



Perspectivas Biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no Controle Biológico da Broca da Cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*





**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária***

**Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*  
*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

*Ernesto Paterniani*  
*Hélio Tollini*

Membros

**Diretoria Executiva**

*Silvio Crestana*  
Diretor Presidente

*José Geraldo Eugênio de França*  
*Kepler Euclides Filho*

*Tatiana Deane de Abreu Sá*  
Diretores Executivos

**Embrapa Agrobiologia**

*José Ivo Baldani*  
Chefe Geral

*Eduardo Francia Carneiro Campello*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Rosângela Stralio*  
Chefe Adjunto Administrativo

UDAYASURIYAN, V.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Transfer of an insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* into plant-colonizing *Azospirillum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 163-167, 1995.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I. **Cultivo do milho**: manejo integrado de pragas (MIP). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 16 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 50).

WHEI-XIANG, W.; QING-FU, Y.; HANG, M.; XUE-JUN, D. Bt-trangenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in flooded paddy soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 289-295, 2004.

WU, K. W.; GUO, Y. Y. The evolutions of cotton pest management practices in China. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 31-52, 2005.

WÜNN, J.; KLÖTI, A.; BURKHARDT, P. K.; GHOSH BISWAS, G. C.; LAUNIS, K.; IGLESIAS, V. A.; POTRYKUS, I. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. **Bio/technology**, New York, v. 14, p. 171-176, 1996.

XIAOQIANG, W.; VENNISON, J.; HUIRONG, L.; BEN-DOV, E.; ZARITSKI, A.; BOUSSIBA, S. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4971-4975, 1997.

ZWAHLEN, C.; HILBECK, A.; GUGERLI, P.; NEWTWIG, W. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 765-775, 2003.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-8498

Julho/2006

## Documentos 214

### Perspectivas Biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no Controle Biológico da Broca da Cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*

Patrícia de Medeiros Gitahy  
Patrícia Gonçalves Galvão  
Jean Luiz Simões Araújo  
José Ivo Baldani

Seropédica – RJ  
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Norma Gouvea Rumjanek e Elen de Lima Aguiar

Menezes

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2006): 50 exemplares

G536p Gitahy, Patrícia de Medeiros

Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* / Patrícia Gonçalves Galvão, Jean Luiz Simões Araújo, José Ivo Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 44 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 214).

ISSN 1517-8498

1. Controle biológico. 2. Cana-de-açúcar. 3. Broca. I. Galvão, P. G., colab. II. Simões-Araújo, J. L., colab. III. Baldani, J. I., colab. IV. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). V. Título. VI. Série.

CDD 632.96

© Embrapa 2006

SHARMA, H. C.; SHARMA, K. K.; SEETHARAMA, N.; ORTIZ, R. Prospects for using resistance to insects in crop improvement. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, n. 2, p. 76-95, 2000.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. -Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 845-881, 2002.

SKOT, L.; HARRISON, S. P.; NATH, A.; MYTTON, L. R.; CLIFFORD, B. C. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. **Plant and Soil**, Dordrecht: v. 127, n. 2, p. 285-295, 1990.

SKOT, L.; TIMMS, E.; MYTTON, L. R. The effect of toxin producing *Rhizobium* strains, on Larvae of *Sitona flavescens* feeding on legume roots and nodules. **Plant and Soil**, Dordrecht: v. 163, n. 1, p. 141-150, 1994.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. -B.; MAAGD, R. A.; DENNEHY, T. J. Cross-resistance of Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4582-4584, 2000.

TAPPESEER, B. The differences between conventional *Bacillus thuringiensis* strains and transgenic insect resistant plants. Possible reasons for rapid resistance development and susceptibility to non-target organisms. In: **Third World Network**: briefing paper no. 1. Disponível em: <<http://www.twinside.org.sg/title/diffe-cn.htm>> Acesso em: 08 set. 2005

THEODOLUZ, C.; VEGA, A.; GONZALES, E.; MEZA-BASSO, L. Expression of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 375-381, 2003.

RODRIGUES, R. Cenário internacional é favorável para o setor sucroalcooleiro brasileiro- Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: **Brasil@gro**. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?cod=17215&tipo=clipping>> Acesso em: 14 set. 2004.

ROSAS-GARCIA, N. M.; PEREYRA-ALFÉREZ, B.; NINO, K. A.; N-WONG, G.; MORALES RAMOS, L. H. Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis* strains against to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 49, n. 4, p. 455-456, 2004.

ROSSI, M. N. Efeito do número de ovoposições provenientes de diferentes fêmeas de *Cotesia flavipes* CAM. No número de descendentes que emergem de seu hospedeiro *Diatraea saccharalis* FABR. **Naturalia**, São Paulo, v. 25, p. 243-270, 2000.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; MACHADO, M. F. P. S.; CONTE, H. Esterase-3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, p. 61-64, 2002.

SALLES, J. F.; GITAHY, P. M.; SKOT, L.; BALDANI, J. I. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 155-161, 2000.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKYA, G. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 111-120, 2002.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1225–1230, 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

## Autores

### Patrícia de Medeiros Gitahy

Bióloga, MSc. em Biotecnologia Vegetal  
Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505,  
Cep 23851-970, Seropédica/RJ  
e-mail: gitahypm@yahoo.com.br

### Patrícia Gonçalves Galvão

Graduanda em Ciências Biológicas, Bolsista de Iniciação Científica, PIBIC/CNPq – UFRRJ/Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: patriciaufrj@yahoo.com.br

### Jean Luiz Simões Araújo

Engenheiro Agrônomo, PhD em Genética de Plantas,  
Pesquisador da Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: jean@cnpab.embrapa.br

### José Ivo Baldani

Engenheiro Agrônomo, PhD Soil Sciences, Texas A M University, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br

PARRA, J. R. P.; MILANO, P.; CÔNSOLI, F. L.; ZÉRIO, N. G.; HADDAD, M. L. Efeito da nutrição e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 49-57, 1999.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; SOSA-GOMÉZ, D. R.; MACEDO, N. Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1097-1118.

PERLAK, F. J.; DEATON, R. W.; ARMSTRONG, T. A.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R.; GREENPLATE, J. T.; FISCHHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. **Bio/technology**, New York, v. 8, p. 939-943, 1990.

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

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, Chapingo, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

POLANCZYK, R. A.; MARTINELLI, S.; OMOTO, C.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 31, p. 18-27, 2003. PRECETTI, A. A. C. M.; TERÁN, F. O.; SANCHEZ, A. G. Alterações nas características tecnológicas de algumas variedades de cana-de-açúcar, devidas ao dano da broca *Diatraea saccharalis*. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, v. 40, p. 3-8, 1988.

RODRIGUES, L. Energia tipo exportação. **Jornal o Globo**, Rio de Janeiro, 30 jan. 2005. Caderno Economia.

MURPHY, R. C.; STEVENS JR., E. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1650-1655, 1992.

NAKANO, O.; SOARES, M. G. Avaliação dos danos causados pelo complexo broca-podridões em cana-de-açúcar usando parafina na determinação de volumes de tecido atacado. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 71, n. 1, p. 13-20, 1996.

NAMBIAR, P. T. C.; MA, S. W.; IYER, V. N. Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of pigeon pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2866-2869, 1990.

NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, 1993. p. 125-146.

OBUZOWICZ, M. G.; PERLAK, F. J.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E. J.; WATRUP, L. S. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into chromosome of root-colonizing strains of *Pseudomonas* using Tn5. **Gene**, Amsterdam, v. 45, p. 327-331, 1986.

PALM, C. J.; SCHALLER, D. L.; DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*  $\delta$ -endotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1258-1262, 1996.

PARK, W. H.; BIDESHI, D. K.; FEDERICI, B. A. Molecular genetic manipulation of truncated Cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4449-4455, 2000.

## Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 214/2006 discute as perspectivas biotecnológicas do uso de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). A broca da cana é uma das principais pragas que ataca a cultura de cana-de-açúcar podendo causar prejuízos superiores a 250 milhões de reais. O documento faz referência aos métodos de controle da broca e ao uso direto *Bacillus thuringiensis* através da pulverização da cultura assim como do uso de plantas e microrganismos geneticamente modificados capazes de expressar os genes *cry* e promover o controle dos insetos. No final, o documento discute aos possíveis impactos do *B. thuringiensis* no ambiente e em organismos não alvos.

