

# Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga

## Introdução

A biotecnologia moderna está gerando um grande número de genes passíveis de serem utilizados para a melhoria genética do milho, e as técnicas de transformação genética de plantas poderão ser empregadas para alterar a funcionalidade *in vivo* destes genes via complementação, superexpressão ou silenciamento. Progressos expressivos foram conseguidos no desenvolvimento da tecnologia de transformação genética de milho na última década. A transformação genética do milho, considerada por algum tempo problemática, tornou-se, atualmente, um procedimento de rotina para vários genótipos na maioria dos laboratórios públicos e privados trabalhando com esta cultura. Nesta Circular Técnica, serão abordados aspectos da produção e utilização em campo do milho Bt, englobando desde as pesquisas iniciais para o isolamento e caracterização dos genes *cry*, sua transferência para cultivares de milho via biobalística ou *Agrobacterium*, sua integração em programas de melhoramento clássico assistido por marcadores moleculares e utilização destas novas cultivares em campo.

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2009

### AUTORES

Andréa Almeida Carneiro  
Ph.D. – Bióloga – Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas – MG  
andreaac@cnpms.embrapa.br

Cláudia Teixeira Guimarães –  
Doutora – Engenheira Agrônoma - Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 - Sete Lagoas – MG - claudia@cnpms.embrapa.br

Fernando Hercos Valicente – Ph.D. – Engenheiro Agrônomo - Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 - Sete Lagoas – MG - valicent@cnpms.embrapa.br

José Magid Waquil  
Ph.D – Engenheiro Agrônomo - Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 - Sete Lagoas – MG jmwquil@gmail.com

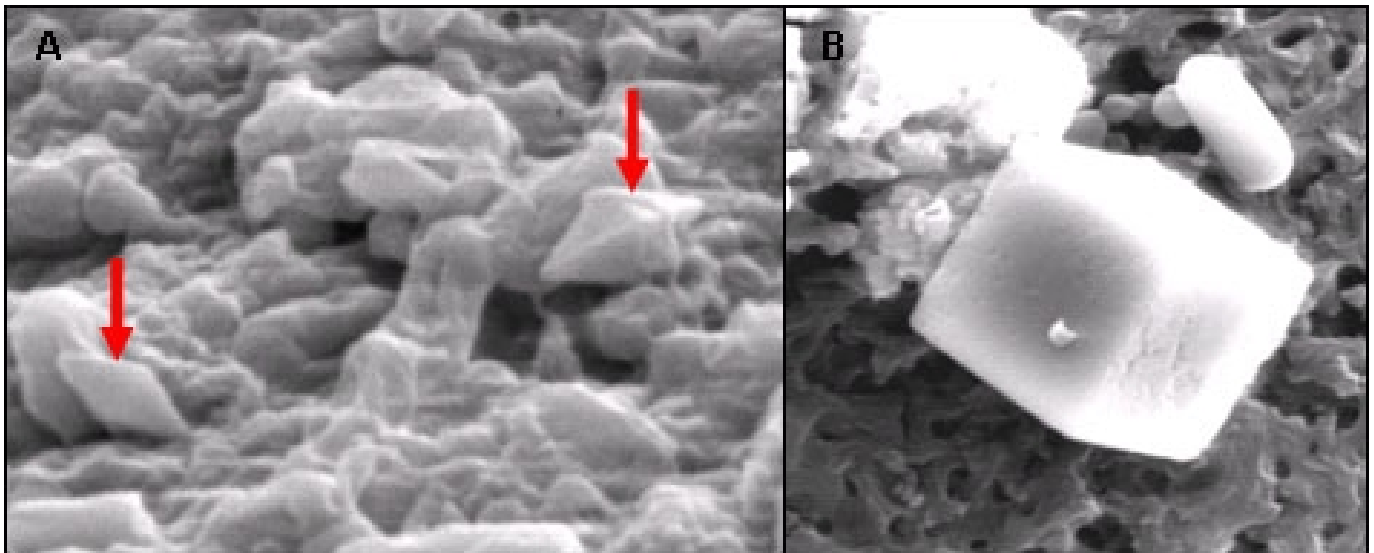
Maria José Villaça Vasconcelos  
Ph.D. – Farmacêutica – Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 - Sete Lagoas – MG mjose@cnpms.embrapa.br

Newton Portilho Carneiro  
Ph.D – Biólogo – Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas – MG  
newtonc@cnpms.embrapa.br

Simone Martins Mendes  
Doutora – Engenheira Agrônoma – Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970 - Sete Lagoas – MG - simone@cnpms.embrapa.br

## *Bacillus thuringiensis*

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram positiva, que pode ser caracterizada pela sua habilidade de formar cristais proteicos durante a fase estacionária e/ou de esporulação. O Bt ocorre naturalmente em diversos *habitats* incluindo solo, filoplano, resíduos de grãos, poeira, água, matéria vegetal e insetos. O cristal proteico também chamado de delta-endotoxinas, possui propriedades inseticidas específicas. Este cristal proteico é responsável por 20-30% da proteína total da célula (BOUCIAS; PENLAND, 1998) e pode ter várias formas, tais como: bipiramidal, esféricos, retangulares, cuboides e irregulares (Fig.01). Os cristais bipiramidais apresentam uma maior frequência de toxicidade do que os outros tipos e a maioria dos isolados que possuem alguma atividade contra os lepidópteros possuem este tipo de cristal (TYRELL et al., 1981). O mecanismo de ação das proteínas Cry de Bt envolvem a solubilização do cristal no intestino médio do inseto, a ação de proteases sobre a protoxina, a aderência da toxina Cry aos receptores do intestino médio e a sua inserção dentro da membrana apical criando canais de íons ou poros. A degradação dos cristais proteicos por enzimas proteolíticas libera proteínas tóxicas menores, chamadas de delta endotoxinas. A atividade das delta-endotoxinas estão restritas ao trato digestivo dos insetos. Após a solubilização, muitas protoxinas devem ser processadas por proteases presentes no intestino médio do inseto para se tornarem toxinas ativas (TOJO; AIZAWA, 1983). As proteínas Cry ativadas funcionam junto a receptores e canais iônicos do intestino.



**Figura 01:** Cristal de cepas de *Bacillus thuringiensis*. (A) Forma bipiramidal da cepa 344; (B) forma cubóide da cepa 1644 (VALICENTE; SOUZA, 2004).

Este patógeno é ativo contra várias espécies de insetos e é considerado seguro em relação aos mamíferos. Outra vantagem para a sua utilização é a especificidade em relação aos insetos-praga das diferentes culturas. A nomenclatura até 1998 abrangia cinco genes principais: *cryI*, *cryII*, *cryIII*, *cryIV* e *cryV*. Hoje, devido ao grande número de genes que são estudados e sequenciados, usam-se números arábicos: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*... até *cry50*. Os genes *cry1*, *cry2* e *cry9* são específicos em relação aos lepidópteros, *cry2* são ativos contra dípteros e *cry3*, *cry7* e *cry8* contra coleópteros, *cry5*, *cry12*, *cry13* e *cry14* são ativos contra nematoides e, *cry2*, *cry4A*, *cry10*, *cry11*, *cry17*, *cry19*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39* e *cry40* são ativos contra dípteros. Devido ao grande número de coleções de Bt no mundo, hoje a atualização dos genes Bt é feita através do website.

Os genes *cry1* codificam protoxinas que variam de 130-160kDa, as quais combinam com os cristais de forma bipiramidal, possuem tipicamente mais do que um produto gênico. A proteína Cry1A é o tipo mais comum de cristal encontrado dentre as cepas de Bt (CERÓN et al., 1994) e o gene *cry1Ab*, o mais distribuído entre as diferentes subespécies de Bt (YAMMAMOTO; POWELL, 1993).

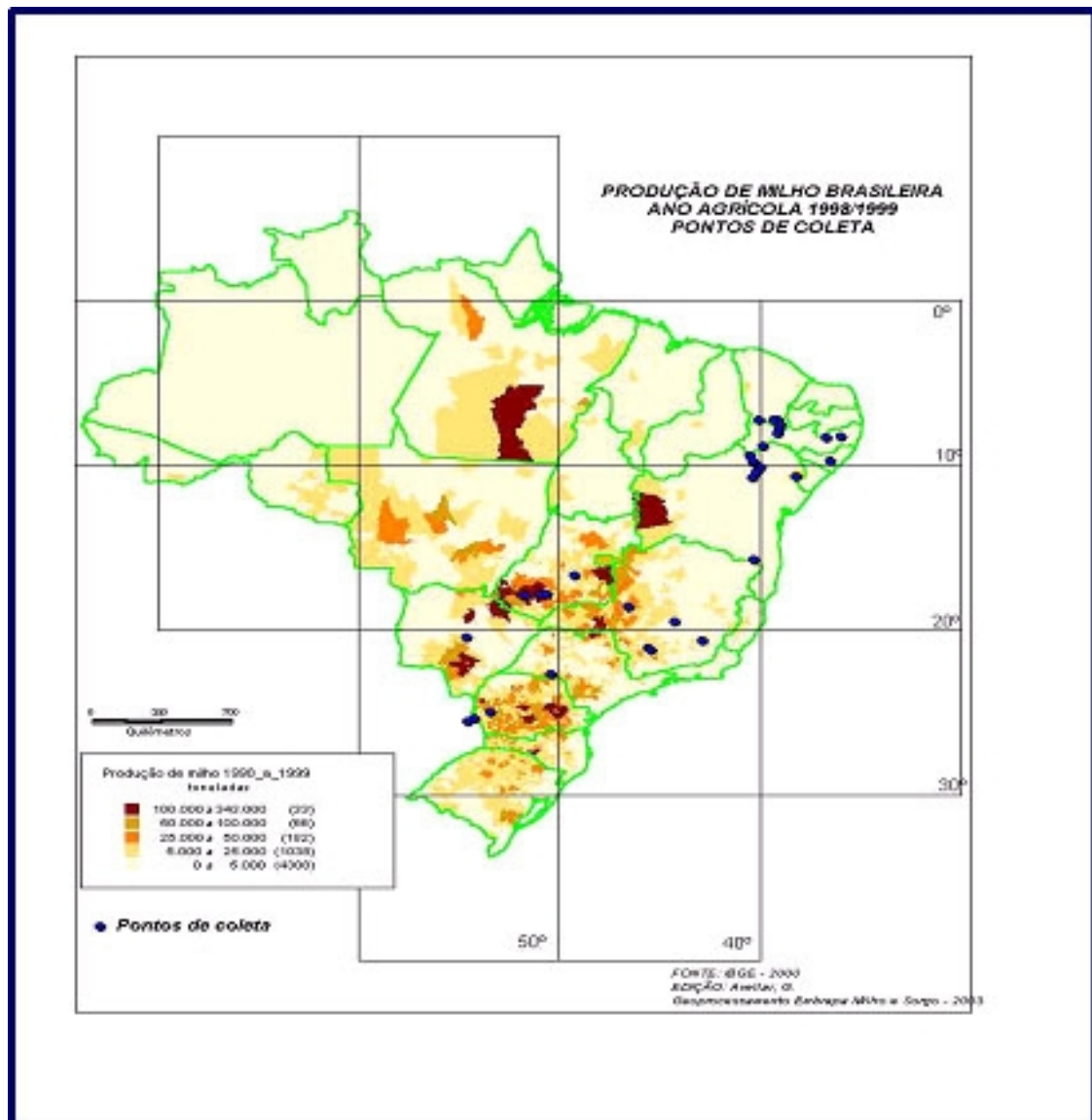
### **Toxinas Bt**

As formulações disponíveis no mercado à base de Bt representam 90% das vendas do biopesticidas (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000) e têm sido usadas por mais de 40 anos para o controle de pragas das ordens Lepidoptera e, mais recentemente, Diptera. As primeiras plantas transgênicas produzidas contendo genes *cry* não apresentaram resultados satisfatórios, pois os níveis de expressão dos genes nativos eram inferiores aos necessários para promover uma proteção adequada contra as espécies-alvo no campo. Esta baixa concentração de proteínas Cry ocorreu devido ao fato de existirem variações no uso do códon para o mesmo aminoácido entre espécies e estas variações podem afetar negativamente a expressão gênica (GUSTAFSSON et al., 2004). Nem todos os organismos usam o mesmo códon para os mesmos aminoácidos na mesma frequência. Por exemplo, em milho, o códon AAG é utilizado preferencialmente do que o códon AAA para o aminoácido lisina. Similarmente, o códon GCC é mais utilizado para a alanina do que os códons GCU, GCA e GCG (LIU, 2009). Devido a esta preferência por códons existente entre diferentes grupos de organismos, quando genes *cry* de *B. thuringiensis* são inseridos em plantas, apenas uma pequena quantidade da proteína Cry de

