

A China é, reconhecidamente, líder mundial em consumo e produção de arroz (Chen *et al.*, 2006). Em 1998, iniciou os primeiros testes a campo com arroz-Bt resistente a lepidópteros (Shu *et al.*, 2000), seguida pela Índia, em 2001 (Ye *et al.*, 2001).

As variedades de arroz transformadas com genes *cry* de *B. thuringiensis*, mostraram-se resistentes a uma ou mais espécies de insetos-praga do arroz cultivado desses países, indicando um aumento no rendimento desse grão de 6 a 9% (Huang *et al.*, 2005).

Os testes conduzidos na China, desde 1998, demonstram que o arroz-Bt controla efetivamente três espécies de brocas de colmo (*Chilo suppressalis*, *Scirpophaga incertulas*, *Sesamia inferens*) e filófagos (*Cnaphalocrocis medinalis*).

Em avaliações a campo, o arroz-Bt (Tabela 2) causou 90 a 100% de mortalidade às brocas e 84 a 100% aos desfolhadores (Chen *et al.*, 2006). Esse fato evidencia uma ação significativamente mais efetiva no controle das brocas, quando comparada à da maioria dos inseticidas utilizados pelos

agricultores, na China.

Em 2005, o arroz-Bt foi plantado comercialmente pela primeira vez no Irã, em aproximadamente 4.000 ha, por diversos agricultores (James, 2006). Atualmente, Irã e China são os países mais avançados no desenvolvimento de arroz-Bt.

De acordo com a pesquisa de Huang *et al.* (2005), realizada na China, os produtores de arroz GM aplicam o mesmo tipo de pesticida que os produtores de arroz convencional, porém com uma frequência significativamente menor, quando comparada à utilização desses produtos por produtores do arroz convencional. A quantidade e o custo do uso de pesticidas, por hectare dos produtores de arroz convencional, foram de 8 a 10 vezes maiores, respectivamente, quando comparados ao uso desses produtos químicos pelos produtores de arroz GM. Esta redução também contribui para uma diminuição dos seus efeitos nocivos à saúde dos próprios produtores. Huang *et al.* (2005) também evidenciaram que houve um incremento, ainda que pequeno, de 3,5% no rendimento das variedades de arroz GM, se comparado ao do convencional.

Biossegurança de plantas-Bt

Controvérsias sobre os benefícios e riscos ecológicos de cultivares transgênicas existem desde seu surgimento, mas vêm aumentando após a liberação comercial das primeiras plantas-Bt, em 1996 (Shelton e Sears, 2001).

No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) estabeleceu normas de segurança e pareceres técnicos conclusivos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente para todas as atividades com organismos GM e derivados.

A Instrução Normativa Nº 3 do Caderno de Biossegurança da CTNBio (*site*: http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/8).

Tabela 1. Vegetais modificados com genes *cry* de *B. thuringiensis*, resistentes a insetos-praga de importância agrícola (adaptado de Fontes *et al.*, 2002).**Table 1.** Insect-resistant crops modified with *cry* genes from *B. thuringiensis* (adapted from Fontes *et al.*, 2002).