José Ivo Baldani  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	7
2. <i>Diatraea saccharalis</i> (broca da cana-de-açúcar).....	9
2.1. Distribuição Geográfica.....	9
2.2. Ciclo Biológico.....	10
2.3. Danos e prejuízos provocados .....	11
2.4. Métodos de controle.....	13
3. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	16
3.1. Formas de utilização de <i>B. thuringiensis</i> .....	18
3.1.1. Uso direto de <i>B. thuringiensis</i> .....	18
3.1.2. Plantas transgênicas .....	19
3.1.3. Microrganismos transgênicos .....	24
3.2. Indução de resistência nos insetos à <i>B. thuringiensis</i> .....	26
3.3. Impacto de <i>B. thuringiensis</i> no ambiente e em organismos não-alvos.....	28
4. Controle de <i>D. saccharalis</i> com <i>B. thuringiensis</i> .....	29
5. Considerações finais .....	31
6. Referências Bibliográficas .....	32

LOSEY, J. E.; LINDA, S. R.; MAUREEN, E. C. Transgenic pollen harms Monarch Larvae. **Nature**, p. 214. Disponível em: <<http://www.biotech-info.net/transpollen.html>>. Acesso em: 20 maio 1999.

MACEDO, N.; MENDONÇA, A. F.; MORENO, J. A.; PINAZA, A. H. Estimativa de benefício econômico de dez anos de controle biológico de *Diatraea* spp., através de *Apanteles flavipes* Cameron, no estado de Alagoas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9.,1984, Londrina. **Resumos...** Londrina; SEB, 1984. p. 134.

MARTENS, J. W. M.; HONÉE, G.; ZUIDEMA, D.; VAN LENT, J. W. M.; VISSER, B.; VLAK, J. M. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant Baculovirus in insect cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2764-2770, 1990.

MCBRIDE, K. E.; SVAB, Z.; SCHAAF, D. J.; HOGAN, P. S.; STALKER, D. M.; MALIGA, P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. **Bio/Technology**, New York, v.13, p. 362-365, 1995.

MCGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 229, n. 4709, p. 193-195, 1985.

MENDONÇA, A. F. **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, 1996. 200 p.

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M. J. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exguia* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2086-2092, 1995.

MONNERAT, R. G.; SILVA-WERNECK, J. O.; DIAS, S. C. **Bacillus thuringiensis**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 32 p.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, Calcutta, v. 131, p. 1-11, 1998.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; MCPHERSON, K., MEGHJI, M.R., MERLIN, E., RHODES, R.; WARREM, G.W., WRIGHT, M. & ELOVA, S. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, New York, v. 11, p. 194-200, 1993.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGÉS, H. D. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic, 1981. p. 837-896.

LAMPEL, J. S.; CANTER, G. L.; DIMOCK, M. B.; KELLY, J. L.; ANDERSON, J. J.; URATANI, B. B.; FOULKE JR, J. S.; TURNER, J. T. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 501-508, 1994.

LANGENBACH, T. Nova lógica no controle de agrotóxicos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 150, p. 62-64, 1999

LECUONA, R. E.; TIGANO, M. S.; DIAZ, B. M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera:Pyralidae) in Argentina. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, p. 299-307, 1996.

LIMA FILHO, M. **Informações sobre a broca da cana-de-açúcar e alguns de seus inimigos naturais**. Campo dos Goytacazes: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997a.

LIMA FILHO, M. **Informações sobre o controle biológico**. Campo dos Goytacazes: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997b.

## Perspectivas Biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no Controle Biológico da Broca da Cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*

---

Patrícia de Medeiros Gitahy; Bióloga  
Patrícia Gonçalves Galvão  
Jean Luiz Simões Araújo  
José Ivo Baldani

### 1. Introdução

---

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área cultivada de 5,4 milhões de hectares. A lavoura canavieira sustenta as indústrias de açúcar e é responsável por mais de 40% do mercado mundial de álcool, que representa a base do maior programa de combustível renovável do planeta, o Próalcohol. Durante o ano recolhe mais de R\$ 4,5 bilhões de impostos aos cofres públicos. Na safra de 2004, foi colhido 389 milhões de toneladas de cana, permitindo a fabricação de 24,9 milhões de toneladas de açúcar e de 14,6 bilhões de litros de álcool. Devido à grandeza dos números do setor sucroalcooleiro no Brasil e o fato de cada tonelada de cana-de-açúcar ter o potencial energético de 1,2 barril de petróleo, pode-se tratar a cana-de-açúcar como o principal recurso de biomassa energética. A alta do petróleo no mercado mundial e as exigências ambientais do Protocolo de Kioto devem elevar em 70% o consumo mundial de álcool como combustível até o ano de 2010 (RODRIGUES, 2005).

Atualmente, existem 500 mil trabalhadores nas lavouras canavieiras no Brasil, com 300 unidades industriais em atividade gerando mais de 5,2 milhões de empregos, sendo 1,2 milhões de empregos diretos e 4 milhões de empregos indiretos (RODRIGUES, 2004). Com as exportações de açúcar próximas de 13 milhões de toneladas e receitas superiores a dois bilhões de dólares anuais,

nos últimos dois anos a participação brasileira no mercado internacional tem sido superior a 35% (CENBIO/INFOENER, 2005).

Nos próximos dez anos, os mercados do açúcar e do álcool serão norteados pela crescente demanda por álcool para combustível, refletindo o provável aumento dos preços do petróleo (BOTELHO et al., 2004). Com um cenário internacional favorável, o Brasil tem a chance ímpar de aproveitar todo seu potencial para ser o principal fornecedor mundial de álcool combustível. Em vista desse crescimento e embora o mercado se mostre promissor, a cultura da cana-de-açúcar ainda sofre freqüentes crises e os países produtores precisam investir em tecnologias visando uma maior produtividade agrícola e industrial, bem como redução nos custos de produção. Torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de projetos que visam aumentar a produtividade dessa cultura minimizando os impactos diretos sobre o meio ambiente.

Dentre os vários fatores que mais afetam a produtividade da indústria sucro-alcooleira, que dificultam a expressão de todo o potencial produtivo da planta, destacam-se o ataque de pragas. Dentre os insetos que atacam a cana-de-açúcar, a broca *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae), merece destaque devido à amplitude de distribuição, intensidade do ataque e danos econômicos, sendo o inseto que causa os maiores danos a cultura da cana-de-açúcar (CAMPOS & MACEDO, 2004).

A utilização de inseticidas químicos para o controle da broca da cana-de-açúcar não é recomendada devido aos prejuízos ambientais provocados, e pela forma de aplicação dos mesmos na lavoura, que torna difícil a sua penetração no interior dos colmos onde as lagartas provocam os maiores prejuízos. Devido a essas restrições e a necessidade de alternativas seguras aos inseticidas químicos, tem-se aumentado o interesse por agentes biológicos para o controle desta praga.

O uso dos agentes de controle biológico representa cerca de 1% do mercado mundial de inseticidas (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000). Dentre esses, o mais bem sucedido é a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, sendo utilizado a mais de cinco décadas e

GITAHY, P. M.; SALLES, J. F.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; SKOT, L.; BALDANI, J. I. Expression of *Bacillus thuringiensis cry3A* gene in the endophytic diazotrophic bacteria of the genus *Herbaspirillum*. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 21., 1997, Londrina. **Anais...** Londrina: SBG, 1997.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety.** Chichester: Wiley & Sons, 2000. 350 p.

GUAGLIUMI, P. Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil. Serviço de documentação do Instituto do Açúcar e do Alcool (Atualmente UFSCAR / Campus Araras / SP). **Coleção Canavieira**, Rio de Janeiro, n. 10, p. 281-521, 1972.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 41-64.

HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; LUI, Y. -B.; TABASHNIK, B. E. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 8373-8377, 1999.

HERRERA, G.; SNYMAAN, S. J.; THOMSON, J. A. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 682-690, 1994.

HERRERO, S.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Mannose phosphate isomerase isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic bases of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Lepidopteran Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 979-981, 2001.

HIGH, S. M.; COHEN, M. B.; SHU, Q. Y.; ALTOSSAR, I. Achieving successful deployment of *Bt* rice. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 6, p. 286-292, 2004.

FIÚZA, L. M. Ecologia de *Bacillus thuringiensis* e sua aplicação no manejo de insetos pragas agrícolas e urbanas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 9., 2004, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2004. p. 12.

FONTES, E. Controle biológica: um desafio para o país. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 1-4, 1992.

FRANKENHUYZEN, K. Van. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice**. Chichester: John Wiley, 1993. p. 1-36.

FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 19, n. 3, p. 227-276, 1999.

FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, New York, v. 11, p. 1151-1155, 1993.

GALLO, D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002. 920 p.

GERLENTER, W.; SCHWAB, G. E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: Wiley & Sons, 1993. p. 89-104.

GITAHY, P. M. **Seleção e caracterização de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* com atividade entomopatogênica para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis***. 2000. 135 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Centro de Ciências e da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

responsável atualmente por aproximadamente 90% do faturamento mundial com bioinseticidas (POLANCZYK & ALVES, 2003). A aplicação mundial de *B. thuringiensis* é de 13.000 toneladas por ano, gerando um mercado anual de 60 a 80 milhões de dólares.