interesse é expressa. Ademais, genes bacterianos possuem um baixo conteúdo de C+G, contrastando com os genes de plantas (CAMBEL; GOWRI, 1990; MURRAY et al., 1989). As sequências nucleotídicas bacterianas, ricas em A+T podem ser reconhecidas por plantas como sítios de "splice" (LIU, 2009), sinais de poliadenilação (JOSHI, 1987; DIEHN et al., 1998) ou elementos de desestabilização do RNA, tais como ATTTA (SHAW; KAMEN, 1986; OHME-TAKAGI et al., 1993). Portanto, para aumentar a expressão de um gene *cry* no organismo receptor, estes genes devem ser "recodificados" ao nível de nucleotídeos, não apenas aproximando o conteúdo de G+C do gene *cry* de Bt ao do milho, mas também mudando o códon preferencial dos aminoácidos. Assim, uma maior abundância de tRNAs e tRNA transferases estará disponível para ser acoplada às sequências nucleotídicas alvos (IKEMURA, 1985). Por exemplo, os genes *cry* foram recodificados para a expressão em plantas (PERLAK et al., 1991), o que aumentou o nível da proteína Cry em até 100 vezes (GUSTAFSSON et al., 2004).

### **Isolamento e caracterização de genes *cry***

A manipulação genética de genes *cry* em *B. thuringiensis* pode se tornar um meio promissor de melhorar a eficiência e a relação custo/benefício de bioinseticidas e de plantas transgênicas expressando estes genes. Diferentes isolados de Bt podem mostrar uma amplitude muito grande na atividade tóxica contra a mesma espécie, sendo que um isolado pode ser muito ativo contra uma espécie e virtualmente inativo contra outra (JARRET; BURGESS, 1982). Existem algumas combinações de proteínas Cry que mostram uma toxicidade sinérgica em relação aos lepidópteros (LEE et al., 1996). Estes autores relatam que em bioensaios houve sinergismo entre as proteínas CRY1Aa e CRY1Ac, enquanto que a mistura de CRY1Aa e CRY1Ab mostrou antagonismo em relação ao controle de *Lymantria dispar*. Objetivando o controle de insetos lepidópteros pragas da cultura do milho, a Embrapa Milho e Sorgo iniciou um levantamento de cepas de Bt em diferentes regiões do Brasil, incluindo regiões produtoras e não produtoras de milho, abrangendo diferentes tipos de solos, culturas ou microclimas (resíduos de grãos, insetos mortos) (Fig. 02).

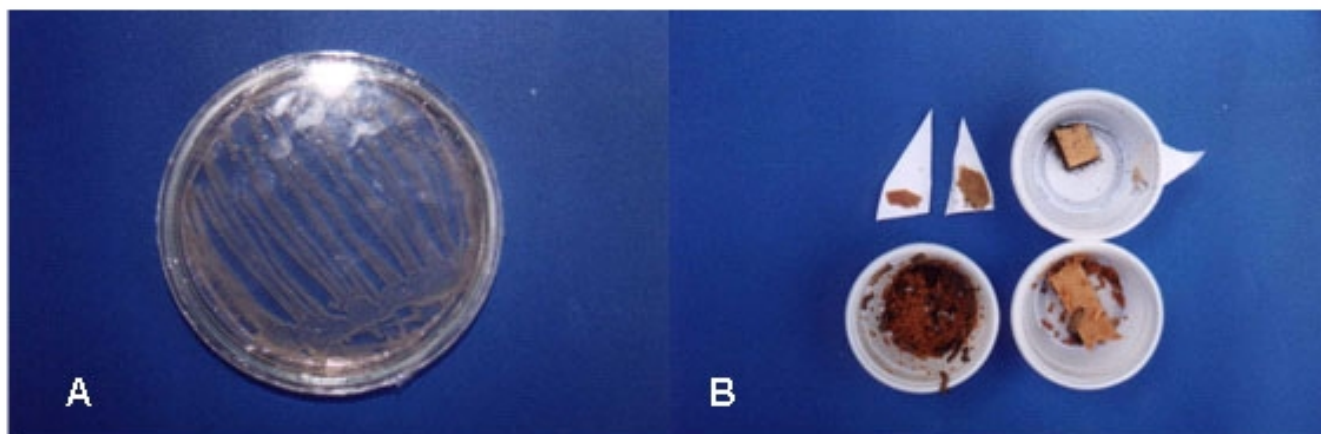


**Figura 02:** Mapa representando os pontos de amostragem (em azul) nas diversas regiões Brasileiras

Todos os isolados de Bt obtidos são testados contra *Spodoptera frugiperda*, ou lagarta-do-cartucho *in vitro*, sendo realizada a caracterização molecular daqueles mais eficientes. O isolamento de cepas de Bt é confirmado por meio de microscópio de contraste de fase, através da observação dos cristais proteicos. Bioensaios para avaliação da toxicidade das cepas para *S. frugiperda* são realizados, expondo larvas de dois dias de idade, criadas em dieta artificial, a uma suspensão de esporos e cristais (Fig 03). As lagartas (25 larvas/bioensaio/cepa) são acondicionadas em recipientes plásticos descartáveis (50 mL) a uma temperatura de 27°C, umidade relativa de 70% e fotofase de

14h/10h. As cepas são consideradas eficientes quando a mortalidade é superior a 75%. Até o presente momento, foram coletadas 1755 amostras de solo de dez diferentes estados brasileiros, abrangendo quatro diferentes regiões e com um saldo total de aproximadamente 4.700 cepas isoladas. Deste total, apenas 169 cepas apresentam mortalidade acima de 75%, resultando em uma eficiência de aproximadamente 3% das cepas testadas contra a lagarta-do-cartucho. Este banco de cepas de Bt está localizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo. A maioria das cepas isoladas até o momento foram provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil.





**Figura 03:** Bioensaio para avaliação da toxicidade das cepas de *Bacillus thuringiensis* para *S. frugiperda*. (A) *Bacillus thuringiensis* crescendo *in vitro*; (B) diferentes estádios de larvas de *Spodoptera frugiperda* acondicionadas em recipientes plásticos descartáveis

A literatura menciona que 13 sorovarietades de *B. thuringiensis* foram testadas em larvas de *S. frugiperda* e relata que os serovars (sv) *galleriae*, *aizawai* e *tolworthi* causaram mortalidade acima de 90%. Estes dados foram parcialmente confirmados pelos resultados obtidos no laboratório da Embrapa Milho e Sorgo, onde a sv *tolworthi* matou acima de 95%. Entretanto, as sv *galleriae* e *aizawai* não causaram mortalidade acima de 15%. Bohorova et al. (1995) testaram mais de 400 cepas contra as principais pragas da cultura do milho e os resultados mostraram que 99% dos isolados causaram mortalidade abaixo de 50%. Estes números são importantes porque mostram a dificuldade de se encontrar isolados de Bt eficientes no controle da lagarta-do-cartucho. Esta dificuldade em controlar lagartas de *S. frugiperda* com as proteínas Cry é confirmada por Baum et al. (1999), que afirma poder haver variação dentro do mesmo gênero.

Atualmente, a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é uma das técnicas moleculares mais usadas na caracterização de cepas de *B. thuringiensis* (CAROZZI et al., 1991; CERÓN et al., 1994, 1995; BRAVO et al., 1998; VALICENTE et al., 2000). Dentre as cepas mais eficientes da coleção da Embrapa Milho e Sorgo, a maioria dos isolados apresentou os genes *cry1Ab* e *cry1E*, algumas, os genes *cry1B*, *cry1*, *cry1Fb* e apenas uma cepa até o momento, o *cry1C* (VALICENTE et al., 2000;

VALICENTE; BARRETO, 2003). Bravo et al. (1998) fizeram uma caracterização de genes *cry* de uma coleção mexicana de *B. thuringiensis* e encontraram os genes *cry1D* e *cry1C* como os mais tóxicos para lagartas de *S. frugiperda* e *S. exigua*.

Genes *cry* presentes nas cepas isoladas da Embrapa Milho e Sorgo que apresentam alta eficiência contra a lagarta-do-cartucho estão sendo isolados, caracterizados e testados *in vivo* em plantas transgênicas de milho.

### **Transformação genética de milho**

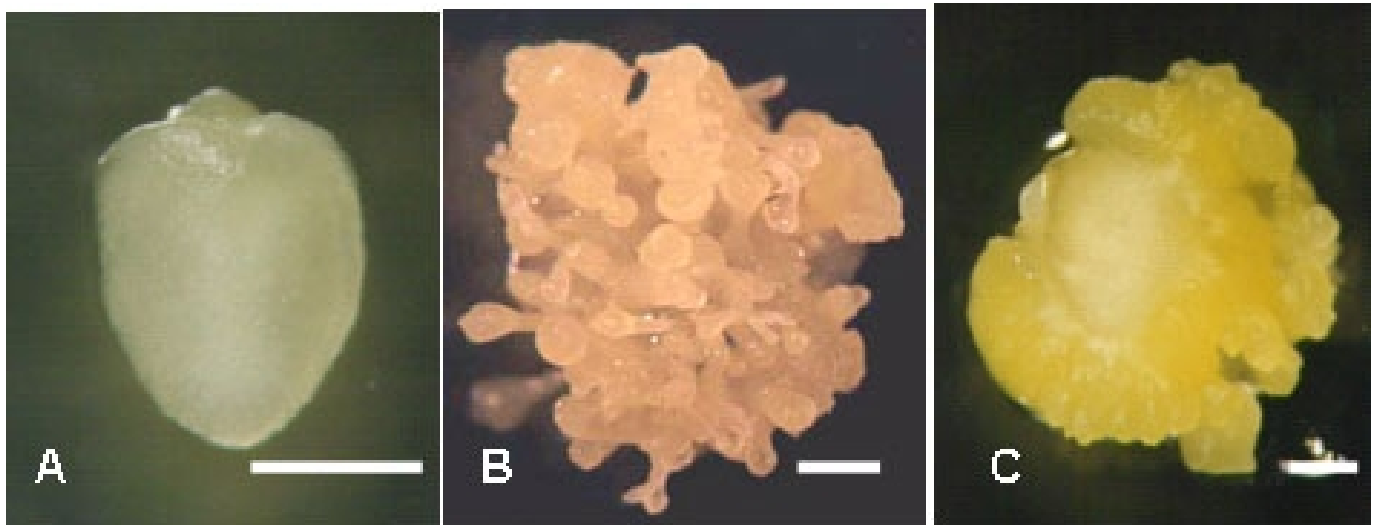
Para a produção de milho transgênico Bt, há três requisitos básicos: (i) regeneração *in vitro* do tecido vegetal que será transformado; (ii) a metodologia para a inserção do gene *cry* no genoma do milho; (iii) a construção gênica, com genes *cry* e marcadores de seleção.