Planta	Gene <i>cry</i>	Inseto-alvo	Referência
Álamo	<i>cry1Aa</i> <i>cry3Aa</i>	<i>Lymantria dispar</i> (L.) (Lep.) <i>Chrysomela tremulae</i> F. (Col.)	McCown <i>et al.</i> (1991) Cornu <i>et al.</i> (1996)
Alfafa	<i>cry1Ca</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> (Boiusduval) (Lep.)	Sthrizhov <i>et al.</i> (1996)
Algodão	<i>cry1Ab</i> <i>cry1Ac</i> e <i>cry2Ab</i>	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> (Walker) (Lep.)	Perlak <i>et al.</i> (1990) Adamczyk <i>et al.</i> (2001)
Batata	<i>cry1Ab</i> <i>cry1Ab</i> <i>cry3Aa</i>	<i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) (Lep.) <i>Heliothis armigera</i> (Hübner) <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Peferoen <i>et al.</i> (1992), Rico <i>et al.</i> (1998) Chakrabarti <i>et al.</i> (2000) Adang <i>et al.</i> (1993), Perlak <i>et al.</i> (1993), Coombs <i>et al.</i> (2002)
Berinjela	<i>cry1Ab</i> <i>cry3A</i>	<i>Leucinodes orbonalis</i> Guenée (Lep.) <i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say) (Col.)	Kumar <i>et al.</i> (1998) Jelenkovic <i>et al.</i> (1998)
Brócolis	<i>cry1C</i>	<i>Plutella xylostella</i> (L.) (Lep.)	Zhao <i>et al.</i> (2001)
Canola	<i>cry1Ac</i> <i>cry1Ac</i>	<i>Thrichoplusia ni</i> (Hübner) (Lep.), <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner), <i>Heliothis virescens</i> (Fabr.), <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie) (Lep.) <i>Plutella xylostella</i>	Stewart <i>et al.</i> (1996b)
Fumo	<i>cry1Aa</i> <i>cry1Ab</i> <i>cry1Ab</i> e <i>cpTI</i> <i>cry1Ab</i> <i>cry1Ac</i> <i>cry1C</i> <i>cry2A</i> <i>cry2A</i>	<i>Manduca sexta</i> (L.) (Lep.) <i>Manduca sexta</i> <i>Manduca sexta</i> <i>Manduca sexta</i> <i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Spodoptera littoralis</i> <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> <i>Spodoptera exigua</i>	Barton <i>et al.</i> (1987) Vaeck <i>et al.</i> (1987) Perlak <i>et al.</i> (1991) Williams <i>et al.</i> (1993) McBride <i>et al.</i> (1995) Strizhov <i>et al.</i> (1996) Selvapandiyan <i>et al.</i> (1998) Kota <i>et al.</i> (1999)
Milho	<i>cry1Ab</i> <i>cry9c</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner) (Lep.) <i>Ostrinia nubilalis</i>	Koziel <i>et al.</i> (1993) Jansem <i>et al.</i> (1997)
Repolho	<i>cry1Ab</i>	<i>Plutella xylostella</i>	Bhattacharya <i>et al.</i> (2002)
Soja	<i>cry1Ac</i>	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> <i>Pseudoplusia includens</i>	Stewart <i>et al.</i> (1996a)
Tomate	<i>cry1Ab</i> <i>cry1Ac</i>	<i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa armigera</i>	Fischolff <i>et al.</i> (1987) Mandaokar <i>et al.</i> (2000)

pdf) especifica “Normas para a Liberação Planejada no Meio Ambiente de Organismos Geneticamente Modificados”. Essa normativa apresenta os procedimentos (Figura 2) que se aplicam à liberação, no Brasil, de organismos geneticamente modificados (OGMs) no meio ambiente (inclusive OGMs importados) - seja para experimentos no campo ou em outro meio.

O avanço da produção de plantas GM tem impulsionado pesquisas que abordam questões sobre o impacto dessa tecnologia na biodiversidade,

principalmente sobre seus efeitos em organismos não alvo, como inimigos naturais (predadores e parasitoides) e no homem.

De acordo com Romeis *et al.* (2006), para o estudo sobre o efeito ambiental das toxinas de *B. thuringiensis* sintetizadas por plantas GM, deve ser realizada uma análise detalhada dos potenciais efeitos das plantas GM, antes da liberação comercial. A avaliação de risco ecológico, para fins regulatórios, deve estar baseada numa série de abordagens, em que a avaliação aumenta

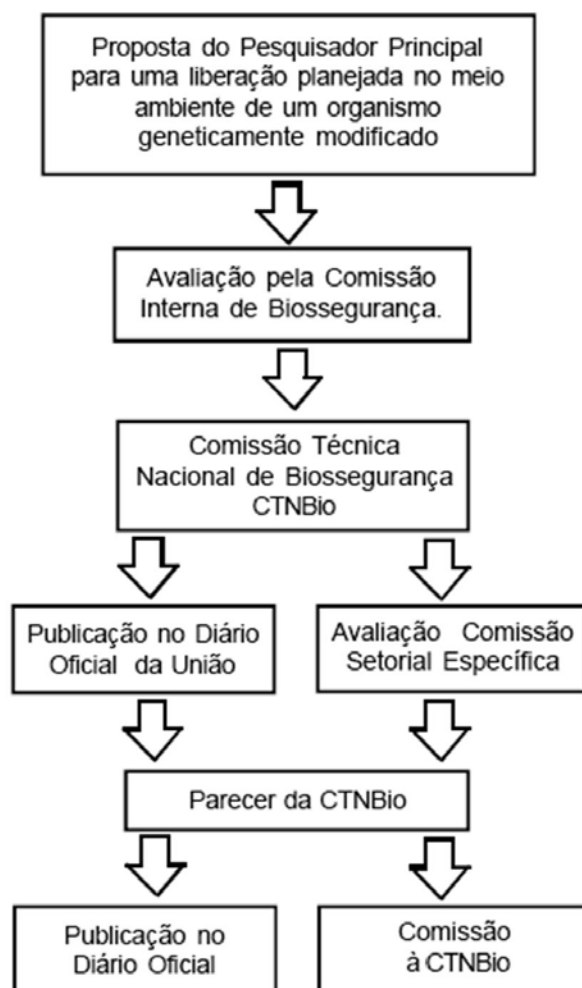
em complexidade, de acordo com o conhecimento adquirido durante testes prévios.