Com os avanços das pesquisas na área biotecnológica novas estratégias para uso de *B. thuringiensis* foram desenvolvidas. A clonagem e expressão dos genes *cry* para codificar as delta-endotoxinas em plantas e outros microrganismos, aumentou as possibilidades de uso desse agente de biocontrole, visando inclusive, controlar pragas que se alimentam dos tecidos internos das plantas, constituindo-se, portanto, de uma estratégia potencial para o controle da broca da cana-de-açúcar.

## **2. *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar)**

### **2.1. Distribuição geográfica**

*D. saccharalis* é originária da América Central e do Sul (GALLO, 2002) e o primeiro relato sobre o ataque de brocas da ordem Lepidoptera em cana-de-açúcar no Brasil foi publicado em 1859 por uma comissão de técnicos brasileiros na revista “O Auxiliador da Indústria Nacional” (GUAGLIUMI, 1972).

Até hoje, os danos provocados por essa espécie representa os maiores prejuízos fitossanitários à cultura de cana-de-açúcar. Recentemente, *D. saccharalis*, que pertencia a família Pyralidae e subfamília Crambinae, teve sua classificação revista. A subfamília foi elevada ao nível de família, e hoje *D. saccharalis* pertence à ordem Lepidoptera, família Crambidae (PARRA et al., 1999).

Existem cerca de 21 espécies do gênero *Diatraea* ocorrendo em cana-de-açúcar no continente americano, entretanto nem todas as espécies provocam danos de importância econômica ao cultivo comercial. No Brasil, ocorrem duas espécies que atacam a cana-de-açúcar: *D. saccharalis* Fabricius (Figura 1), apresentando distribuição generalizada em todo o país, e *D. flavipennella* Box, encontrada nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, porém com maior importância econômica apenas nos canaviais do Nordeste do país (MENDONÇA, 1996).

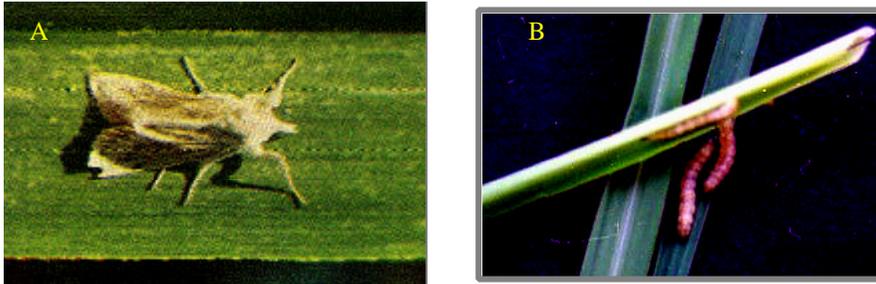


Foto A: Planalsucar; Foto b: GITAHY,PM.

Figura 1- Adulto (A) e larvas (B) da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

*D. saccharalis*, também conhecida como broca do colmo ou da cana, é a espécie de maior importância do gênero. É nativa do hemisfério norte e pode ser encontrada atacando os canaviais da Argentina, Bolívia, Colômbia, EUA, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Costa Rica, Cuba, Equador, México, Panamá, Peru, Haiti, Jamaica, Paraguai, República Dominicana, Venezuela e Antilhas Menores (GUAGLIUMI, 1972; MENDONÇA, 1996).

Essa praga pode ainda provocar danos a outras culturas, como milho, trigo, arroz, sorgo, napier, outras gramíneas e ciperáceas (LIMA FILHO, 1997a; WAQUIL et al., 2002).

## 2.2. Ciclo biológico

Após o acasalamento, a fêmea oviposita uma massa de ovos no limbo foliar, geralmente na face dorsal das folhas de cana, dispostos de forma imbricada (como couro de cobra ou escamas de peixe), contendo de 5 a 50 ovos amarelados, podendo totalizar cerca de 300 ovos por oviposição. A eclosão desses se dá após 4 a 9 dias, e logo depois, as lagartas neonatas caminham pelas folhas onde alimentam-se do parênquima foliar principalmente no tecido interno da bainha. Após o primeiro instar, as lagartas penetram nos colmos, perfurando e abrindo galerias de baixo para cima. Durante o desenvolvimento larval ocorrem diversas ecdises, mas em média apresentam 6 instares com duração total de aproximadamente 40 dias. Após este período, passam a crisálida, permanecendo neste

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Pragas: pragas da fase vegetativa e reprodutiva. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P., FERREIRA, M. T. R. (Ed.). **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1.). Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/prvegetativa.htm>>. Acesso em: 06 out. 2005.

DINARDO, L. L.; TERAN, F. O.; PAVAN, O. H. de O.; PAZELLE, A. C. Avaliação entomológica do vírus da granulose para controle de *Diatraea saccharalis*. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, v. 41, p. 18-22, 1988.

DOWNING, K. J.; LELIE, G.; THOMPSON, J. A. Biocontrol of sugarcane borer *Eldna saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2804-2810, 2000.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 15, p. 232-239, 1970.

ESTADA, U.; FERRÉ, J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 10, p. 3840-3846, 1994.

FERRÉ, J.; REAL, M. D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M. Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field populations of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 5119-5123, 1991.

FERRÉ, J.; VAN RIE, V. J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus Thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 501-33, 2002.

BRAGA, D. P. V.; ARRIGONI, E. D. B.; SILVA-FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Expression of the Cry1Ab Protein in Genetically Modified Sugarcane for the Control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, Missouri, v. 5, n. 2/3, p. 209-235, 2003.

CAMPOS, M. B. S.; MACEDO, N. Cana-de-açúcar - Ampliando campo de ataque. **Cultivar; Grandes Culturas**, Pelotas, v. 6, n. 68, p. 23-26, 2004.

CAROZZI, N. B.; KOZIEL, M. G. Transgenic maize expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein for control of European corn borer. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M. **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 63-74.

CENBIO/INFOENER. **Cana-de-açúcar no Brasil**. Disponível em: <[http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br\\_cana.asp](http://infoener.iee.usp.br/scripts/biomassa/br_cana.asp)>. Acesso em: 06 out. 2005.

CERDA, H.; SAYYED, A. H.; WRIGHT, D. J. Laboratory culture conditions affect stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 127, p. 142-145, 2003.

CHANG, J. H.; CHOI, J. Y.; JIN, B. R.; ROH, J. Y.; OLSZEWSKI, J. A.; SEO, J. S., O'REILLY, D. R.; JE, Y. H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 84, p. 30-37, 2003.

CHEN, D.; YE, G.; YANG, C.; CHEN, Y.; WU, Y. Effect after introducing *Bacillus thuringiensis* gene on nitrogen metabolism in cotton. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 87, p. 235-244, 2004.

estágio por 9 a 14 dias quando emerge o adulto, cuja longevidade é de 7 dias. O ciclo evolutivo completo é de 53 a 60 dias. Podem ser observadas 4 ou 5 gerações anuais dependendo das condições climáticas, mas pode ocorrer praticamente durante todo o ciclo da cultura. A duração de cada período do ciclo biológico da broca pode variar em função de fatores climáticos. Na maioria dos locais de ocorrência, *D. saccharalis* está presente durante todo o ano nos seus diferentes estágios de desenvolvimento: ovo, lagarta de várias idades, crisálida e adulto (GUAGLIUMI, 1972; ALVES et al., 1986; GALLO, 2002; MENDONÇA, 1996; LIMA FILHO, 1997a).

### 2.3. Danos e prejuízos provocados

A broca no seu estágio larval perfura os colmos de cana abrindo galerias, acarretando prejuízos diretos e indiretos:

Prejuízos diretos ⇒ Estão relacionados ao ataque direto do inseto ao colmo das plantas, provocando falhas de germinação, morte da gema apical cujo sintoma é conhecido como “coração morto”, diminuição do peso da cana pela redução da polpa e dos tecidos de suporte, brotações laterais, enraizamento aéreo, afinamento dos colmos, atrofia dos entrenós, atraso na maturação e falta de uniformidade no plantio, tombamento dos colmos brocados e conseqüente queda no rendimento agrícola.

Prejuízos indiretos ⇒ Estão relacionados com a entrada de microrganismos oportunistas no colmo através dos orifícios e galerias perfurados pelas lagartas, como os fungos fitopatogênicos que causam a “podridão vermelha do colmo”: *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Colletotrichum falcatum* Went (Figura 2). Estes microrganismos através dos orifícios nas galerias, ou levados pelas lagartas, invadem os tecidos internos do colmo causando inversão da sacarose e diminuição da pureza do caldo, com menor rendimento de açúcar e contaminações no processo de fermentação alcoólica, com menor rendimento de álcool. Os danos indiretos contribuem para queda no rendimento industrial (PRECETTI et al., 1988; GALLO, 2002; NAKANO & SOARES, 1996). Os tecidos atacados pela broca em processo de fermentação também são

atrativos para o ataque de outros patógenos e insetos, aumentando os prejuízos iniciados pela broca (LIMA FILHO, 1997a).