### **Cultura de tecidos de milho visando à produção de plantas transgênicas**

O desenvolvimento de técnicas de culturas de células e tecidos, aliado à tecnologia do DNA recombinante, tem ampliado consideravelmente o potencial de utilização dos métodos de cultura *in vitro* para a produção de plantas de milho

transgênicas. Como parte desse processo, o estabelecimento de sistemas de regeneração de plantas a partir de células somáticas constitui-se em um pré-requisito de fundamental importância. A metodologia mais utilizada para regeneração do milho *in vitro* é a embriogênese somática, a qual tem a vantagem de produzir uma estrutura bipolar que pode, teoricamente, ser germinada e regenerada em um só passo. No milho, a regeneração de plantas via embriogênese somática pode ocorrer a partir de

calos do Tipo I ou Tipo II (ARMSTRONG; GREEN, 1985). Os calos do Tipo I são compactos, amarelos ou brancos e normalmente capazes de regenerar plantas. Os calos descritos como do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (Fig.4). As culturas formadoras de calos do Tipo II crescem rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos facilmente regeneráveis (VASIL, 1987).



**Figura 04:** Calos embriogênicos de milho. (A) Embrião zigótico de milho utilizado como explante para a produção de plantas transgênicas; (B) embriões somáticos de milho da linhagem A188 / calo do Tipo II; (C) embriões somáticos de milho da linhagem L3 / calo do Tipo I

Embora calos do Tipo II sejam os mais eficientes na produção de plantas transgênicas de milho, calos do Tipo I podem também ser utilizados. A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, apenas um número limitado de genótipos de milho são capazes de expressar este fenótipo em meio de cultivo, notadamente a linhagem A188 (ARMSTRONG; GREEN, 1985) e o híbrido Hill (ARMSTRONG et al., 1991).

Com o avanço da metodologia do cultivo *in vitro* e, particularmente, com alterações na composição dos meios de cultura e nas relações e doses dos reguladores de crescimento, passou a ser possível a regeneração de um crescente número de genótipos (NOVAK et al., 1983; LUPOTTO,

1986; RAPELA, 1985; DUNCAN et al., 1985; PHILLIPS et al., 1988; PRIOLI; SILVA, 1989). No entanto, a maioria destes genótipos forma apenas calos compactos do Tipo I.

Apesar da maioria dos genótipos de milho capazes de regenerar plantas ser de adaptação a clima temperado, genótipos de adaptação tropical capazes de regeneração têm também sido identificados (CARVALHO et al., 1994; BOHOROVA et al., 1995; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2000; PETRILLO et al., 2008), o que indica a possibilidade de manipular genótipos-elite tropicais via transformação genética.

Embriões zigóticos imaturos são os explantes preferidos para a geração de culturas

embriogênicas e produção de plantas transgênicas de milho.

### **Métodos de transformação genética de milho**

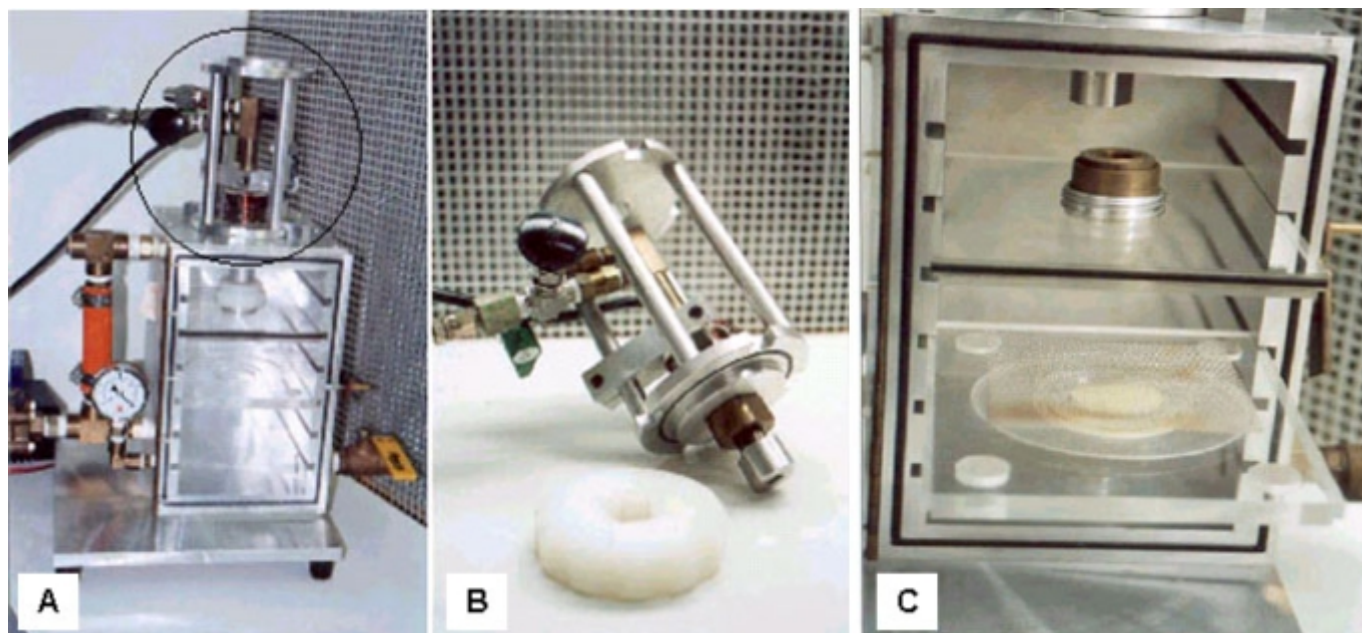
Os diferentes métodos de transformação genética de milho podem ser divididos em dois grupos principais: métodos indiretos e métodos diretos. A transformação genética através do método indireto utiliza uma bactéria, *Agrobacterium tumefaciens*, para introduzir o gene de interesse (GDI) no genoma do milho. Já na transformação através de métodos diretos, o GDI é introduzido no genoma sem a intervenção de uma bactéria. O método direto mais usado para a produção de milho geneticamente modificado é o bombardeamento de células de milho com micropartículas metálicas.

### **Transformação de milho usando o bombardeamento com micropartículas**

O bombardeamento de células vegetais com DNA de interesse é um método direto de transformação desenvolvido para introduzir ácidos nucleicos no genoma ou plasmoma de células (TAYLOR; FAUQUET, 2002). É uma metodologia comumente utilizada por laboratórios trabalhando com transformação genética de plantas. Foi desenvolvida no final

dos anos 80 para manipular o genoma de plantas recalcitrantes à transformação mediada por *Agrobacterium*, dentre as quais, são incluídos os cereais (KLEIN et al., 1987, 1988; TAYLOR; FAUQUET, 2002). Na transformação via bombardeamento de partículas ou biobalística, micropartículas de metal cobertas com o gene de interesse (GDI) são aceleradas em direção às células-alvo, utilizando equipamentos conhecidos como "gen gun" ou canhão gênico (SANFORD et al., 1987; SANFORD, 1988), com velocidades suficientes para penetrar a parede celular e não causar a morte da célula (Fig. 5). O DNA precipitado sobre as micropartículas é liberado gradualmente dentro da célula pós-bombardeamento e integrado ao genoma (KLEIN et al., 1987; TAYLOR; FAUQUET, 2002). A aceleração das micropartículas é obtida por uma faísca de alta tensão elétrica ou uma descarga de hélio. As partículas utilizadas devem ser não-tóxicas, não-reativas, e menores que o diâmetro da célula-alvo. Normalmente são utilizadas micropartículas de ouro ou tungstênio. No método original, um sistema de aceleração à base de pólvora foi usado para impulsionar DNA revestido por partículas de tungstênio, que penetraram a membrana plasmática, resultando na expressão gênica (KLEIN et al., 1987). Dispositivos modernos, como por exemplo PDS 1000 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.), utilizam o gás hélio ou, no caso do gene gun Accell (Agracetus, Inc., Middleton, WI, E.U.A.), a eletricidade para impulsionar micropartículas em direção a células-alvo.





**Figura 05:** Equipamento utilizado para transformação de milho via bombardeamento de partículas. (A) Vista do equipamento completo; (B) acelerador das partículas metálicas; (C) bandeja contendo embriões imaturos zigóticos para serem bombardeados

Vários parâmetros físicos correlacionados com o equipamento de biobalística, tais como pressão, distância de voo do macrocarreador e dos microcarreadores, e vácuo precisam ser otimizados para o sucesso da transformação. Além destes parâmetros, os biológicos, relacionados ao material vegetal e ao GDI que será utilizado, também devem ser estudados em experimentos preliminares (SANFORD et al., 1993).

A partir da década de 90, a biobalística foi utilizada para transformar uma grande variedade de plantas, inclusive o milho. Gordon-Kamm et al. (1990) e Fromm et al. (1990) foram os primeiros grupos a relatarem a produção de milho transgênico a partir do bombardeamento de calos embriogênicos. Em seguida, vários relatos de transformação de milho comprovaram que o bombardeamento de partículas é uma técnica bem sucedida para inserir genes exógenos no genoma do milho, e com alta reprodutibilidade de resultados (KOZIEL et al., 1993; BRETTSCHEIDER et al., 1997; FRAME et al., 2000).

As principais vantagens do bombardeamento estão relacionadas com a utilização de vetores

simples e de fácil manipulação, além da possibilidade da inserção de mais de um gene de interesse nas células de maneira eficiente (CHEN et al., 1998; WU et al., 2002). Embora seja considerado um método de transformação bastante eficiente para o milho, uma possível desvantagem é a ocorrência de múltiplas cópias do GDI e de complexos padrões de integração suscetível ao silenciamento da expressão gênica nas gerações futuras (WANG; FRAME, 2004).