Para a avaliação dos riscos em organismos não alvo, uma série de testes é realizada em laboratório visando determinar se o organismo em questão é susceptível à toxina nas condições mais adversas. Nesse caso, o organismo é exposto diretamente a altas doses da toxina (Dutton *et al.*, 2003).

Esses testes são simples de delinear e padronizar e originam resultados de fácil interpretação. Se os resulta-

Tabela 2. Genes *cry* de *B. thuringiensis* utilizados na transformação genética de cultivares de arroz, conferindo resistência aos lepidópteros-praga da cultura.**Table 2.** *Cry* genes from *B. thuringiensis*, used in genetic transformation of lepidopteran resistance rice cultivars.

Gene	Inseto-alvo	Referências
<i>cry1Aa</i>	<i>Chilo suppressalis</i>	Breitler <i>et al.</i> (2004)
<i>cry1Ab</i>	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> , <i>Chilo suppressalis</i> , <i>Scirpophaga incertulas</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> , <i>Herpigramma licarialis</i> ; <i>Sesamia inferens</i> , <i>Naranga anescens</i> , <i>Mycalesis gotama</i> , <i>Parnara guttata</i> .	Shu <i>et al.</i> (2000), Ye <i>et al.</i> (2003), Wunn <i>et al.</i> (1996), Datta <i>et al.</i> (1998), Ghareyazie <i>et al.</i> (1997), Alam <i>et al.</i> (1998), Wu <i>et al.</i> (1997), Husnain <i>et al.</i> (2002)
<i>cry1Ac</i>	<i>Chilo suppressalis</i> , <i>Nilaparvata lugens</i> , <i>Scirpophaga incertulas</i>	Loc <i>et al.</i> (2002), Khanna e Raina (2002), Nayak <i>et al.</i> (1997), Han <i>et al.</i> (2007)
<i>cry1Ab</i> e <i>cry1Ac</i>	<i>Chilo suppressalis</i> , <i>Scirpophaga incertulas</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Cheng <i>et al.</i> (1998), Ahmad <i>et al.</i> (2002), Tu <i>et al.</i> (2000)
<i>cry1B</i>	<i>Chilo suppressalis</i>	Breitler <i>et al.</i> (2000, 2001)
<i>cry1C</i>	<i>Scirpophaga incertulas</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Tang <i>et al.</i> (2006)
<i>cry2A</i>	<i>Scirpophaga incertulas</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Maqbool <i>et al.</i> (1998), Chen <i>et al.</i> (2005)

**Figura 2.** Sumário dos procedimentos da Instrução Normativa Nº 3 do Caderno de Biossegurança da CTNBio.**Figure 2.** Summary of the proceedings of the Normative Instruction No. 3 from the Biosafety Book of CTNBio.

dos identificarem riscos aos organismos testados, novos experimentos devem ser realizados em condições mais próximas a realidade (Romeis *et al.*, 2006).

Chen *et al.* (2006) publicaram uma pesquisa sobre a avaliação a campo dos efeitos do arroz-Bt com genes *cry1Ab* e *cry1AcI*, os quais têm demonstrado ação inseticida específica a lepidópteros, em populações de homópteros e hemípteros não alvo. Após dois anos de monitoramento, os dados obtidos indicaram que o arroz-Bt não teve impacto significativo na composição ou densidade dos insetos avaliados durante todo o período amostrado, bem como não afetou a dinâmica populacional das espécies predominantes do local.