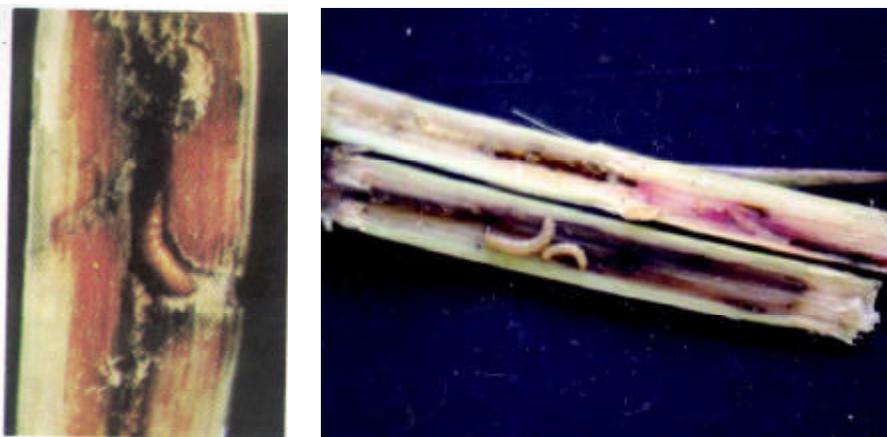


Foto: Planalsucar

Foto: GITAHY, P. M.

Figura 2- Danos provocados pela broca da cana-de-açúcar: a. galerias características provocadas pela broca (danos diretos); b. estrias vermelhas são características do ataque dos fungos da "podridão vermelha do colmo" (danos indiretos).

Diversos autores avaliaram as perdas provocadas pela broca da cana-de-açúcar. A avaliação mais utilizada é a determinação do percentual de perdas agrícolas e industriais para cada 1% de intensidade de infestação (I.I%) do inseto. I.I. igual ou superior a 3%, considerada baixa, já viabiliza o controle da praga (BOTELHO et al., 2004; CAMPOS & MACEDO, 2004). Admite-se haver uma linearidade entre a I.I. da broca, determinada pelo método descrito por GALLO (2002), e os prejuízos devido o ataque da broca. Para cada 1% de I.I considera-se uma perda de 0,77% em peso de cana no campo, 0,25% de perda no açúcar recuperável e 0,20% de álcool na indústria (BOTELHO et al., 2004; CAMPOS & MACEDO, 2004). A broca da cana provoca um decréscimo de 10 a 20% de sacarose e apenas a podridão vermelha gera prejuízos na ordem de US\$ 100 milhões por ano apenas no estado de São Paulo, considerando-se uma infestação de 10% dos colmos.

BEZDICEK, D. F.; QUINN, M. A.; FORSE, L.; HERON, D.; KAHN, M. L. Insecticidal activity and competitiveness of *Rhizobium* sp containing the *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis* delta-endotoxin gene (*cryIII*) in legume nodules. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 1637-1646, 1994.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 843-850, 2003.

BOHOROVA, N.; MACIEL, A. M.; BRITO, R. M.; AGUILART, L.; IBARRA, J. E.; HOISINGTON, D. Selection and characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga**, Paris, v. 41, n. 2, p. 153-165, 1996.

BOSH, D.; SCHIPPER, B.; VAN DER KLEIJ, H.; MAAGD, R. A.; STIEKEMA, W. J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. **Bio/Technology**, New York, v. 12, p. 915-918, 1994.

BOTELHO, P. S. M. Quinze anos de controle biológico de *Diatraea saccharalis* utilizando parasitóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 255-262, 1992.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, L. P. M.; GARCIA, J. F. Ameaça ao progresso. **Cultivar; Grandes Culturas**, Pelotas, v. 6, n. 68, p. 3-10, dez. 2004. Encarte.

BRAGA, D. P. V. **Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína CryIIa (B) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)**. 2001. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

A Embrapa Agrobiologia está desenvolvendo uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, expressando o gene *cry1Ab* de *Btk* S76 nos tecidos internos da cana-de-açúcar, dos quais as larvas de *D. saccharalis* se alimentam. A estratégia visa aumentar a persistência do bioinseticida e ainda diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados na lavoura, já que essas bactérias ajudam na fixação biológica de nitrogênio atmosférico, e é semelhante à realizada por GITAHY et al. (1997) e SALLES et al. (2000) para o controle do coleóptero *Migdolus fryanus* em plantas de cana.

## 6. Referências Bibliográficas

---

ADANG, M. J.; BRODY, G.; CARDINEAU, N.; EAGAN, R. T.; ROUSH, C. K.; SHEWMAKER, A.; JONES, A.; OAKES, J. V.; MCBRIDE, K. E. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIII A* gene in protoplast and potato plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 1131-1145, 1993.

ALVES, S. B.; ANDRADE, C. F. S. de; CAPALBO, D. M. F.; MOSCARDI, F.; MORAES, I. de O.; PARRA, J. R. P.; ALMEIDA, L. C. de; FERRAZ, L. C. C. B.; HADDAD, M. L. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manoele, 1986. 407 p.

ARAÚJO, J. R.; MACEDO, N. Efeitos da queima do canavial sobre parasitóides de larvas e de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 79-84, 2000.

ARENCIBIA, A.; VÁZQUEZ, R. I.; PRIETO, D.; TÉLLEZ, P.; CARMONA, E. R.; COEGO, A.; HERNÁNDEZ, L.; RIVA, G. A. de la; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 247-255, 1997.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 69-93.

Nas plantas de milho essa praga tem constituído um problema sério no Brasil Central e em altas infestações, sem ataque pode provocar danos de até 21% na produção (CRUZ et al., 2000).

## 2.4. Métodos de controle

Estudos com vários inseticidas mostraram reduções estatisticamente significantes no percentual de entrenós perfurados pela broca da cana-de-açúcar, mas na maioria das vezes essa redução não se traduz em aumento no rendimento e qualidade do açúcar, o que indica pequena compreensão das relações entre a broca da cana e o uso de inseticidas. Além disso, nos países de clima tropical, onde a cultura da cana é perene, o controle químico da broca não é recomendado e, quando praticado, tem altos índices de ineficiência (RUVOLO-TAKASUSUKI et al., 2002). A forma de aplicação desses produtos na lavoura, também torna difícil a sua penetração no interior da planta onde as lagartas de diversas idades provocam os maiores prejuízos. Devido a esses fatores, torna-se necessário o desenvolvimento de uma forma de controle que promova menos prejuízos ao ecossistema e que seja eficiente no controle da broca da cana.

Uma alternativa bastante praticada é o controle biológico, que é a supressão de pragas e doenças através de agentes bióticos que lhes são tóxicos, antagônicos e/ou letais (FONTES, 1992). A cana-de-açúcar é um agroecossistema que abriga rica entomofauna, tanto de insetos nocivos (pragas) como os benéficos, que são os parasitóides e predadores que podem exercer papel importante no controle de espécies-praga (ARAÚJO & MACEDO, 2000).

Com o desenvolvimento do Próalcool, as décadas de 70 e 80 representaram um período de altos investimentos em projetos relacionados a cultura de cana-de-açúcar. Foi então implantado o Programa Nacional de Controle Integrado da Broca da cana-de-açúcar *Diatraea* spp., com a finalidade de dinamizar o controle biológico deste inseto no Brasil. Este é considerado o maior programa de controle biológico do mundo, e teve como base a utilização do parasitóide das larvas da broca conhecido cientificamente como *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera:

Braconidae) Esse parasitóide foi introduzido no Brasil em 1974 por A. F. no Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) – Planalsucar, estado de Alagoas. Durante o período de 1974 a 1985, foram produzidos 4,4 bilhões de parasitóides em 50 laboratórios espalhados pelo país, e liberados 4,0 bilhões de indivíduos em uma área de aproximadamente 800 mil hectares. Nos últimos anos, o uso da vespa *C. flavipes* como parasitóide em liberações constantes para o controle da broca no Brasil reduziu significativamente as perdas anuais provocadas por esta praga (ROSSI, 2000; BOTELHO et al., 2004; CAMPOS & MACEDO, 2004).