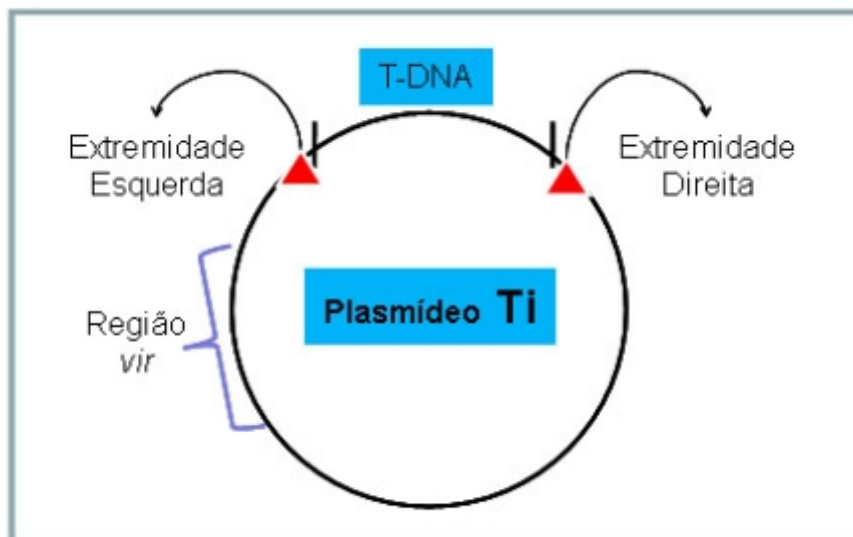
### ***Transformação de milho mediada por *Agrobacterium****

Durante vários anos, a transformação de monocotiledôneas via *Agrobacterium* tinha uma eficiência muito baixa. Entretanto, recentemente este cenário está mudando e esta metodologia de transferência gênica tem se tornado o método de escolha para este grupo de plantas. Este método de transformação utiliza um sistema natural de transferência de genes desenvolvido pela *Agrobacterium*. *Agrobacterium* é uma bactéria de solo capaz de causar tumores vegetais na região da infecção. Estes tumores resultam da presença do plasmídeo Ti ou



plasmídeo indutor de tumor na célula bacteriana. O plasmídeo Ti é uma molécula circular grande (200 a 800 kb) de DNA fita dupla que pode se replicar independentemente do genoma de *Agrobacterium tumefaciens* (GELVIN, 2003). Localizadas no plasmídeo Ti, encontram-se duas regiões importantes para a transferência de genes da bactéria para a planta: a região do T-DNA e a região *vir* (Fig. 06). As regiões dos T-DNAs de plasmídeos selvagens contêm genes que comandam a produção de opinas e hormônios, tais como auxina e citocinina, pela célula vegetal. As opinas são aminoácidos utilizados apenas pela

*Agrobacterium* como fonte de carbono e nitrogênio, enquanto que os hormônios são responsáveis pela indução de tumores vegetais. O T-DNA tem entre 10 e 30 Kb e suas extremidades são delimitadas por duas sequências de 25 pb altamente homólogas, denominadas extremidades direita e esquerda. *Agrobacterium* selvagem transfere o seu T-DNA através das membranas das células vegetais e o incorpora no DNA genômico da planta. O processamento do T-DNA e sua transferência para a célula vegetal ocorrem devido, em grande parte, à atividade de virulência das proteínas codificadas na região *vir* (GELVIN, 2003).



**Figura 06:** Plasmídeo Indutor de Tumor (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens*

Para viabilizar a utilização da *Agrobacterium* em processos biotecnológicos de transferência de genes para plantas, é necessário que os genes endógenos do T-DNA causadores de tumor sejam inativados e que os genes exógenos, GDI e GMS, sejam inseridos entre as extremidades direita e esquerda do T-DNA. O plasmídeo recombinante resultante é novamente colocado na *Agrobacterium* para ser transferido para células vegetais (GELVIN, 2003). Tecidos ou células transformados podem ser utilizados para regeneração de plantas transgênicas (SCHAFER et al., 1987; HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996).

Por ser muito grande, o plasmídeo Ti é difícil de ser manipulado. Portanto, foram criados os vetores binários (BEVAN, 1984), os quais são menores e capazes de multiplicar tanto em *Agrobacterium* como em *E. coli* e fáceis de manipular em laboratório. Estes vetores possuem um T-DNA artificial, no qual diferentes transgenes podem ser inseridos, e uma origem de replicação compatível com o Ti na *Agrobacterium*. Os vetores binários são introduzidos em *Agrobacterium* desarmadas, ou seja, em *Agrobacterium* que carregam plasmídeos Ti que tiveram a região do T-DNA removida. O Ti de *Agrobacterium* desarmadas ainda possui a região

de virulência (*vir*), sendo seus genes capazes de agir *in trans* para transferir o T-DNA recombinante do vetor binário (GELVIN, 2003).

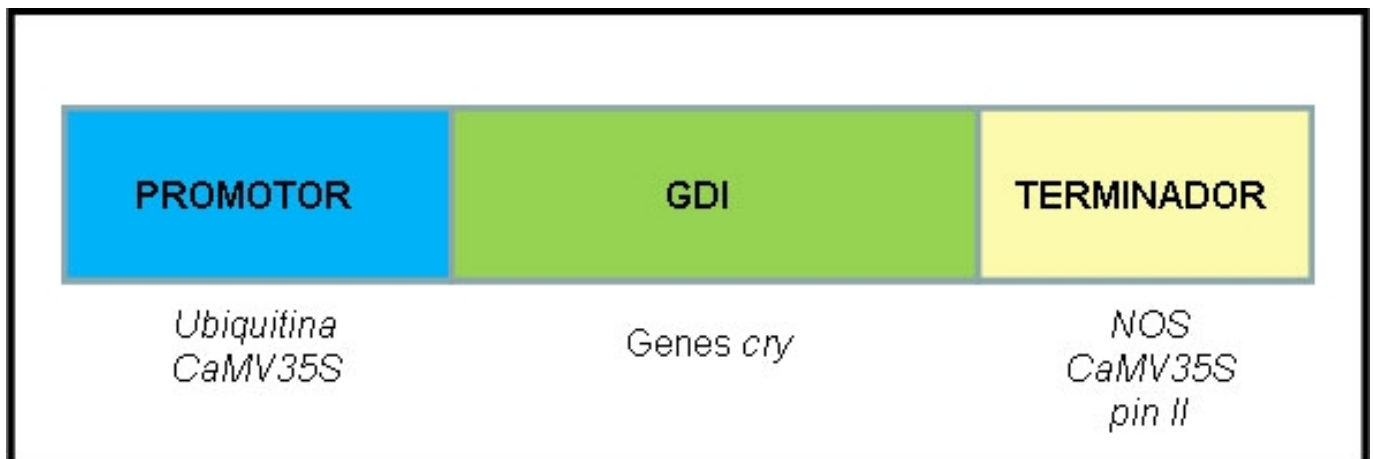
*Agrobacterium tumefaciens* constitui um excelente sistema de introdução de genes em células vegetais, uma vez que: (i) o DNA pode ser introduzido em todos os tecidos da planta, o que elimina a necessidade da produção de protoplastos; (ii) a integração do T-DNA é um processo relativamente preciso. A região do DNA a ser transferida está definida pelas sequências flanqueadoras, extremidades direita e esquerda. Ocasionalmente, produzem-se reordenações, mas, na maioria das vezes, a região é inserida intacta no genoma da planta. Normalmente, os T-DNA integrados mostram mapas genéticos consistentes e segregação adequada. Ademais, os caracteres introduzidos por esta via têm se mostrado estáveis durante muitas gerações de cruzamentos. Esta estabilidade é crítica quando se pretende comercializar as plantas transgênicas geradas (HIEI et al., 1994; ISHIDA et al., 1996).

Para o milho, a técnica de *Agrobacterium* foi relatada por resultar em alta eficiência com alto número de eventos contendo apenas uma ou um baixo número de cópias do transgene no genoma, quando comparada com a biobalística (ISHIDA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; GORDON-KAMM et al., 2002; FRAME et al., 2002; LUPOTTO et al., 2004; HUANG; WEI, 2004; ISHIDA et al., 2007).

### Construções gênicas

#### Genes de interesse e marcadores de seleção

Transgenes, isto é, os genes que são inseridos via técnicas de biologia molecular no milho são constituídos basicamente da região codificadora do gene de interesse (GDI) ou do gene marcador de seleção (GMS) e de sequências reguladoras da expressão gênica (Fig. 07).



**Figura 07:** Principais regiões componentes de um gene. Ubiquitina e CaMV35S: exemplos de promotores utilizados para direcionar a expressão dos genes cry; NOS, CaMV35S e pin II: exemplos de regiões terminadoras utilizadas para finalizar a transcrição dos genes cry

O GDI e o GMS são sequências de codificação ou ORF (Open Reading Frame) de uma determinada proteína que quando expressa define uma característica de interesse. Resistência a insetos-praga está sendo inserida em plantas transgênicas de milho via superexpressão de genes *cry* de *B. thuringiensis*.

O GMS serve para identificar e selecionar as células que tenham o DNA heterólogo integrado no genoma. GMSs são fundamentais para o desenvolvimento de tecnologias de transformação de plantas, pois o processo de transferência de um transgene para uma célula receptora e de sua integração no genoma é muito ineficiente na maioria dos experimentos, sendo que as chances de recuperação de linhas transgênicas sem seleção são geralmente muito baixas.

Atualmente, os GMSs mais utilizados para a produção de milho transgênico são aqueles que conferem tolerância a herbicidas. Dentre estes, os genes *bar*, isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, e o *pat*, isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, ambos codificando a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) (DE BLOCK et al., 1989) são frequentemente citados (GORDON-KAMM et al., 1990; ZHAO et al., 2001; ISHIDA et al., 2007).

Tanto a sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína de interesse quanto aquela que codifica para a proteína utilizada na seleção dos calos transgênicos são acompanhadas por sequências regulatórias, tais como promotores e terminadores, os quais são responsáveis pelo controle da expressão gênica.

### **Sequências controladoras da expressão gênica**

Promotores são sequências de DNA, normalmente presentes nas extremidades 5' de uma região codificadora, usadas pela RNA polimerase e fatores de transcrição para iniciar o processo de transcrição gênica (BUCHANAN et al., 2000). O promotor viral 35S, isolado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S), é um dos mais utilizados para direcionar alto nível de expressão constitutiva em plantas (ODELL et al., 1985). Entretanto, seu funcionamento em monocotiledôneas não é tão eficiente quanto em dicotiledôneas. O promotor mais utilizado para direcionar a expressão de uma proteína constitutivamente em milho é, atualmente, o promotor isolado do gene da ubiquitina de milho *Ubi1* (CHRISTENSEN; QUAIL, 2005).

As regiões 3' UTRs, também conhecidas como regiões terminadoras, são utilizadas para sinalizar o término da transcrição (LESSARD et al., 2002), impedindo que ocorra a produção de moléculas quiméricas de RNA e, conseqüentemente, a formação de novas proteínas, se o complexo da polimerase continuar transcrevendo além do seu sinal de término. As sequências 3' UTRs mais utilizadas em construções gênicas para transformação de milho incluem *nos* do gene nopaline sintase de *Agrobacterium* (DEPICKER et al., 1982), a região 3' do *CaMV35S* (FRAME et al., 2002), e a do gene inibidor de proteinase *pinII* de batata (AN et al., 1989). A Tabela I apresenta exemplos de elementos gênicos utilizados na produção de alguns eventos transgênicos de milho Bt liberados pela Comissão Técnica Nacional (CTNBio) para a utilização comercial no Brasil.