Diversos trabalhos também mostram que o arroz-Bt não tem impacto adverso sobre os inimigos naturais, quando comparado com áreas plantadas com arroz não GM (Liu *et al.*, 2002, 2004; Bai *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Outro aspecto que deve ser avaliado é a importante diminuição da liberação de inseticida nos agroecossistemas em áreas com plantas GM (Velkov *et al.*, 2005; James, 2006; Brookes e Barfoot, 2006). No trabalho realizado por Huang *et al.* (2005), foi verificado que os produtores diminuíram significativamente a quantidade de inseticida

aplicada no campo, utilizando 16,77 kg a menos de pesticida por hectare, se comparado aos produtores de arroz convencionais, representando uma redução comparativa de 80%.

Essa diminuição do uso de pesticidas reflete diretamente na qualidade ambiental e na saúde humana, pois os agricultores reduzem a exposição aos produtos químicos, os quais geralmente têm grande toxicidade (Breitler *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005).

Considerações finais

A redução da produtividade agrícola, devido aos ataques dos insetos, é um fator significativo limitante à produção de alimentos na escala mundial. A resistência a insetos-praga, mediada por plantas transformadas com genes de *B. thuringiensis*, tem sido um dos grandes sucessos da tecnologia correspondente à engenharia genética de plantas cultivadas (Ferry *et al.*, 2006).

Até o momento, não há dados publicados que relatam a resistência de insetos às plantas-Bt, em condições de campo, o que reforça a importância dessa ferramenta biotecnológica.

Mais de 50 estudos a campo, com diferentes durações, tamanhos e métodos de amostragem, foram conduzidos em áreas comerciais e experimentais para a avaliação do impacto de plantas-Bt, em inimigos naturais, e nenhum efeito negativo foi revelado, comparativamente às plantas convencionais (Chen *et al.*, 2006; Romeis *et al.*, 2006). Além disso, diversos estudos com variedades de arroz-Bt, realizados em casa de vegetação, revelaram que a maioria dessas variedades pode controlar efetivamente os lepidópteros alvo. Desse modo, as pesquisas também revelam que o arroz-Bt reduz a aplicação de inseticidas químicos, com importantes benefícios ao ambiente e à saúde dos orizicultores (Chen *et al.*, 2006).

Atualmente, torna-se evidente a necessidade de estratégias complementares duráveis à utilização de plantas-Bt, para assegurar os benefícios alcançados com a obtenção das mesmas. Para

tanto, uma nova geração de plantas-Bt está surgindo, com variedades que expressam simultaneamente duas ou mais proteínas Cry de *B. thuringiensis* (Cohen *et al.*, 2000; Bates *et al.*, 2005; Ferry *et al.*, 2006). Essas novas plantas-Bt visam alcançar esse objetivo, pois, pelo seu maior número de proteínas expressas, ampliam o alcance a outros insetos, além de retardar o aparecimento de resistência aos insetos susceptíveis.

Este trabalho de revisão bibliográfica revela que as plantas-Bt podem ser consideradas mais uma ferramenta nas estratégias de manejo integrado de pragas, pois têm o potencial de aumentar a produtividade, além de diminuir a aplicação de pesticidas e, assim, melhorar a qualidade ambiental nas áreas de cultivo. Essas vantagens da engenharia genética vegetal, aliadas aos genes *cry* de *B. thuringiensis*, são motivadores da ampliação dessa tecnologia às plantas cultivadas de interesse econômico nacional e regional, como a orizicultura, em busca da sustentabilidade dos agroecossistemas.