MACEDO et al. (1984) estimaram o benefício econômico durante 10 anos de utilização deste programa de controle no estado de Alagoas,. Em 1974, a intensidade média de infestação foi estimada em 8,6%, decaindo para 2,64% em 1983, o que representou um ganho total no valor de aproximadamente 509 mil toneladas de açúcar. O ganho líquido final estimado foi de 52,4 milhões de dólares. BOTELHO (1992) demonstram que a utilização da *C. flavipes* participou com até 76,64% do parasitismo total de *D. saccharalis* na região centro-sul do Brasil. Porém, os níveis de parasitismo ainda são muito variáveis.

Também tem sido utilizado no Brasil, com até 20% de controle da broca da cana, um sistema de manejo integrado utilizando uma outra espécie de parasitóide das largatas, a mosca *Metagonistylum minense* Townsend (Diptera: Tachinidae) e dos ovos *Trichogramma galoii* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (CRUZ et al., 2000).

O controle biológico usando parasitóides como inimigos naturais, é a forma mais utilizada para minimizar os danos provocados pela broca da cana-de-açúcar, e produz bons índices de redução nos prejuízos provocados por esta praga (ARAÚJO & MACEDO, 2000; BOTELHO et al., 2004; CAMPOS & MACEDO, 2004). Porém, a utilização desses parasitóides apresenta algumas desvantagens. A ação dos inimigos naturais varia muito de região para região e de ano para ano, e essas variações podem influenciar no sucesso das populações infestantes do inseto. Outra desvantagem seria o grande número de inimigos naturais a serem produzidos em

extremamente superior ao obtido nos bioensaios realizados com a estirpe S76 (13,06 ng/mL), o que indica que o isolado brasileiro é mais eficiente contra a broca da cana do que o isolado selecionado pelo grupo de pesquisa do México.



Fotos: GITAHY, P. M.

Figura 3- (A)- Microscopia ótica de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76, selecionada pela alta atividade bioinseticida contra a broca da cana na Embrapa Agrobiologia. (B)- Bioensaios com larvas de *D. saccharalis* em placas de dieta de soja com bagacilho, contendo caldo nutritivo que é o controle negativo, com as larvas vivas e dieta revolvida após 10 dias, e esporos e cristais concentrados da estirpe S76 com todas as larvas utilizadas no tratamento mortas.

## 5. Considerações finais

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e dentre os fatores que mais afetam a produtividade desta cultura estão os danos provocados pela broca da cana *D. saccharalis*. Este inseto é de difícil controle devido, principalmente, a localização das larvas no interior dos colmos das plantas onde ocorrem os maiores prejuízos. Dentre as formas de controle biológico, o uso de *B. thuringiensis* para o minimizar os danos causados pela da broca é uma boa alternativa. A utilização de ferramentas biotecnológicas tem permitido o desenvolvimento de diversas plantas e microrganismos geneticamente modificados contendo os genes *cry* de *B. thuringiensis*, capazes de controlar insetos-praga de diferentes ordens.

cana-de-açúcar contendo o gene *cry1Ab* conferiram resistência a broca nos testes de campo realizados (BRAGA et al., 2003).

Em recente trabalho realizado no Laboratório de Genética e Bioquímica da *Embrapa Agrobiologia*, foi selecionada e caracterizada parcialmente uma estirpe de *B. thuringiensis* isolada da cidade de Padre Bernado no estado de Goiás e depositada no Banco de Germoplasma Microbiano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), com alto potencial entomopatogênico contra a broca da cana-de-açúcar, denominada S76 e classificada como subespécie *kurstaki* (Figura 3). Neste trabalho, foram analisadas em bioensaios seletivos com larvas de *D. saccharalis*, cinco estirpes de *B. thuringiensis* provenientes do Banco de Germoplasma Microbiano do Cenargen. Dentre as estirpes testadas, a S76 provocou 100% de mortalidade das larvas tratadas, enquanto as outras estirpes provocaram taxas de mortalidade inferiores a 5%. Bioensaios específicos definiram que 13,06 µg/L (13,06 ng/mL) de massa seca produzida pela estirpe S76 foi capaz de provocar a mortalidade de 50% da população de insetos tratados, enquanto que para a estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, utilizada como padrão para atividade contra insetos lepidópteros, foi necessário uma concentração de 143,88 µg/L (143,88 ng/mL) de massa seca. Estes valores demonstraram que a atividade letal da estirpe S76 contra as larvas de *D. saccharalis* foi aproximadamente 10 vezes maior do que a estirpe comercial HD-1. Foi detectada a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2* na estirpe S76, indicando que as toxinas codificadas por estes genes, ou uma combinação delas, pode ser responsável pela alta mortalidade provocada (GITAHY, 2000). Relatos anteriores indicam o alto efeito da toxina codificada pelo gene *cry1Ab* para larvas de *D. saccharalis* (ARENCIBIA et al., 1997; BRAGA, 2001; BRAGA et al., 2003).

ROSAS-GARCIA et al. (2004) selecionaram no México uma estirpe de *B. thuringiensis* denominada GM-34, que contém os genes *cry1Aa* e *cry1Ab*, pela alta atividade letal contra a broca da cana. Foram necessários 33,21 µg/mL de massa seca da estirpe GM-34 para matar 50% da população de insetos tratados. Este valor é

laboratórios e liberados em campo, tornando-se necessária a criação de laboratórios e mão-de-obra especializada para a produção em massa desses inimigos, assim como o monitoramento destas populações nas grandes áreas afetadas. Além disso, foi constatada a ocorrência de um hiperparasitóide, que são parasitas que atacam outros parasitas (LIMA FILHO, 1997b), em casulos de *C. flavipes* nos canaviais de Pernambuco, Alagoas, Rio de Janeiro e São Paulo. Este foi identificado como *Aphanogmus fijiensis* Ferrière (Hymenoptera: Ceraphronidae), com distribuição já constatada em outros países. Também já foi descrita a ocorrência de outros hiperparasitóides no Brasil e no continente americano, parasitando pupas do taquinídeo *Metagonistylum minense* (MENDONÇA, 1996). Todo cuidado deve ser tomado ao introduzir os parasitóides nos canaviais para evitar o desequilíbrio das populações presentes no agroecossistema.

Desta forma, tem-se tentado aliar métodos de controle e outros inimigos naturais com menor risco para a utilização em grande escala. Neste contexto, o emprego de vírus, fungos e bactérias entomopatogênicas vêm ganhando importância.

No controle biológico por meio de microrganismos entomopatogênicos, DINARDO et al. (1988) avaliaram a utilização do vírus da granulose (DsGV) no combate a *D. saccharalis*, porém não houve controle da praga. A utilização de fungos entomopatogênicos foi observada por LECUONA et al. (1996) na Argentina, onde a ocorrência dessa praga provocou 20% de redução na produção do milho. Neste caso, a presença do fungo *Beauveria bassiana* causou mortalidade das larvas da broca variando de 50 a 90%.

Dentre os microrganismos entomopatogênicos, o mais utilizado comercialmente é uma bactéria denominada *Bacillus thuringiensis*. O bioinseticida sintetizado a partir desta bactéria é utilizado há mais de 50 anos para o controle de insetos, e representa um eficiente agente para o controle microbiano de diversas pragas agrícolas.

### **3. *Bacillus thuringiensis***

---

A atividade tóxica do *B. thuringiensis* está relacionada com a produção de inclusões cristalinas protéicas (ICP) durante a esporulação. As delta-endotoxinas ou proteínas Cry contidas nos cristais, quando ingeridas por insetos susceptíveis, são solubilizadas e ativadas no intestino médio e se unem as células do epitélio formando poros e desestabilizando os gradientes osmótico e iônico, provocando a morte do inseto (SCHNEPF et al., 1998). *B. thuringiensis* apresenta elevada especificidade e é ativo para insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e em descobertas recentes, foram observados isolados eficientes contra insetos das ordens Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera, Isoptera, Mallophaga, Neuroptera, Orthoptera, Siphonaptera, Thysanoptera, além de outros grupos de invertebrados como nematóides, ácaros e protozoário. É inofensivo a insetos não alvo, plantas, vertebrados e ao meio ambiente (SCHNEPF et al., 1998, GLARE & O'CALLAGHAN, 2000, POLANCZYK & ALVES, 2003, FIUZA, 2004).

Estima-se que cerca de 67.000 espécies de insetos provoquem danos a 11 milhões de toneladas de plantas cultivadas, equivalente a 13% da produção agrícola nacional. As regiões tropicais, quase sempre as mais pobres do mundo, são as que mais sofrem com a alta incidência de insetos-praga (BOBROWSKIL et al., 2003).