Tabela I: Elementos Genéticos Introduzidos nas Plantas de Milho Transgênicas Bt Liberadas pela CTNBio para Comercialização no Brasil (agbios, 2009)\*

| Evento   | Promotor<br>Gene de Interesse   | Gene de Interesse /<br>Origem   | Terminador<br>Gene de Interesse  | Promotor<br>Gene de Seleção   | Gene de Seleção /<br>Origem  | Terminador<br>Gene de Seleção                         |
|----------|---|---|--|---|--|---|
| BT11     | Promotor viral CaMV35S <sup>(1)</sup> ; intron IVS6 do gene álcool desidrogenase de milho   | <i>cry1Ab</i> <sup>(2)</sup> / <i>Bacillus thuringiensis</i>  | <i>A. tumefaciens</i> nopaline sintase ( <i>nos</i> )                            | Promotor viral CaMV 35S; intron IVS2 do gene álcool desidrogenase de milho      | <i>pat</i> <sup>(3)</sup> / fosfinotricina N-acetiltransferase ( <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ) | <i>A. tumefaciens</i> nopaline sintase ( <i>nos</i> ) |
| MIR 162  | Promotor do gene da poliubiquitina <sup>(4)</sup> de milho e primeiro intron - <i>ZmUbilnt</i>  | <i>vip3Aa20</i> – proteína vegetative insecticida <sup>(5)</sup> / ( <i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88) | <i>CaMV35S poly(A)</i>   | Promotor do gene da poliubiquitina de milho e primeiro intron - <i>ZmUbilnt</i> | <i>pmi</i> - mannose-6-phosphate isomerase <sup>(6)</sup> / <i>Escherichia coli</i>                      | <i>CaMV35S poly(A)</i>                                |
| MON 810  | 2X <i>CaMV 35S</i> e <i>HSP70</i> intron  | <i>cry1Ab</i> <sup>(2)</sup> / <i>Bacillus thuringiensis</i>  | Ausente no milho geneticamente modificado  |   |  |   |
| MON89034 | Promotor <i>CaMV35S</i> ; 5' sequência leader não traduzida (5'UTR) do gene "chlorophyll a/b-binding protein" de trigo; intron do gene de actina de arroz             | <i>cry1A.105</i> – delta endotoxina quimérica <sup>(7)</sup> / <i>Bacillus thuringiensis</i>                    | 3' região não traduzida do gene de trigo "heat shock protein 17.3"               | <i>CaMV 35S</i>   | Neomicina fosfotransferase II <sup>(8)</sup> ( <i>Escherichia coli</i> )                                 | <i>A. tumefaciens</i> nopaline sintase ( <i>nos</i> ) |
|          | Promotor <i>FMV-35S</i> - do Figwort Mosaic Virus; intron <i>Hsp70</i> do gene "heat shock protein" de milho; Transito peptideo do gene "RBC-small subunit" de milho. | <i>cry2Ab</i> delta-endotoxina ( <i>Bacillus thuringiensis</i> )  | <i>A. tumefaciens</i> nopaline sintase ( <i>nos</i> )                            |   |  |   |
| TC1507   | Promotor da ubiquitina ( <i>ubi</i> ) ZM de milho; primeiro exon e primeiro intron do gene da ubiquitina  | <i>cry1Fa2</i> <sup>(9)</sup> / <i>Bacillus thuringiensis</i>   | Sinal de poliadenilação do gene 3' ORF25 de ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ) | <i>CaMV 35S</i>   | <i>pat</i> <sup>(3)</sup> / fosfinotricina N-acetiltransferase ( <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ) | <i>CaMV35S poly(A)</i>                                |

\* Plantas obtidas através de cruzamento de dois ou mais eventos transgênicos não foram listadas.

<sup>(1)</sup> O promotor *CaMV35S* é um promotor constitutivo de origem viral, direciona altos níveis de expressão proteica tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas (ODELL et al., 1985)

<sup>(2)</sup> O gene *cry1Ab*, isolado da bactéria de solo gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, codifica para a proteína inseticida Cry1Ab, ativa contra insetos da ordem Lepidoptera.

<sup>(3)</sup> O gene *bar* e o gene *pat* codificam para a enzima fosfinotricin acetil transferase (PAT). Esta enzima é usada como um marcador de seleção e também como fonte de resistência aos herbicidas do grupo fosfinotricin (glifosinato) (DE BLOCK et al., 1987). O glifosinato de amônio é o princípio ativo presente em alguns herbicidas (Basta®, Rely®, Finale®, and Liberty®). O glifosinato de amônia possui estrutura química semelhante ao glutamate e age inibindo a enzima glutamina sintase. Glutamina sintase está envolvida na detoxicação de amônia. O decréscimo de atividade da glutamina sintase gera um aumento na concentração de amônia intracelular, com consequente desestruturação da membrana celular e paralisação da fotossíntese, o que provoca a morte da planta. A enzima PAT inativa o herbicida via acetilação.

<sup>(4)</sup> Ubiquitina é uma das proteínas mais conservadas em plantas. Está envolvida em vários processos celulares incluindo degradação de proteínas e reparo de DNA. É muito abundante no citoplasma da maioria das células vegetais (CHRISTENSEN et al., 1992). Este promotor é muito utilizado para direcionar a expressão constitutiva de genes heterólogos em monocotiledôneas.

<sup>(5)</sup> O gene *vip3A* foi isolado de *Bacillus thuringiensis*, codifica para a proteína vegetative Vip3A com alta toxicidade para insetos da ordem lepidoptera, incluindo *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* (ESTRUCH et al., 1996).

<sup>(6)</sup> O gene *pmi* codifica para a enzima fosfomanose isomerase (PMI), a qual é utilizada no metabolismo da manose. A manose é absorvida pela planta e convertida para manose 6-fosfato através da enzima hexokinase. A planta é incapaz de utilizar a manose 6-P. O acúmulo deste produto gera a inibição da fosfoglicose isomerase e da via metabólica da glicólise, causando uma inibição do crescimento. Plantas transgênicas que produzem PMI conseguem utilizar a manose como fonte de carbono.

<sup>(7)</sup> O gene *cry1A.105*, é um gene quimera constituído de 4 domínios de proteínas Cry já utilizadas previamente em plantas transgênicas.

<sup>(8)</sup> O gene *nptII* confere resistência à canamicina e antibióticos similares. Foi utilizado como marcador de seleção. Entretanto, depois da produção do milho transgênico, foi retirado da planta através de segregação convencional. Esta linhagem de milho não contém genes marcadores de seleção, apenas os genes de interesse *cry1A.105* and the *cry2Ab2*.

<sup>(9)</sup> O gene *cry1Fa2* codifica para a proteína Cry1F, que é letal quando ingerida apenas por larvas de insetos da ordem lepidoptera, incluindo *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*. Para otimizar a expressão da proteína Cry1F, a sequência nucleotídica do gene *cry1Fa2* foi modificada via *in vitro* mutagêneses para conter codons aminoácidos preferidos pela planta.



### **Retrocruzamento assistido para geração de linhagens de milho transgênicas**

Os processos utilizados na transformação genética de milho requerem a etapa de regeneração de plântulas *in vitro*. Nesses processos, os genótipos mais responsivos em cultura de tecidos são de origem temperada e sem qualquer adaptação agrônômica às nossas condições. Como esses genótipos são as principais fontes para a obtenção de eventos transgênicos, os transgenes precisarão ser transferidos para as linhagens elites de cada programa de melhoramento para a obtenção dos híbridos.

O método de retrocruzamento é o mais adequado quando se quer introduzir um ou poucos genes em materiais-elite, uma vez que consiste em cruzar um genitor doador, aquele que no caso possui o transgene, com um genitor recorrente, que são as linhagens elites que se deseja converter. A partir do cruzamento inicial, as progênies são selecionadas e cruzadas sequencialmente com o genitor recorrente até que se recupere o máximo do genoma recorrente, mantendo o transgene de interesse. Em um programa de retrocruzamentos, a cada geração, é recuperada, em média, a metade da constituição genética do genitor recorrente em relação à geração anterior. Assim, no primeiro ciclo de retrocruzamento, as progênies possuem, em média, 75% do genoma recorrente, no segundo, 87,5% e assim sucessivamente. Considerando que o genitor doador é, na maioria das vezes, geneticamente divergente dos genitores recorrentes, são necessários até seis ciclos de retrocruzamento para a recuperação acima de 99% do genoma recorrente.

O tempo excessivo gasto para a obtenção de linhagens transgênicas convertidas é uma das principais limitações dos programas de retrocruzamento, considerando a alta competitividade do mercado de híbridos de milho. Por outro lado, a complexidade e as exigências de biossegurança para cada evento transgênico também implicam em custo elevado e demandam tempo. Assim, a forma mais

conveniente de transferir o transgene para o germoplasma melhorado é por meio de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares. Esse processo permite a seleção de progênies que contenham o transgene com a menor região flangeadora do parental doador e com a maior recuperação do genoma recorrente de forma rápida e eficiente. Esquemas de retrocruzamento assistido têm sido descritos em detalhes para o milho por vários autores (WILLCOX et al., 2002; BOUCHEZ et al., 2002; RIBAUT; RAGOT, 2007; GUIMARÃES et al., 2009). Nessa estratégia, o aumento no custo das genotipagens com os marcadores é compensado pela redução significativa no número de gerações de retrocruzamentos para se recuperar adequadamente o genoma recorrente, considerando o alto valor agregado de um evento transgênico.

O retrocruzamento assistido pode ser realizado tanto para a seleção do transgene quanto para a seleção do genoma recorrente. A seleção do transgene com o auxílio de marcadores moleculares deve ser preferida quando a característica conferida pelo transgene não for de fácil avaliação fenotípica ou quando se deseja piramidar mais de um transgene independente. A localização do transgene no genoma é importante, uma vez que marcadores flangeando o gene-alvo reduzem a contribuição do genoma doador na região próxima ao transgene. A seleção do genoma recorrente é realizada utilizando marcadores distribuídos aleatoriamente no genoma, sendo realizada a cada ciclo de retrocruzamento após a seleção das progênies que possuam o transgene.

### **Tamanho da população e número de marcadores**

Para a identificação de um gene de herança simples, seria necessário o número mínimo de cinco plantas em cada geração de retrocruzamento, para que pelo menos uma contenha o gene-alvo com probabilidade superior a 95%, e sete plantas para que a probabilidade seja maior do que 99%. No

entanto, este número de plantas é muito pequeno para oportunizar a seleção eficiente do genoma recorrente com marcadores moleculares. Assim, para a seleção do genoma recorrente em um programa de retrocruzamento assistido, devem ser escolhidos marcadores que amostram bem o genoma da espécie, de preferência, espaçados a pelo menos 20 cM (OPENSHAW et al., 1994). Dados de simulação mostram que a utilização de 100 plantas em cada geração de retrocruzamento assistido permite a recuperação quase completa do genoma recorrente em três gerações, e que o aumento nesse tamanho de população traz pouco benefício (FRISCH et al., 1999). Considerando 100 plantas em cada uma das três gerações de retrocruzamento assistido com 80 marcadores moleculares, após 10.000 simulações, foi obtida recuperação de 97,4% do genoma recorrente, sendo necessários 5.430 dados moleculares. Utilizando uma população de 200 indivíduos, obteve-se uma recuperação de 97,8% do genoma recorrente, sendo necessários 10.500 dados moleculares. Segundo Morris et al. (2003), o uso de três ciclos de retrocruzamento assistido com marcadores é suficiente para uma recuperação superior a 99% do genoma recorrente em milho. Tais condições são importantes para a redução do tempo para a obtenção de linhagens isogênicas. Mesquita et al. (2005) obtiveram duas progênies RC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, apresentando 98,2% do genoma recorrente, utilizando 68 marcadores SSR aleatoriamente distribuídos no genoma do milho. Essa seria a porcentagem média de genoma recorrente esperada no quinto ciclo de retrocruzamento.