Referências

- ADAMCZYK, J.J.; ADAMS, L.C.; HARDEE, D.D. 2001. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *Journal of Economic Entomology*, **94**:1589-1593.
- ADANG, M.J.; BRODY, M.S.; CARDINEAU, G.; PETERSEN, L.J.; PARKER, G.B.; MCPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOLF, D.A. 1993. The reconstruction and expression of *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology*, **21**:1131-1145.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, **177**:6027-6032.
- AHMAD, A.; MAQBOOL, S.B.; RIAZUDDIN, S.; STICKLEN, M.B. 2002. Expression of synthetic *CRYIAB* and *CRYIAC* genes in Basmati rice (*Oryza sativa* L.) variety 370 via *Agrobacterium*-mediated transformation for the control of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *In Vitro Cellular Development and Biology of Plants*, **38**(2):213-220.
- ALAM, M.F.; DATTA, K.; ABRIGO, E.; VASQUEZ, A.; SENADHIRA, D.; DATTA, S.K. 1998. Production of transgenic deep water indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Science*, **35**:25-30.
- ALVES, S.B. 1998. Controle microbiano de insetos. 2ª ed., Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- BAI, Y.Y.; JIANG, M.X.; CHENG, J.A. 2005. Impacts of transgenic *cryIAb* rice on two collembolan species and predation of *Microvelia horvathi* (Hemiptera: Veliidae). *Acta Entomologica Sinica*, **48**:42-47.
- BARTON, K.A.; WHITELEY, R.H.; YANG, N.S. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -entodotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, **85**:1103-1109.
- BATES, S.L.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M. 2005. Insect-resistance management in GM crops: Past, present and future. *Nature Biotechnology*, **23**:57-62.
- BHATTACHARYA, R.C.; VISWAKARMA, N.; BHAT, S.R.; KIRTI, P.B.; CHOPRA, V.L. 2002. Development of insect-resistant transgenic cabbage plants expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Current Science*, **83**:146-150.
- BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALLI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. 2003. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, **33**(5):843-850.
- BRAVO, A.; GILLB, S.S.; SOBERÓN, M. 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: L. GILBERT; K. IATROU; S. GILL (eds.), *Comprehensive molecular insect science*. Amsterdam, Elsevier BV, p. 175-206.
- BRAVO, A.; GILLB, S.S.; SOBERÓN, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**:423-435.
- BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. 2004. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1667**:38-46.
- BREITLER, J.C.; CORDERO, M.J.; ROYER, M.; MEYNARD, D.; SAN SEGUNDO, B.; GUIDERDONI, E. 2001. The -689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound inducible expression of the *cryIB* gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **7**:259-274.
- BREITLER, J.C.; MARFA, V.; ROYER, M.; MEYNARD, D.; VASSAL, J.M.; VERCAMBRE, B.; FRUTOS R.; MESSEGUER, J.; GABARRA, R.; GUIDERDONI, E. 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis cryIB* synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports*, **19**:1195-1202.