Os bioinseticidas que contêm como ingrediente ativo a bactéria *B. thuringiensis*, representam cerca de 1% do mercado mundial de inseticidas (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000), porém dentro do universo dos agentes de controle biológico é responsável por mais de 90% do faturamento (SHARMA et al., 2000; SHELTON et al., 2002; POLANCZYK & ALVES, 2003). O mercado para produtos à base desta bactéria é estimado em 60 a 80 milhões de dólares por ano. O crescimento anual do mercado de bioinseticidas é de 10 a 25%, enquanto o mercado de inseticidas químicos apresenta taxa de crescimento anual entre 1 e 2% (TAPPESER, 1997; AZEVEDO, 1998). Estima-se que são aplicados anualmente no mundo 13.000

SALAMITOU, 2000). É importante ressaltar que generalizações sobre o impacto deste microrganismo no ambiente são difíceis, já que existem aproximadamente 60.000 isolados de *B. thuringiensis* conhecidos (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000) e 325 toxinas da classe Cry já caracterizadas.

### **4. Controle de *D. saccharalis* com *B. thuringiensis***

---

Desde o isolamento da estirpe HD-1 na década de 60, classificada como *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, com toxicidade superior às estirpes até então utilizadas nos produtos comerciais para o controle de insetos da ordem Lepidoptera (DULMAGE, 1970), várias estirpes da subespécie *kurstaki*, e em menor quantidade de outras subespécies, tem sido utilizada comercialmente para o controle de insetos lepidópteros.

A atividade de *B. thuringiensis* para a broca da cana *D. saccharalis* já foi testada por alguns pesquisadores. BOHOROVA et al. (1996) utilizaram 426 isolados de *B. thuringiensis* contra as quatro pragas de maior importância econômica para cultura do milho, *D. saccharalis*, *D. grandiosella*, *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*, e foram selecionados 25 isolados mais eficientes. Dos isolados selecionados para *D. saccharalis*, nenhum apresentou taxa de mortalidade superior a 60%, porém todos eles apresentaram maior toxicidade do que a estirpe padrão de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1.

ARENCIBIA et al. (1997) desenvolveram plantas de cana-de-açúcar expressando o gene *cry1Ab*, e em bioensaios com larvas neonatas da broca, foi verificado que apesar da baixa expressão da proteína Cry1Ab nas plantas, a atividade entomopatogênica contra *D. saccharalis* foi significativa. Pesquisas desenvolvidas na Copersucar, também utilizaram o gene *cry1Ab* para transformar geneticamente algumas cultivares de cana-de-açúcar, com a finalidade de conferir tolerância a broca *D. saccharalis* (BRAGA, 2001). Estas cultivares foram liberadas para testes em condições de campo em regime controlado, com a autorização do Conselho Nacional de Biossegurança - CNTBio (processo nº 01200.000113/99-52), e os autores verificaram que as plantas de

### 3.3. Impacto de *B. thuringiensis* no ambiente e em organismos não-alvos

As preocupações mais evidentes dizem respeito a prováveis desequilíbrios ambientais, ao efeito dessas toxinas em organismos não alvo, incluindo os humanos e à incerteza da permanência dos resíduos das delta-endotoxinas no ambiente. Este último aspecto, já discutido no tópico referente as plantas transgênicas.

Resultados que demonstraram o efeito adverso do pólen do milho Bt nas larvas da borboleta monarca (LOSEY et al., 1999) provocaram grande repercussão sobre os possíveis impactos no uso das delta-endotoxinas. Essa pesquisa foi extremamente criticada e novos estudos realizados na Universidade de Cornell confirmaram o efeito larvicida do pólen de milho Bt para as lagartas da monarca. Porém, os autores indicam que a cronologia é um fator fundamental para que este dano ocorra. E muitos fatores devem estar envolvidos. As larvas precisam estar emergindo e alimentando-se na mesma época de polinização do milho, um prazo curto que varia de 7 a 10 dias. O pólen precisa estar presente na folha de uma planta específica (lactífera) e a lagarta deve comê-la continuamente, sem evitá-la ou comer outra folha. A lagarta precisa ainda consumir o pólen antes que este seja eliminado das folhas pela chuva, vento ou orvalho.

O fato de que cada classe das proteínas Cry afetam poucas espécies de insetos e somente na fase larval aumenta a segurança nessas toxinas. Vários autores indicam que os inimigos naturais (patógenos, predadores e parasitóides) são raramente afetados (BOBROWSKI et al., 2003; POLANCZYK et al., 2003).

Em relação a alimentação humana, este microrganismo é utilizado como agente de controle biológico há mais de cinco décadas, sugerindo que as delta-endotoxinas não tem efeitos sobre o homem ou animais, excluindo os insetos alvo de controle. Embora tenha sido verificado efeito de algumas subespécies de *B. thuringiensis* sobre animais em laboratório, esses resultados são variáveis.

Os riscos em utilizar *B. thuringiensis* devem ser sempre comparados aos riscos em utilizar inseticidas químicos, com impacto reconhecidamente maior sobre o ambiente (HANSEN &

toneladas de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (HANSEN & SALAMITOU, 2000).

Em 1998, existiam 200 produtos à base dessa bactéria registrados nos EUA, desenvolvidos por várias empresas como: Abbott, Sandoz, Bactec, Novo-Nordisk, Mycogen, Ecogen, Fermone, Solvay e Randoja (MONNERAT et al., 1999). O continente americano é responsável por 50% deste mercado, principalmente Estados Unidos e Canadá. A América Latina representa apenas 8 a 10% do total. As informações sobre o mercado brasileiro de bioinseticidas são escassas, devido principalmente à falta de publicações dos fabricantes. Em 1991, existiam sete inseticidas microbianos à base de *B. thuringiensis* registrados no Brasil. Com a proposta de regulamentação específica para o registro de biopesticidas em 1995, novos registros foram concedidos, e em 1998, treze formulações à base de *B. thuringiensis* tinham registro no país. Estas formulações são comercializadas pelas empresas Agri-control, Abbott Lab, Novartis S.A. Biociências, Geratec, Solvay do Brasil, Hoechst e Schering e Agrevo (AZEVEDO, 1998). O produto mais comercializado é o Dipel®, Abbott (*B. thuringiensis* subespécie *kurtaki* HD-1), eficiente para 170 lepidópteros e pouco tóxico para outros insetos (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000).

A utilização de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* oferece várias vantagens, como segurança ambiental, já que esta bactéria é inócua aos vertebrados e meio ambiente (KRIEG & LANGENBRUCH, 1981); disponibilidade natural deste organismo no solo, água e insetos, já que é uma bactéria cosmopolita; ação específica contra um número restrito de espécies; alta toxicidade para os insetos-alvo; compatibilidade com métodos de controle químico e biológico, podendo ser utilizada em programas de manejo integrado de pragas; e possibilidades de manipulação genética e descoberta de novas estirpes mais eficientes. Dentre as desvantagens, podem ser citadas a reduzida disponibilidade no mercado; estreita faixa de insetos hospedeiros, que apesar de ser uma vantagem pode ser considerada pelos agricultores uma limitação; ação restrita a um estágio de desenvolvimento do inseto e somente se este ingerir a toxina via oral (GELERNTER & SCHWAB, 1993; FRANKENHUYSEN, 1993; SCHNEPF et al., 1998).

Estes bioinseticidas lideram o mercado a aproximadamente 5 décadas e marcou a substituição dos inseticidas convencionais em diversas áreas. O grande interesse nesse microrganismo gerou muitas informações sobre aspectos determinantes na eficiência destes produtos.

As principais formas de utilização de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico estão descritas abaixo.

### 3.1. Formas de utilização de *B. thuringiensis*

#### 3.1.1. Uso direto de *B. thuringiensis*

A principal forma de utilização deste agente é a pulverização direta de uma mistura dos cristais e esporos. Os produtos comerciais são obtidos após o processo de fermentação da cultura desta bactéria, e os esporos e cristais são concentrados e formulados. Apesar da crescente utilização deste agente de biocontrole, a pulverização direta da mistura dos esporos e cristais apresenta algumas desvantagens que limitam a sua utilização. O custo ainda é superior ao dos inseticidas químicos, é baixo o efeito residual da delta-endotoxina nas folhas, solo e água, além da incapacidade de penetrar no interior das plantas ou no solo onde algumas pragas se alimentam (GERLENTER & SCHWAB, 1993)

Pulverizações a base de *B. thuringiensis* são mais utilizadas para o controle de pragas florestais, principalmente nos EUA e Canadá. Nos EUA, cerca de 2 milhões de hectares de florestas foram tratadas com este bioinseticida para o controle de *Lymantria dispar*, *Choristoneura fumifera* e *C. occidentalis* de 1980 até 1995. Em vários casos ocorreu a erradicação da praga. Na Austrália são pulverizados para o controle de pragas em várias culturas, como algodão, tabaco, frutíferas e ornamentais (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000).