### **Eventos transgênicos expressando resistência ao ataque de insetos-praga**

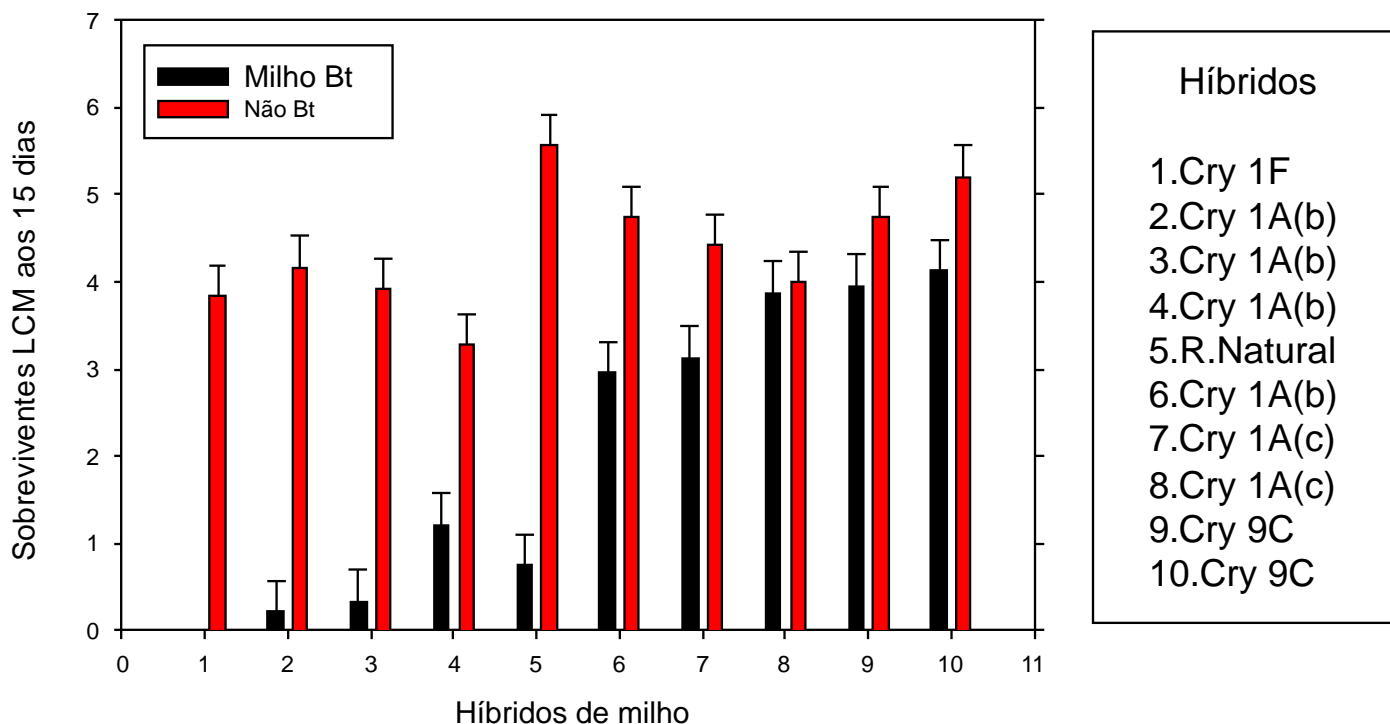
Os programas de clonagem e transformação de plantas de institutos de pesquisa e empresas atualmente são bastante intensos, gerando novidades a cada ano. Especificamente para resistência a pragas na cultura do milho, há mais de uma dezena de eventos. Alguns já estão praticamente descartados no milho, como, por exemplo, o *Cry 1Ac* e *Cry 9C*. Entre os que

estão sendo comercializados, destacam-se os eventos que expressam as toxinas *CRY 1A(b)* e *CRY 1F*, com atividade sobre os lepidópteros, e o *cry3Bb1* para o controle de coleópteros (larvas de *Diabrotica* spp.).

No Brasil, estão liberados para comercialização dois eventos expressando a toxina do Bt *CRY 1A(b)*, um evento expressando a toxina *CRY 1F* e, mais recentemente, um evento expressando a toxina *CRY 1A 105* e *CRY2A02*, com atividade sobre os lepidópteros. Estes eventos estão registrados para três espécies: a lagarta-do-cartucho do milho (LCM), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith); a lagarta-da-espiga do milho (LEM), *Helicoverpa zea* (Boddie); e a broca-da-cana-de-acúcar (BCA), *Diatraea scaccharalis* (Fabricius). Entretanto, existem dados na literatura indicando também a atividade dessas toxinas sobre a lagarta-elasmó (LEL), *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller). Indicações oriundas de usuários de campo relatam a atividade das toxinas do Bt também sobre a lagarta-militar, *Mocis latipes* (Guenée). Portanto, os eventos hoje disponíveis no Brasil oferecem proteção contra as principais espécies de lepidópteros-praga do milho. Em outros países, como nos Estados Unidos da América, essa tecnologia tem sido usada, principalmente, no controle da lagarta-européia do milho, *Ostrinia nubilalis* (Hübner), que não ocorre no Brasil, e das diferentes espécies do gênero *Diabrotica*, que lá anualmente causam grandes danos ao milho.

### **Especificidade das toxinas para os insetos-praga**

As toxinas do Bt apresentam alta especificidade e, dentro do mesmo grupo de insetos, a atividade de cada toxina é diferenciada. Estudos toxicológicos revelam diferenças significativas em nível de espécie (Fig. 08). Portanto, a estratégia de piramidação de dois ou mais genes *cry*, expressando diferentes toxinas numa mesma cultivar, não só contribui para o manejo da resistência, mas também aumenta a eficiência no controle de diferentes espécies de insetos-praga.



**Figura 08:** Médias ( $\pm$  erro padrão) do número de sobreviventes por planta 15 dias após a infestação de LCM dos híbridos contendo as toxinas relacionadas de 1 a 10, sendo o híbrido de número cinco considerado de resistência natural. Waquil et al (2002)

### **Manejo Integrado de Pragas (MIP) do milho com a utilização da tecnologia Bt**

Embora existam recomendações suficientes para a prática do manejo de pragas na cultura do milho, os dados de campo sobre o uso dessas práticas são raros, mas sabe-se que, na maioria dos casos, ainda há muito a ser melhorado.

Os resultados de pesquisa de campo com o milho Bt no Brasil ainda são insipientes, mas já é possível fazer algumas inferências sobre a prática do manejo de pragas utilizando essa tecnologia. A eficiência para algumas das espécies-alvo é bastante alta e pode dispensar

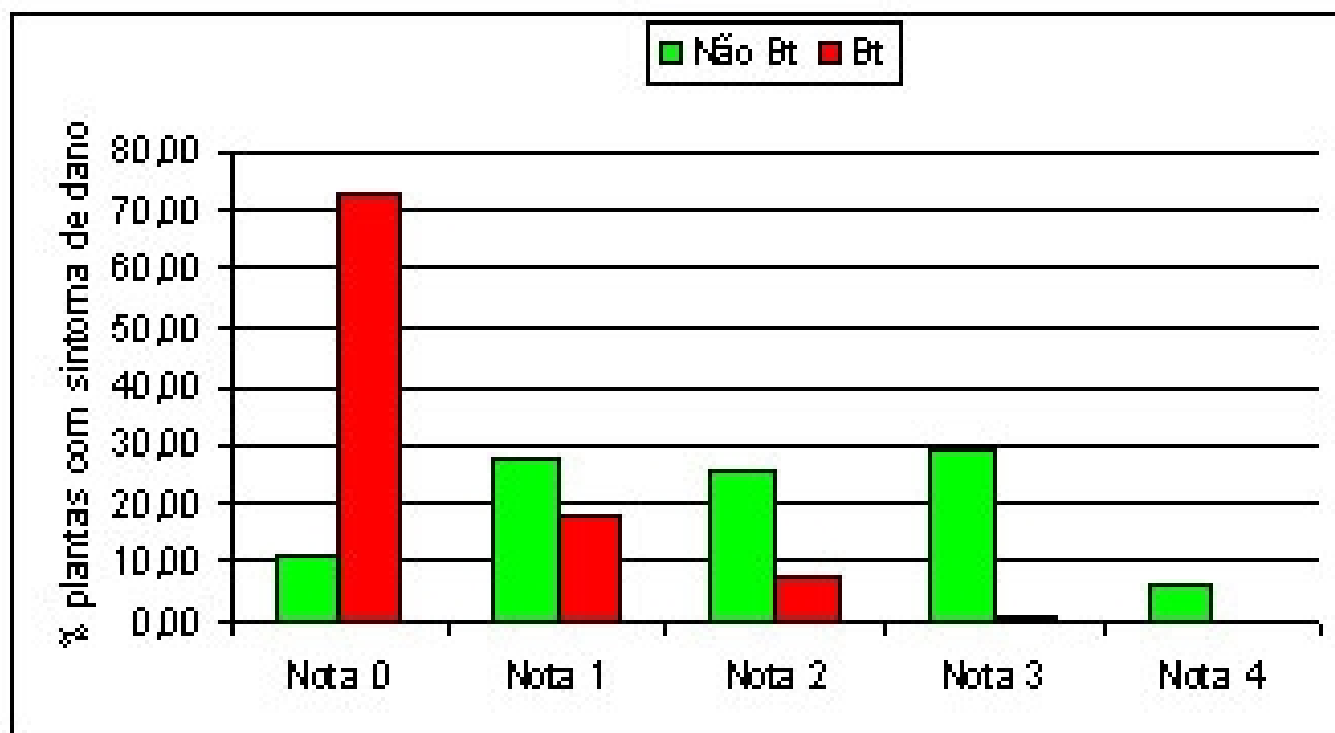
totalmente a aplicação de defensivos. Entretanto, para a LCM, os dados indicam alguma variação na proteção oferecida às plantas. Portanto, dependendo do híbrido e da intensidade de infestação, pode ser necessário controle complementar. Esta estratégia pode ser útil para o manejo da resistência, pois, o controle dos sobreviventes no milho Bt, com certeza, contribuirá para a redução da seleção de biótipos resistentes. É importante lembrar que, para a toxina do Bt se tornar ativa, precisa ser ingerida pelo inseto. Assim, o produtor certamente irá se deparar com algum sintoma de dano nas folhas do milho, como, por exemplo, folhas raspadas (Fig. 9).



**Figura 09:** Sintomas de danos causados pela alimentação de *Spodoptera frugiperda* (Smith) em folhas de milho Bt contendo a toxina Cry 1 A(b) (A) e em folhas do isogênico não-Bt (B), Sete Lagoas-MG, outubro de 2008

Outro aspecto importante a ser observado é que a intensidade do dano causado pela alimentação é muito menor, quando comparado aos isogênicos não-Bt (Fig. 10). Os resultados obtidos na safra 2008/2009 (primeira safra cultivada com milho Bt no país) revelaram certa variabilidade no nível de proteção das plantas

contra o ataque da LCM. Avaliações realizadas em Minas Gerais indicam que o milho Bt protegeu o milho de forma equivalente a, pelo menos, três aplicações de inseticidas. Em média, os híbridos Bt têm produzido cerca de até 20% a mais do que os equivalentes não-Bt .



**Figura 10:** Avaliação de danos de *Spodoptera frugiperda*, através de escala de nota (0 a 4), em milho não-Bt e isogênico Bt, Sete Lagoas-MG, outubro de 2008



## **Regras para utilização do milho Bt**

Para a utilização do milho Bt, o produtor necessita seguir duas regras: (i) a da coexistência, exigida por lei e definida na Resolução Normativa nº 4, de 16 de agosto de 2007 (CTNBio); (ii) a do Manejo da Resistência de Inseto (MRI), recomendada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Nas embalagens de sementes de milho Bt, existe um contrato. Assim, ao abrir a embalagem, o produtor assume a responsabilidade de seguir as normas acima.