- BREITLER, J.C.; VASSAL, J.N.; CATALA, M.D.M.; MEYNARD, D.; MARFA, V.; MELE, E.; ROYER, M.; MURILLO, I.; SEGUNDO, S.B.; GUIDERDONI, E.E.; MESSEGUER, J. 2004. *Bt* rice harboring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter, protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, **2**:417-430.
- BROOKES, G.; P. BARFOOT. 2006. *GM Crops: The first ten years - global socio-economic and environmental impacts*. Ithaca, NY, ISAAA Brief. n. 36.
- CARLSON, C.R.; CAUGANT, D.A.; KOLSTØ, A.B. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**:1719-1725.
- CHAKRABARTI, S.K.; MANDAOKAR, A.D.; SHUKLA, A.; PATTANAYAK, D.; NAIK, P.S.; SHARMA, R.P.; KUMAR, P.A. 2000. *Bacillus thuringiensis cry1Ab* gene confers resistance to potato against *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Potato Research*, **43**:143-152.
- CHEN, H.; TANG, W.; XU, C.; LI, X.; LIN, Y.; ZHANG, Q. 2005. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**:1330-1337.
- CHEN, M.; YE, G.Y.; LIU, Z.C.; YAO, H.W.; CHEN, X.X.; SHEN, Z.C.; HU, C.; DATTA, S.K. 2006. Field assessment of the effects of transgenic rice expressing a fused gene of *cry1Ab* and *cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* Berliner on nontarget planthopper and leafhopper populations. *Environmental Entomology*, **35**(1):127-134.
- CHENG, X.; SARDANA, R.; KAPLAN, H.; ALTOSAAR, I. 1998. *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic *cry1Ab* and *cry1Ac* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**:2767-2772.
- CLARK, B.W.; PHILLIPS, T.A.; COATS, J. 2005. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) proteins from transgenic crops: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:4643-4653.
- COHEN, M.B.; GOULD, F.; BENTUR, J.S. 2000. *Bt* rice: practical steps to sustainable use. *International Rice Research Notes*, **25**:4-10.
- COOMBS, J.J.; DOUCHES, D.S.; LI, W.B.; GRAFUS, E.J. E PETT, W.L. 2002. Combining engineered (*Bt-cry3A*) and natural resistance mechanisms in potato for control of Colorado potato beetle. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**:62-68.
- CORNU, D.; LEPLÉ, J.C.; BONADÉ-BOTINO, M.; ROSS, A.; AUGUSTIN, S.; DELPLANQUE, A.; JOUANIN, L.; PILATE, G. 1996. Expression of proteinase inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic poplars. In: IUFRO MEETING ON SOMATIC CELL GENETICS AND MOLECULAR GENETIC OF TREES, Kluwer, Dordrecht, *Proceedings*, p. 131-136.
- CRICKMORE, N. 2006. Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *Journal of Applied Microbiology*, **101**:616-619.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPE, E.; VAN RIE, J.; LERECUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(3):807-813.
- DATTA, K.; VASQUEZ, A.; TU, J.; TORRIZO, L.; ALAM, M.F.; OLIVA, N.; ABRIGO, E.; KHUSH, G.S.; DATTA, S.K. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cry1A(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**:20-30.
- DATTA, S. 2004. Rice biotechnology: A need for developing countries. *AgBioForum*, **7**(1-2):31-35.
- DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, **17**:193-199.
- DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: *Bt*-maize expressing *Cry1Ab* as a case study. *BioControl*, **48**(6):611-636.
- EMBRAPA. 2007. Cultivo do arroz irrigado no Brasil: Sistemas de Produção, 3. Available at: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/index.htm>, accessed on: 01/07/2007.
- FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A.M.R. 2006. Transgenic plants for insect pest control: A forward looking scientific perspective. *Transgenic Research*, **15**:13-19.
- FISCHOLFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KATZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FINLEY, R.T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *BioTechnology*, **5**:807-813.
- FIUZA, L.M. 2004. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos: análises *in vitro* de receptores membranares de proteínas Cry em larvas de lepidópteros. *Biocologia*, **32**:84-89.
- FONTES, E.M.G.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R.; PANIZZI, A.R. 2002. The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotropical Entomology*, **31**(4):497-513.
- GAO, M.; LI, R.; DAI, S.; WU, Y.; YI, D. 2008. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. *Biological Control*, **44**:380-388.
- GHAREYAZIE, B.; FARAMARZ, A.; CORAZON, A.M.; RUBIA, L.G.; PALMA, J.M.; LIWANAG, E.A.; COHEN, M.B.; KHUSH, G.S.; BENNETT, J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cry1A(b)* gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **5**:401-414.
- HAN, L.; WU, K.; PENG, Y.; WANG, F.; GUI, Y. 2007. Efficacy of transgenic rice expressing *Cry1Ac* and *CpTI* against the rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée). *Journal of Invertebrate Pathology*, **96**(1):71-79.
- HIGH, S.M.; COHEN, M.B.; SHU, Q.Y.; ALTOSAAR, I. 2004. Achieving successful deployment of *Bt* rice. *Trends in Plant Science*, **9**(6):286-292.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, **53**(2):242-255.
- HUANG, J.K.; HU, R.F.; ROZELLE, S.; PRAY, C. 2005. Insect resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science*, **308**:688-690.
- HUSNAIN, T.; ASAD, J.; MAQBOOL, S.B.; DATTA, S.K.; RIAZUDDIN, S. 2002. Variability in expression of insecticidal *Cry1Ab* gene in Indica Basmati rice. *Journal Euphytica*, **128**(1):121-128.
- IBGE. 2007. Levantamento sistemático da produção agrícola. Produção: confronto das estimativas Abril/Maio 2007 – Brasil. Available at: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200705_2.shtm; accessed on: 01/07/2007.
- JAMES, C. 2006. *Situação global da comercialização das lavouras GM:2006*. ISAAA Briefs (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications), v. 32.
- JANSEN, S.; VANVLIT, A.; DICKBURT, C.; BUYASSE, L.; PIENS, C.; SAEY, B.; DE WULF, A.; GOSSELE, V.; PAEZ, A.; GOBEL, E. 1997. Transgenic corn expressing a *cry9C* insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. *Crop Science*, **37**:1616-1624.
- JELENKOVIC, G.; BILLINGS, S.; CHEN, Q.; LASHOMB, J. HAMILTON, G.; GHIDIU, G. 1998. Transformation of eggplant with synthetic *cryIIIa* gene produces a high level of resistance to the Colorado potato beetle. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**:19-25.
- KAMEL, F.; ENGEL, L.S.; GLADEN, B.C.; HOPPIN, J.A.; ALAVANJA, M.C.R.; HOPDLER, D.P. 2007. Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Human & Experimental Toxicology*, **26**:243-250.
- KHANNA, H.K.; RAINA, K. 2002. Elite Indica transgenic rice plants expressing modified *Cry1Ac* endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Transgenic Research*, **11**:411-423.
- KHUSH, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, **35**:25-34.
- KOTA, M.; DANIELL, H.; VARMA, S.; GARCZYNSKI, S.F.; GOULD, F.; MOAR,