México e Cuba lideram a utilização destes bioinseticidas na América Latina, controlando pragas de algodão, banana, batata, citros, hortaliças, tabaco, milho e pastagens. Estes são os únicos países com produção própria destes bioinseticidas, o que os torna competitivos em relação aos produtos químicos. No Brasil,

1994), *Pectinophora gossypiella* (TABASHNIK et al., 2000), *Spodoptera exigua* (MOAR et al., 1995), *S. littoralis*, *Cadra cautella*, *Homoeosoma electellum*, *Ostrinia nubilalis*, os coleópteros *Leptinotarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta* (FRUTOS et al., 1999) e os dípteros *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (ESTADA & FERRÉ, 1994; FRUTOS et al., 1999).

Em função de características genéticas, os insetos podem reagir a pressão de seleção no ambiente. Os indivíduos com capacidade de suportar esta pressão, transferem esta característica aos seus descendentes, aumentando a cada geração a frequência do alelo que fornece a resistência. Quando a pressão de seleção é diminuída, a tendência a resistência também diminui a cada nova geração, o que indica que a resistência é uma característica reversível e está ligada a um gene recessivo (HECKEL et al., 1999; FERRÉ & VAN RIE, 2002). Em muitos casos os insetos são selecionados em laboratório apresentando resistência cruzada a algumas toxinas de *B. thuringiensis*, mas são susceptíveis a diversas outras delta-endotoxinas administradas (TABASHNIK et al., 2000).

Evidências sugerem, que a resistência de insetos às delta-endotoxinas está associada à redução na ligação da toxina aos receptores específicos presentes no intestino médio dos insetos-alvo (FERRÉ et al., 1991; HERRERO et al., 2001; FERRÉ & VAN RIE, 2002). Entretanto, o modo de ação das delta-endotoxinas, permite propor algumas hipóteses para os prováveis mecanismos de resistência, como a incapacidade de solubilização do cristal devido a uma mudança no pH intestinal; presença de proteases intestinais incapazes de ativar as toxinas, ou então, proteases muito eficientes, que poderiam digerir toda a molécula de protoxina; mudança conformacional dos receptores; e hipersensibilidade dos insetos-alvo (MONNERAT et al., 1999).

O desenvolvimento de resistência dos insetos aos patógenos é um processo lento e considerado como uma coevolução do patógeno e do hospedeiro, e na maioria das vezes é considerada uma característica reversível (CERDA et al., 2003).

se obter níveis de toxina suficientemente altos para matar diferentes espécies de insetos. Os organismos transgênicos, podem apresentar ação tóxica diminuída em relação a aplicação direta de *B. thuringiensis*, no qual a ingestão do esporo em mistura com o cristal aumenta a virulência, favorecido pela presença de toxinas ativas nos tecidos externos do esporo e pela multiplicação vegetativa dos esporos no interior dos insetos. Uma outra desvantagem é o fato de que o processo de registro de organismos transgênicos é atualmente muito lento e custoso.

Fatores críticos são importantes para o desenvolvimento e sucesso comercial dos agentes de controle biológico, como a escolha de um sistema apropriado para o agente agir onde o inseto é prevaiente, programas específicos para aumentar a confiabilidade dos agricultores, relação custo e benefício lucrativa e normas adequadas para registro do produto por órgãos governamentais, principalmente os biotecnológicos. No Brasil, existem várias linhas de pesquisa na área de controle biológico sendo desenvolvidas, tanto pesquisas básicas quanto aplicadas. É de se esperar, portanto, que práticas de controle biológico estejam mais difundidas nos próximos anos, e que novos produtos venham a ser desenvolvidos e comercializados em nosso país.

### 3.2. Indução de resistência nos insetos à *B. thuringiensis*

Para evitar o surgimento de resistência dos insetos às delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, é necessário compreender os efeitos biológicos do agente de controle e os mecanismos de resistência que a praga pode desenvolver.

Dos casos descritos, apenas o lepidóptero *Plutella xylostella* (traça das crucíferas), desenvolveu resistência em condições de campo a produtos formulados à base de *B. thuringiensis* (FRUTOS et al., 1999; FERRÉ & VAN RIE, 2002). Neste caso, o produto Dipel®, comercializado pela empresa Abbott, foi utilizado em todos os tratamentos. Outros casos foram detectados através de testes de seleção em condições de laboratório (FERRÉ & VAN RIE, 2002), como com os lepidópteros *Plodia interpunctella* (MCGAUGHEY, 1985), *Heliothis virescens*, *Trichoplusia ni* (ESTADA & FERRÉ,

aplicam-se estes produtos para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola em cerca de 150.000 hectares, números pequenos quando comparados aos dos países acima citados e ao tamanho da área agrícola brasileira. Na China estes bioinseticidas são utilizados em uma área de cerca de 1 milhão de hectares para o controle de pragas agrícolas e florestais. E já se tem relato de pulverizações de produtos à base de *B. thuringiensis* no Egito, Israel, Indonésia, Malásia, Índia e países da África Ocidental (POLANCZYK et al., 2003).

Visando obter produtos mais eficientes e que minimizem as desvantagens da aplicação direta de *B. thuringiensis*, pesquisas estão sendo desenvolvidas, principalmente utilizando tecnologias modernas como a do DNA recombinante. Já existem produtos no mercado, obtidos a partir da transferência dos genes *cry* de *B. thuringiensis* para plantas ou outros microrganismos, visando principalmente maior eficiência das delta-endotoxinas no controle de insetos, que são abaixo descritos.

#### 3.1.2. Plantas transgênicas

A introdução dos genes *cry* em plantas, as chamadas plantas Bt foi um dos primeiros projetos desenvolvidos na área da biotecnologia vegetal. As primeiras plantas transgênicas que foram aprovadas para comercialização no ano de 1996 nos EUA, foram: milho expressando a toxina Cry1Ab (Mximizer™ da Novartis) para o controle de *Ostrinia nubilalis*; algodão expressando a toxina Cry1Ac (Bollgard™ da Monsanto) para o controle de *Helicoverpa* spp., e batata expressando a toxina Cry3A (Newleaf™ da Monsanto), para o controle de *Leptinotarsa decemlineata* (JOUANIN et al., 1998). A principal cultura modificada com esses genes foi o milho com uma área equivalente a 5,9 milhões de hectares, a maioria expressando a toxina Cry1Ab resistente a broca europeia do milho *Ostrinia nubilalis* (ZWAHLEN et al., 2003).

Dentre as desvantagens das plantas Bt, pode-se citar a diferença do percentual de bases dos códons preferencialmente expressos em plantas e os genes *cry* de *B. thuringiensis*. O genoma das plantas possui elevado percentual de bases G (guanidina) e C (citosina),

enquanto os genes *cry* apresentam as bases A (adenina) e T (timina) em maior quantidade (64%). Como consequência os códons preferenciais dos genes de *B. thuringiensis* são ineficientes em plantas, determinando a não tradução ou uma meia vida do mRNA muito curta, o que leva a expressão reduzida deste gene. A substituição de nucleotídeos da seqüência codificadora por meio da síntese química ou da utilização de formas truncadas, auxilia a correta leitura para tradução destes genes em plantas (BOBROWISK et al., 2003). Muitos trabalhos foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar o percentual de bases G e C dos genes *cry*. KOZIEL et al., (1993) alteraram a seqüência do gene *cry1Ab* e transformaram plantas de milho para o controle de *Ostrinia nubilalis*, sendo a mesma estratégia utilizada por FUJIMOTO et al. (1993), WÜNN et al. (1996) e HIGH et al., (2004) em plantas de arroz. ADANG et al. (1993) e PERLAK et al. (1993) alteraram o conteúdo de bases A e T do gene *cry3A* e transferiram para plantas de batata. A mesma estratégia também foi adotada em plantas de algodão (PERLAK et al., 1990; WU & GUO, 2005). Todas essas pesquisas demonstraram uma maior estabilidade do gene *cry* transcrito, aumentando a produção da delta-endotoxina nas plantas transformadas (SHARMA et al., 2000).

A produção da delta-endotoxina nas plantas oferece a vantagem da toxina ser produzida constantemente pelos tecidos, com ação semelhante aos inseticidas químicos sistêmicos, tornando toda a planta protegida inclusive contra os insetos que atacam os tecidos internos (JOUANIN et al., 1998; SCHNEPF et al., 1998). Este sistema foi considerado ambientalmente seguro, acreditando-se que a toxina seria sintetizada dentro dos tecidos da planta não deixando resíduos no ambiente. Porém, vários estudos posteriores ressaltaram a importância de monitorar o impacto dos resíduos das toxinas Cry nas plantas geneticamente modificadas (PGM). Os resíduos destas toxinas após a colheita podem acarretar problemas para o ecossistema e o impacto depende principalmente da persistência da toxina no ambiente.