A regra de coexistência exige o uso de uma bordadura de 100 metros isolando as lavouras de milho transgênico das de milho convencional. Alternativamente, pode-se usar uma bordadura de 20 metros, desde que sejam semeadas dez fileiras de milho não-transgênico (igual porte e ciclo do milho transgênico plantado), isolando a área de milho transgênico.

MRI é a utilização de área de refúgio. A necessidade dessa prática advém do consenso de que o cultivo do milho Bt em grandes áreas resultará na seleção de biótipos das pragas-alvo resistentes às toxinas do Bt. Obviamente, o monitoramento da infestação das plantas também é importante, pois, dependendo do híbrido utilizado e da intensidade da infestação, o produtor pode precisar adotar medidas de controle complementares.

### **Manejo de Resistência de Insetos (MRI) na utilização do milho Bt**

As duas estratégias básicas para o manejo da resistência no uso do milho Bt são: (i) expressão de alta dose da proteína Cry no híbrido transgênico; (ii) a utilização da área de refúgio. Considerando os princípios da genética de populações, o mais provável é que os genes de resistência estejam em heterozigose na população, pois, antes da seleção, sendo a frequência da resistência baixa, existe uma maior probabilidade de cruzamento entre um indivíduo heterozigoto para resistência com um

homozigoto suscetível. Também, como a dominância geralmente não é completa, a dose necessária para matar o heterozigoto é maior do que a do homozigoto suscetível e menor do que a do homozigoto resistente. Assim, a utilização de alta dose, a qual reduz a sobrevivência dos indivíduos heterozigotos, associada à área de refúgio que permita a sobrevivência de homozigotos suscetíveis, reduzirá significativamente a chance de cruzamentos entre dois heterozigotos, segregando, assim, indivíduos homozigotos resistentes e reduzindo a velocidade da seleção de uma raça de insetos resistentes.

Em princípio, os riscos da seleção de tipos resistentes, tanto aos inseticidas quanto às toxinas do Bt, dependem de vários fatores. Adicionalmente, a avaliação do risco depende de muitas variáveis, tais como o ambiente, o inseto e o evento do Bt expresso na planta, ou o inseticida. Algumas dessas variáveis só podem ser estimadas após a identificação do fenótipo resistente, como, por exemplo, a frequência inicial do gene de resistência. Portanto, essa comparação só poderá ser feita *a posteriori*, comparando casos específicos.

### **Área de refúgio**

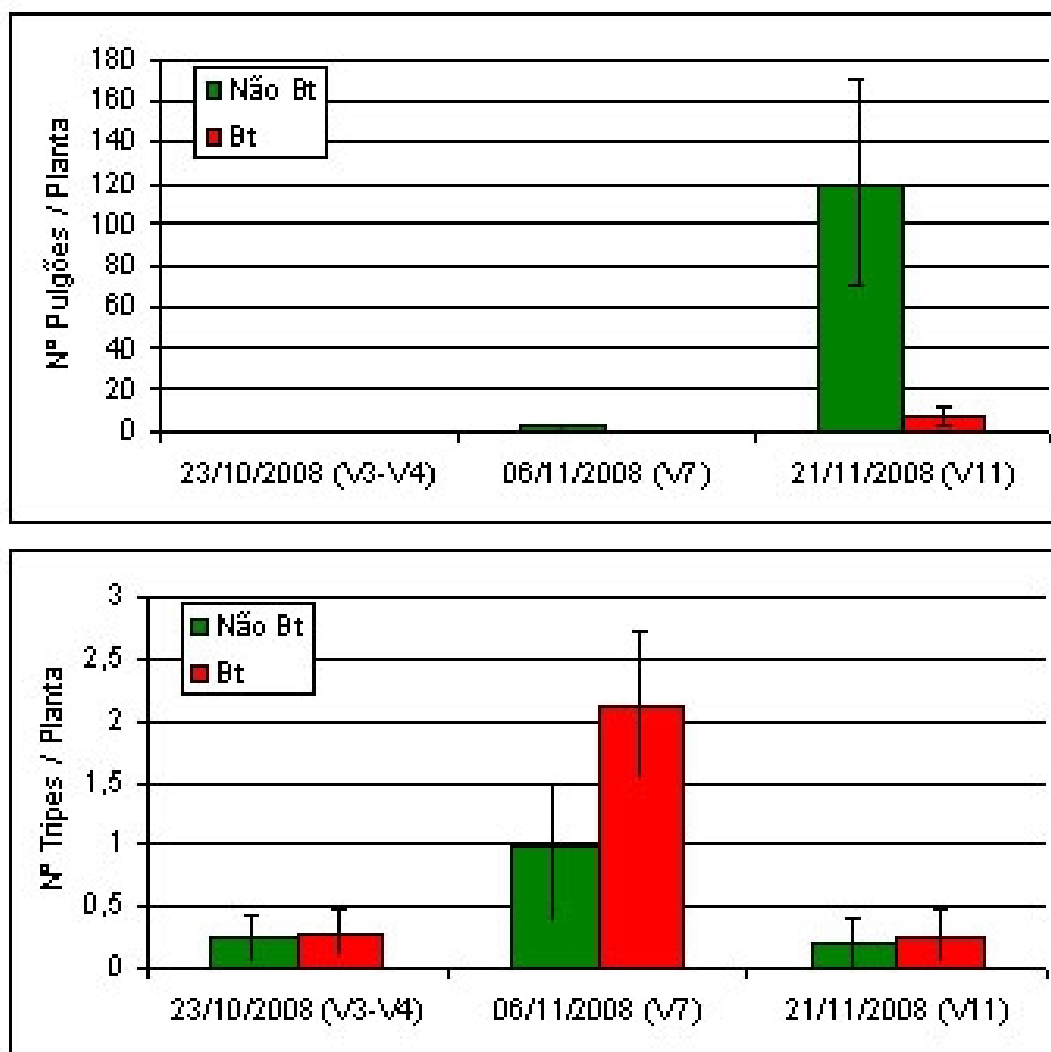
No Brasil, a área de refúgio é a semeadura de 10% da área cultivada com milho Bt, utilizando híbridos não-Bt de igual porte e ciclo, de preferência, os seus isogênicos. A área de refúgio não deve estar a mais de 800 metros de distância das plantas transgênicas. Essa é a distância máxima verificada pela dispersão dos adultos da LCM no campo. Todas essas recomendações são feitas no sentido de sincronizar os cruzamentos dos possíveis adultos sobreviventes na área de milho Bt com suscetíveis emergidos na área de refúgio. O refúgio estruturado deve ser desenhado de acordo com a área cultivada com o milho Bt. Para glebas com dimensões acima de 800 metros cultivadas com milho Bt, serão necessárias faixas de refúgio internas. Ainda segundo a recomendação da CTNBio, na área

de refúgio, é permitida a utilização de outros métodos de controle desde que não sejam utilizados bioinseticidas à base de Bt.

### Ação em organismos não-alvo e inimigos naturais

A especificidade das toxinas do Bt resulta em alta seletividade na sua atividade, agindo apenas nas espécies-alvo. Assim, afeta menos a comunidade dos insetos que utilizam o milho como hospedeiro do que a utilização de inseticidas convencionalmente usados, por exemplo. Essa seletividade inclui também a

comunidade de inimigos naturais, abelhas e outros insetos, como pulgões e tripes (Fig. 11). Dados de literatura mostram que essas proteínas, nas formulações de *B. thuringiensis* empregadas na agricultura, têm sido consideradas relativamente não tóxicas para abelhas, existindo inclusive uma formulação comercial para controle de traça-da-cera em favos de mel. Para predadores do gênero *Orius* e outros predadores heterópteros e coccinelídeos, todas as pesquisas realizadas até o momento indicam ausência de efeito negativo. No entanto, não existem estudos conclusivos sobre o efeito dessa toxina na comunidade de insetos não-alvo da cultura do milho.



**Figura 11:** Número médio (IC,  $p=0,90$ ) de pulgões (A) e tripes (B) por planta de milho não-Bt e milho Bt, em diferentes idades, em Sete Lagoas-MG, safra 2008/2009

O monitoramento das comunidades de insetos no cartucho do milho, realizado em várias regiões do país e durante várias safras, tem demonstrado a importância de predadores generalistas na cultura. Dentre esses, os encontrados com maior frequência são os percevejos *Orius* spp. e as tesourinhas *Doru luteipes* e *Euborellia* sp. Avaliações do impacto das presas desenvolvidas no milho Bt sobre esses predadores não têm revelado efeitos significativos. Entretanto, existe grande preocupação no efeito que o Bt pode provocar na redução da qualidade das presas, afetando a dinâmica populacional dos inimigos naturais. Os resultados das pesquisas até então publicados revelaram efeitos relativamente pequenos e em um número insignificante de casos. Contudo, o controle biológico tem papel fundamental no manejo integrado dos lepidópteros-chave da cultura com a utilização do milho Bt, uma vez que a densidade populacional desses insetos irá reduzir e os insetos sobreviventes podem apresentar maior suscetibilidade ao ataque dos predadores. Isso poderá resultar num controle biológico mais eficiente, tanto na área de refúgio, como sobre os sobreviventes no milho Bt, principalmente, nas áreas com maior diversidade de culturas.

### **Biossegurança de milho geneticamente modificado**

Biossegurança significa o uso sustentável do meio ambiente, de produtos biotecnológicos e aplicações para a saúde humana, biodiversidade e sustentabilidade ambiental como suporte ao aumento da segurança alimentar mundial.

No Brasil, a legislação vigente é regida pela Lei de Biossegurança, nº 11.105, de março de 2005, regulada pelo Decreto nº 5.591, de 24 de novembro de 2005, que estabelece normas de biossegurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e seus derivados. Esta lei adota

diretrizes que estimulam o avanço da ciência na área de Biossegurança e Biotecnologia, proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, dentro dos princípios da precaução para proteção do meio ambiente previstos no Protocolo de Cartagena.

A Lei de Biossegurança cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, vinculado à Presidência da República, com o objetivo de formular e implementar a Política Nacional de Biossegurança e de fixar os princípios e diretrizes para a ação administrativa dos órgãos e entidades federais com competência sobre a matéria. Este conselho também tem competência para analisar e decidir sobre aspectos de interesse nacional, sobre a liberação comercial de organismos transgênicos e seus derivados, quando solicitado.

A lei nº 11.105 recriou a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança- CTNBIO, órgão responsável pela realização das análises de risco prévias, relativas às atividades e projetos que envolvam OGMs e seus derivados no Brasil. A pesquisa com organismos geneticamente modificados no país é regulada passo a passo, desde a clonagem do gene até a obtenção da nova cultivar, havendo todo um arcabouço legal a regulamentar a matéria do ponto de vista de sua segurança ambiental e alimentar.