- W.J. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) *cry2Aa2* protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and *Bt*-resistant insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**:1840-1845.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, M.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; MC PHERSON, D.; MEGHIJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. 1993. Field performance of elite transgenic corn plants expressing insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *BioTechnology*, **11**:194-200.
- KUMAR, P.A.; MANDAOKAR, A.; SREENIVASU, K.; CHAKRABARTI, S.K.; BISARIA, S.; SHARMA, S.R.; KAUR, S.; SHARMA, R.P. 1998. Insect-resistant transgenic brinjal plants. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **4**:33-37.
- LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GRANDVALET, C.; SLAMITOU, S.; GOMINET, M. 2000. Regulation of toxin virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Medical Microbiology*, **290**:295-299.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE; LECADET, M.-M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: P. ENTWISTLE; J.S. CORY; M.J. BAILEY; S. HIGGS (eds.), *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. Chichester, John Wiley & Sons, p. 37-69.
- LIGHTWOOD, D.J.; ELLAR, D.J.; JARRETT, P. 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* CryIAC δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**:5174-5181.
- LIU, Z.C.; YE, G.Y.; HU, C. 2004. Effects of *Bacillus thuringiensis* transgenic rice and chemical insecticides on arthropod communities in paddy-fields. *Chinese Journal of Applied Ecology*, **15**:2309-2314.
- LIU, Z.C.; YE, G.Y.; HU, C.; DATTA, S.K. 2002. Effects of *Bt* transgenic rice on population dynamics of main nontarget insect pests and dominant spider species in rice paddies. *Acta Phytophysiologica Sinica*, **29**:138-144.
- LOC, N.T.; TINJUANGJUN, P.; GATEHOUSE, A.M.R.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, J.A. 2002. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **9**:231-244.
- MANDAOKAR, A.D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R.P.; ALTOSAAR, I.; KUMAR, P.A. 2000. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hübner). *Crop Protection*, **19**:307-312.
- MAQBOOL, S.B.; HUSNAIN, T.; RIAZUD-DIN, S.; MASSON, L.; CHRISTOU, P. 1998. Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel δ -endotoxin *cryIIA* *Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **6**:1-7.
- MCBRIDE, K.E.; SVAB, Z. SCHAAF, D.J.; HOOGAN, P.S.; STALKER, D.M.; MALIGA, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *BioTechnology*, **13**:362-365.
- MCCOWN, B.H.; MCCABE, D.E.; RUSSELL, D.R.; ROBISON, D.J.; BARTO, K.A.; RAFFFA, K.F. 1991. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, **9**:590-594.
- MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T. de; MARTINS, E.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA C.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; BERRY, C. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control*, **41**:291-295.
- NAYAK, P.; BASU, D.; DAS, S.; BASU, A.; GHOSH, M.; SEN, S.K. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAC δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**:2111-2116.
- O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T.R.; BURGESS, E.P.J.; MALONE, L.A. 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology*, **50**:271-292.
- PEFEROEN, M. 1992. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. In: A.M.R. GATEHOUSE; V.A. HILDER; D. BOULTER (eds.), *Plant genetic manipulation for crops protection*. Wallingford, CAB, p. 135-153.
- PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; EAGAN, N.; ROUSH, R.T.; SHEWMAKER, C.K.; JONES, A.; OAKES, J.V.; MCBRIDE, K.E. 1993. Genetically improved potatoes: Protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology*, **22**:313-321.
- PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.O.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; FISHHOLFF, D.A. 1990. Insect resistant cotton plants. *BioTechnology*, **8**:939-943.
- PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; MCPHERSON, S.L.; FISHHOLFF, D.A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **88**:3324-3328.
- PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. 2002. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa biotecnológica aplicada ao manejo de insetos. *Biociências*, **10**(2):3-13.
- RICO, E.; BALLESTER, V.; MENSUA, J.L. 1998. Survival of two strains of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on transgenic potatoes expressing a *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Agronomie*, **18**:151-155.
- ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, **24**:63-71.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J.; LERECULUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(3):775-806.
- SCHULZ, R. 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A review. *Journal of Environmental Quality*, **33**:419-448.
- SELVAPANDIYAN, A.; REDDY, V.S.; KUMAR, P.A.; TEWARI, K.K.; BHATNAGAR, R.K. 1998. Transformation of *Nicotiana tabacum* with a native *cryIIa5* gene confers complete protection against *Heliothis armigera*. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **4**:473-478.
- SHELTON, A.M.; SEARS, M.K. 2001. The monarch butterfly controversy: Scientific interpretations of a phenomenon. *The Plant Journal*, **27**:483-488.
- SHU, Q.Y.; YE, G.Y.; CUI, H.R.; CHENG, X.Y.; XIANG, Y.B.; WU, D.X.; GAO, M.W.; XIA, Y.W.; HU, C.; SARDANA, R.; ALTOSAAR, I. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, **6**:433-439.
- SOSBAI (SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO). 2005. *Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil*. Santa Maria, Editora Pallotti, 159 p.
- STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAUX, G.; TUCKER, D.; PARROT, W.A. 1996a. Genetic transformation recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* *cryIA(c)* gene. *Plant Physiology*, **112**:121-129.
- STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; RAMACHANDRAN, S.; PARROTT, W.A. 1996b. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* *cryIAC* gene. *Plant Physiology*, **112**:115-120.
- STRIZHOV, N.; KELLER, M.; MATHUR, J.; KONCZ-KALMAN, K.; BOSCH, D.; PRUDOVSKY, E.; SCHELL, J.; SNEH, B.; KONCZ, C.; ZILBERSTEIN, A. 1996. A synthetic

- cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**:1512-15017.
- TANG, W.; CHEN, H.; XU, C.; LI, X.; LIN, Y.; ZHANG, Q. 2006. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cryIC** gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improving*, **18**(1):1-10.
- TU, J.M.; ZHANG, G.A.; DATA, K.; XU, C.G.; HE, Y.Q.; ZHANG, Q.F.; KHUSH, G.S.; DATTA S.K. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nature Biotechnology*, **18**:1101-1104.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DEBEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **327**:33-37.
- VELKOV, V.V.; MEDVINSKY, A.B.; SOKOLOV, M.S.; MARCHENKO, A.I. 2005. Will transgenic plants adversely affect the environment? *Journal of Biosciences*, **30**(4):515-548.
- WANG, Z.; SHU, Q.; YE, G.; CU, H.; WU, D.; ALTOSAAR, I.; XIA, Y. 2002. Genetic analysis of resistance of *Bt* rice to stripe stem borer (*Chilo suppressalis*). *Euphytica*, **123**:379-386.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 1999. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 217: Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*. Geneva. Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>, accessed on: 20/07/2007.
- WILLIAMS, S.; FRIEDRICH, L.; DINCHER, S.; CAROZZI, N.; KESSMANN, H.; WARD, E.; RYALS, J. 1993. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expression in transgenic plants. *BioTechnology*, **7**:194-200.
- WU, C.; FAN, Y.; ZHANG, C.; OLIVA, N.; DATTA, S.K. 1997. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIAb* gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*, **17**:129-132.
- WUNN, J.; KLOTI, A.; BURKHARDT, P.K.; BISWAS, G.C.C.; LAUNIS, K.; INGLESIAS, V.A.; POTRYKUS, I. 1996. Transgenic indica rice breeding line IR 58 expressing a synthetic *cryA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective pest control. *BioTechnology*, **14**:171-176.
- YE, G.Y.; TU, J.; CUI, H.; DATTA, K.; DATTA, S.K. 2001. Transgenic IR72 with fused *Bt* gene *cryIAb/cryIAc* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species under field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, **18**:125-133.
- YE, G.Y.; YAO, H.W.; SHU, Q.Y.; CHENG, X.; HU, C.; XIA, Y.W.; GAO, M.W.; ALTOSAAR, I. 2003. High level of stable resistance in transgenic rice with a *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) under field conditions. *Crop Protection*, **22**:171-178.
- ZHAO, J.Z.; LI, Y.X.; COLLINS, H.L.; CAO, J.; EARLE, E.D.; SHELTON, A.M. 2001. Different cross-resistance patterns in the diamond-back moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin *cryIC*. *Journal of Economic Entomology*, **94**:1547-1552.

Submitted on December 11, 2007.

Accepted on June 9, 2008.