Normas adequadas de biossegurança, análises de risco de produtos biotecnológicos, mecanismos e instrumentos de monitoramento e de rastreabilidade são necessários para assegurar que não haja danos à saúde humana e ao meio ambiente. Risco pode ser definido como uma medida dos efeitos de uma ocorrência e da magnitude de sua ocorrência. A avaliação de risco de OGMs no Brasil deve enfatizar o fenótipo ou produto, ao invés do processo em que é desenvolvido o transgênico, considerando-se suas características específicas. Nas análises de risco devem ser usadas as bases de comparação apropriadas. Devemos discutir análise de risco ambiental de OGMs focando fluxo gênico, coexistência, biota do solo, efeitos potenciais sobre as cadeias tróficas e a biodiversidade. Não podemos também esquecer a segurança alimentar e o monitoramento pós-comercial das plantas geneticamente modificadas.

## Referências

- AN, G.; MITRA, A.; HONG, K. C.; COSTA, M. A.; NA, K.; THORNBURG, R. W.; RYAN, C. A. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. **Plant Cell**, Rockville, v. 1, p. 115-122, 1989.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, New York, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 65, p. 92-93, 1991.
- BAUM, A. B.; JOHNSON, T. B.; CARLTON, B. C. *Bacillus thuringiensis*: natural and recombinant biopesticide products. In: HALL, F. R.; MENN, J. J. (Ed.). **Methods in biotechnology**: biopesticides: use and delivery. Totowa: Humana Press, 1999. p. 189-209.
- BEVAN, M. W. Binary agrobacterium tumefaciens vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 12, p. 8711-8721, 1984.
- BOHOROVA, N. E.; LUNA, B.; BRITO, R. M.; HUERTA, L. D.; HOISINGTON, D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude, and highland maize inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 275-281, 1995.
- BOUCHEZ, A.; HOSPITAL, F.; CAUSSE, M.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. **Genetics**, Maryland, v. 162, p. 1945-1959, 2002.
- BOUCIAS, D. G.; PEDLAND, J. C. **Principles of insect pathology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. 537 p.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strains collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4965-4972, 1998.
- BRETTSCHEIDER, R.; BECKER, D.; LORZ, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 737-748, 1997.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CAMBELL, C. H.; GOWRI, G. Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 92, p. 1-11, 1990.
- CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.
- CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N. E.; BORDALL, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type-II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 73-76, 1994.
- CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 353-356, 1994.
- CERÓN, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.;



- GÜERECA, I.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 3826-3831, 1995.
- CHEN, L.; MARMEY, P.; TAYLOR, N.; BRIZARD, J. P.; ESPINOZA, S.; D'CRUZ, P.; HUET, H.; ZHANG, S.; DE KOCHCO, A.; BEACHY, R.; FAUQUET, C. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 1060-1064, 1998.
- CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 213-218, 2005.
- CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675-689, 1992.
- DE BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; MOVVA, N. R.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. **Embo Journal**, Oxford, v. 9, p. 2513-2518, 1987.
- DE BLOCK, M.; DE BROWER, D.; TENNING, P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 91, p. 694-701, 1989.
- DEPICKER, A.; STACHEL, S.; DHAESE, P.; ZAMBRYSHI, P.; GOODMAN, H. M. Nopaline synthase, transcript mapping and DNA sequence. **Journal of Molecular and Applied Genetics**, v. 1, n. 6, p. 561-573, 1982.
- DIEHN, S. H.; CHIU, W. L.; DE ROCKER, E. J.; GREEN, P. J. Prematuration polyadenylation at multiple sites within a *Bacillus thuringiensis* toxin gene-coding region. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, p. 1433-1443, 1998.
- DUNCAN, D. R.; WILLIAMS, M. E.; ZEHR, B. E.; WIDHOLM, J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* plants. **Bio/Technologie**, v. 8, p. 833-839, 1985.
- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.
- FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, p. 13-22, 2002.
- FRAME, B.; ZHANG, H.; COCCIOLONE, S.; SIDORENKO, L.; DIETRICH, C.; PEGG, S.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P.; WANG, K. Production of transgenic maize from bombarded Type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 36, p. 21-29, 2000.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 967-975, 1999.
- FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, A.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 8, n. 9, p. 833-839, 1990.

- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis**: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350 p.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.
- GORDON-KAMM, W.; DILKES, B. P.; LOWE, K.; HOESTER, G.; SUN, X.; ROSS, M.; CHURCH, L.; BUNDE, C.; FARREL, J.; HILL, P.; MADDOCK, S.; SNYDER, J.; SYKES, L.; LI, Z.; WOO, Y.; BIDNEY, D.; LARKINS, B. A. Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 18, p. 11975-11980, 2002.
- GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; O'BRIEN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS JR., W. R.; WILLETTS, N. G.; RICHE, T. B.; MACKAY, C. J.; KRUEGER, R. W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 603-618, 1990.
- GUIMARÃES, C. T.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2009. p. 129-175.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, p. 346-353, 2004.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHO, T. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 271-282, 1994.
- HUANG, X.-Q.; WEI Z.-M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, n. 11, p. 793-800, 2004.
- HYDE, J. M.; MARSHALL, A.; PRECKEL, P. V.; EDWARDS, C. R. **Bt corn**: the adoption implications of economics. West Lafayette: Purdue University, 1999.
- IKEMURA, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 2, p. 13-34, 1985.
- ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1614-1621, 2007.
- ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 6, p. 745-750, 1996.
- JARRETT, P.; BURGESS, H. D. Effect of bacterial varieties on the susceptibility of the greater wax moth *Galleria mellonella* to *Bacillus thuringiensis* and its significance in classification of the bacterium. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 31, n. 4, p. 346-352, 1982.
- JOSHI, C. P. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 15, n. 23, p. 9627-9640, 1987.
- KLEIN, T.; GRADIZIEL, T.; FROMM, M.; SANFORD, J. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio/Technology**, v. 6, p. 559-563, 1988.
- KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v.

6117, p. 70-73, 1987.

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.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.; WRIGH, M.; EVOLA, S. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v. 11, p. 194-200, 1993.

LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E. A.; DEAN, D. H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 583-586, 1996.

LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**, v. 4, p. 67-79, 2002.

LIU, D. Design of gene constructs for transgenic maize. In: SCOTT, M. P. (Ed.). **Methods in molecular biology**: transgenic maize. Totowa: Humana, 2009. p. 3-20.

LUPOTTO, E. In vitro culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.) **Maydica**, Bergamo, v. 31, p. 193-201, 1986.

LUPOTTO, E.; CONTI, E.; REALI, A.; LANZANOVA, C.; BALDONI, E.; ALLEGRI, L. Improving in vitro culture and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. **Maydica**, Bergamo, v. 49, p. 221-229, 2004.

MESQUITA, A. G. G.; GUIMARÃES, C. T.; PARENTONI, S. N.; PAIVA, E. Recuperação do genitor recorrente em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, p. 253-260, 2005.

MORRIS, M.; DREHER, K.; RIBAUT, J. M.; KHAIRALLAH, M. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, p. 235-247, 2003.

MURRAY, E. E.; LOTZER, J.; EBERLE, M. mRNA transcript of several plant genes are polyadenylated at multiple sites in vivo. **Nucleic Acids Research**, London, v. 14, p. 2229-2240, 1989.

NOVAK, F. J.; DOLEZELOVA, M.; NESTICKY, M.; PIOVARIC, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L. **Maydica**, Bergamo, v. 23, p. 381-390, 1983.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N.-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, London, v. 313, p. 810-812, 1985.

OHME-TAKAGI, M.; TAYLOR, C. B.; NEWMAN, T. C.; GREEN, P. The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 11811-11815, 1993.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA JOINT PLANT BREEDING SYMPOSIUM, 2., 1994, Corvallis. **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University, 1994.

PERLAK, F. J.; FUCHS, R. L.; DEAN, D. A.; MCPHERSON, S. L.; FISHHOLFF, D. A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 3324-3328, 1991.

PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. Otimização dos parâmetros de

- bombardeamento de partículas para a transformação genética de linhagens brasileiras de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 371-378, 2008.
- PHILLIPS, R. L.; SOMERS, D. A.; HIBBERD, K. A. Cell/tissue culture and *in vitro* manipulation. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3. ed. Madison: American Society Agronomy: Crop Science Society of America: Soil Science Society of America, 1988. p. 345-387. (Monograph, 18).
- PRIOLI, L. M.; SILVA, W. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 553-566, 1989.
- RAPELA, M. A. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue cultures of Argentina maize (*Zea mays* L.) **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 121, p. 119-122, 1985.
- RIBAUT, J.-P.; RAGOT, M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 58, n. 2, p. 351-360, 2007.
- SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSEL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA**: part H. San Diego: Academic Press, 1993. p. 483-510. (Methods in Enzymology, 217).
- SANFORD, J. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 299-302, 1988.
- SANFORD, J.; KLEIN, T.; WOLF, E.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. **Journal Part Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.
- SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Genótipos de milho com alta capacidade para embriogênese somática e regeneração de plantas obtidos a partir de calos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 717-722, 2000.
- SCHAFER, W.; GORZ, A.; GUNTER, K. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 327, p. 529-532, 1987.
- SHAW, G.; KAMEN, R. A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell**, Cambridge, v. 46, p. 659-667, 1986.
- TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Particle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 21, n. 12, p. 963-977, 2002.
- TOJO, A.; AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* endotoxin by gut juice protease of silkworm *Bombyx mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 576-580, 1983.
- TYRELL, D. J.; BULLA JR., L. A.; ANDREWS JR., R. E.; KRAMER, K. J.; DAVIDSON, L. I.; NORDIN, P. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 145, p. 1052-1062, 1981.
- VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 639-644, 2003.
- VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *CryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica**



do Brasil, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 147-153, 2000.

VALICENTE, F. H.; SOUZA, I. R. P. Cultivo e preparo de *Bacillus thuringiensis* para macroscopia eletrônica de varredura. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 1., 2004, Cuiabá, MT. **Da agricultura familiar ao agronegócio: tecnologia, competitividade e sustentabilidade: [resumos expandidos]**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo: Empaer ABMS, 2004.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems of the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.

WANG, K.; FRAME, B. Maize transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 45-62.

WILLCOX, M. C.; KHAIRALLAH, M. M.; BERGVINSON, D.; CROSSAB, J.; DEUTSCHE, J. A.; EDMEADES, G. O.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D.; JIANG, C.; JWELL, D. C.; MIHMD, J. A.; WILLIAMS, W. P.; HOISINGTON, D. Selection for resistance to southwestern corn borer using marker-assisted and conventional backcrossing. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1516-1528, 2002.

WU, L.; NANDI, S.; CHEN, L.; RODRIGUEZ, R. L.; HUANG, N. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. **Transgenic Research**, London, v. 11, p. 533-541, 2002.

YAMAMOTO, T.; POWELL, G. K. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent advances in understanding its insecticidal activity. In: KIM, L. (Ed.). **Advanced engineered pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 3-42.

ZHAO, Z.-Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L.; HONDRED, D.; BOND, D.; SCHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput

genetic transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, p. 323-333, 2001.

## Circular Técnica, 135

Ministério da Agricultura  
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

**Endereço:** Rod. MG 424 Km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

**Fone:** (31) 3027 1100

**Fax:** (31) 3027 1188

**E-mail:** sac@cnpms.embrapa.br

**1a edição**

1a impressão (2009): 200 exemplares

## Comitê de Publicações

**Presidente:** Antônio Álvaro Corsetti Purcino

**Secretário-Executivo:** Flávia Cristina dos Santos

**Membros:** Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune  
Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana e  
Clenio Araujo

## Expediente

**Revisão de texto:** Clenio Araujo

**Normalização Bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro

**Editoração eletrônica:** Communique Comunicação