PALM et al. (1996) avaliaram a persistência da delta-endotoxina Cry1Ac codificada pelo algodão Bt em diferentes solos, numa concentração de até 1600 ng de toxina/g de solo. Os autores

*subtilis* e *B. licheniformis* que colonizam filoplano de tomate para controlar o lepidóptero *Tuta absoluta* (THEODOLUZ et al., 2003).

Um dos primeiros produtos de *B. thuringiensis* geneticamente engenheirados e aprovado para o uso agrícola nos EUA, foi o bioinseticida MPV® (comercializado pela empresa Mycogen), recomendado para o controle de *Plutella xylostella* e outros lepidópteros. Neste produto, o gene *cry1Ac* é expresso em altos níveis nas células de *Pseudomonas fluorescens*, onde os cristais permanecem encapsulados (processo denominado CellCap®), e que lhe confere maior persistência no campo (GERLENTER & SCHWAB, 1993).

Um outro processo utilizado para aumentar o espectro hospedeiro da bactéria foi a conjugação entre estirpes de *B. thuringiensis*, visando explorar o sinergismo das toxinas quando ministradas em conjunto. A finalidade deste processo é ampliar a ação da bactéria contra diversas pragas, já que cada toxina de *B. thuringiensis* é codificada por um único gene e apresenta espectro hospedeiro. Este processo ainda pode eliminar as toxinas com baixa atividade inseticida e incorporar outras com maior potencial (PARK et al., 2000; POLANCZYK & ALVES, 2003). Os primeiros produtos desenvolvidos a partir desta técnica disponibilizados no mercado foram Foil® e Condor®, comercializados pela empresa Ecogen e recomendados para o controle do complexo de insetos-praga da batata e pragas florestais, respectivamente (NAVON, 1993).

Entre as vantagens oferecidas pelos microrganismos recombinantes, estão a relativa rapidez na sua obtenção e o fato da transferência genética estar ocorrendo entre dois microrganismos, o que torna desnecessário a modificação do percentual de bases dos genes *cry*, como acontece para a transformação de plantas. Uma outra característica vantajosa é a facilidade de inoculação destes microrganismos nas áreas afetadas pelos insetos, além do fato de que no caso de bactérias colonizadoras de rizosfera e dos tecidos internos da planta, a ação da toxina pode ser direcionada aos tecidos específicos onde o inseto-praga se alimenta.

As desvantagens no uso de microrganismos transgênicos podem ser ampliadas para as plantas transgênicas, como a dificuldade em

dehidrogenase e fostatase nos solos avaliados (WHEI-XIANG et al., 2004).

### 3.1.3. Microrganismos transgênicos

Uma outra forma de utilização de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico, são os microrganismos transformados geneticamente com os genes *cry*, e que apresentam algumas vantagens em relação ao uso de plantas Bt. Estes genes, introduzidos inicialmente em *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens*, ampliaram as possibilidades de utilização de *B. thuringiensis* na agricultura.

As primeiras bactérias transgênicas obtidas foram as colonizadoras de rizosfera, como *P. fluorescens* e *Agrobacterium radiobacter* contendo o gene *cry1Ab* (OBUZOWICZ et al., 1986) e *P. fluorescens* contendo o gene *cry1Ac* (HERRERA et al., 1994). Com o intuito de controlar pragas que se alimentam dos tecidos internos da planta, foram promovidas a transferência dos genes *cry* para bactérias endofíticas, como *Clavibacter xyli* contendo o gene *cry1Ac* (LAMPEL et al., 1994); bactérias do gênero *Rhizobium* contendo o gene *cry3A* (SKOT et al., 1990; 1994; BEZDICECK et al., 1994); *Bradyrhizobium* sp. com o gene *cry4* (NAMBIAR et al., 1990), *Azospirillum lipoferum* contendo o gene *cry1Aa* (UDAYASURIYAN et al., 1995); *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (SALLES et al., 2000) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (GITAHY et al., 1997), todas bactérias endofíticas diazotróficas de cana-de-açúcar contendo o gene *cry3A* para o controle do coleóptero *Migdolus fryanus*. Construções contendo o gene *cry1Ac7* foram introduzidas em *H. seropedicae* e *P. fluorescens* para o controle de *Eldana saccharina*, broca que ataca plantas de cana, resultando alta mortalidade nos bioensaios realizados (DOWNING et al., 2000). Ainda foram modificados geneticamente o vírus da poliedrose nuclear *Autografa californica* com o gene *cry1Ab* (MARTENS et al., 1990; CHANG et al., 2003) e cianobactérias que servem de alimento para larvas de mosquitos, contendo os genes *cry4A* e *cry11A* (MURPHY & STEVENS JR., 1992; XIAOQIANG et al., 1997). O gene *cry1Ab* também foi introduzido em estirpes de *B.*

avaliaram a presença da toxina até 140 dias depois, quando não a detectaram mais no ambiente. SAXENA et al. (2002) desenvolveram estudos *in vitro* e *in situ* e detectaram a toxina Cry1Ab codificada pelo gene truncado nos exsudatos da raiz do milho Bt e se acumulando no solo onde os transgênicos foram plantados por até 350 dias após o início dos estudos. Neste caso, foi verificado que a toxina estava adsorvida na superfície de partículas de argila e substâncias húmicas. ZWAHLEN et al. (2003) também investigaram por meio de testes imunológicos (ELISA), a persistência da mesma delta-endotoxina expressa em milho Bt cultivado em clima temperado. Num sistema de lavoura e após dois meses, as concentrações de toxina diminuíram em 20% dos valores iniciais. Em condições de laboratório, após 40 dias as concentrações da toxina Cry1Ab diminuíram rapidamente para 38% da concentração inicial. Depois de 200 dias, foi detectado 0,3% da quantidade inicial da toxina Cry1Ab. Esses dados demonstram que muito ainda tem que ser investigado sobre a persistência e o efeito dessas toxinas no ambiente.

Algumas plantas modificadas resistentes a insetos contém cópias únicas dos genes *cry* completos, fusionados a promotores de forte expressão e genes marcadores. As delta-endotoxinas codificadas por estas plantas são solubilizadas no suco gástrico do lúmen intestinal dos insetos e quebradas até liberação do núcleo tóxico por proteases específicas. Ocorre lise das células do epitélio intestinal, desbalanço osmótico e as larvas dos insetos susceptíveis morrem. Este processo é idêntico ao ocorrido pela delta-endotoxina codificada pelo *B. thuringiensis*.

Porém, algumas plantas recebem a versão truncada do gene *cry*. Plantas de milho desenvolvidas pela Ciba (agora Novartis) e Syngenta contém cópias do gene sintético *cry1Ab* truncados. Neste caso, a versão truncada gera uma delta-endotoxina precursora menor que é sintetizada ao longo do crescimento vegetativo da planta e se mantém solúvel nas células vegetais (SAXENA & STOTZKY, 2001). A maioria das protoxinas são solúveis em pH maior que 9,5 e o pH nas células das planta é em média 7,6. Os genes *cry* truncados codificam o núcleo tóxico das delta-endotoxinas

quase completamente ativado, se mantendo solúvel no pH das células vegetais.

Segundo TAPPESE (1997), o núcleo tóxico das delta-endotoxinas codificados pelos genes *cry* truncados expressos nas plantas Bt, podem atravessar diretamente a membrana peritrófica sem os passos de clivagem que acontecem com a protoxina. Larvas alimentadas com o núcleo tóxico apresentam uma interação patógeno – hospedeiro diferente daquelas alimentadas com a protoxina. As plantas transgênicas contendo as cópias truncadas do gene, podem aumentar o surgimento de resistência nos insetos e diminuir a especificidade quando comparadas aos insetos tratados com as protoxinas.

Outra desvantagem freqüentemente apontada em relação as plantas transgênicas expressando a delta-endotoxina é a indução de resistência nos insetos, devido a sua exposição constante a determinados níveis de toxina (AZEVEDO, 1998; PEREIRA et al., 1998; GLARE & O'CALLAGHAM et al., 2005). Algumas estratégias podem ser adotadas para prevenir este problema, como a produção de várias delta-endotoxinas na mesma planta. Sabendo-se que a resistência dos insetos a proteínas Cry pode estar relacionada com a redução da ligação da toxina aos receptores específicos do intestino (FERRÉ et al., 1991), e que existe alta especificidade entre os receptores e as diferentes delta-endotoxinas (BOSH et al., 1994), fornecer ao inseto várias toxinas ao mesmo tempo pode minimizar o problema de resistência. Se o inseto adquirir resistência em função de uma determinada proteína, outra ainda permanecerá ativa. Outra estratégia para prevenir o surgimento de resistência, seria a criação de áreas cultivadas na lavoura com plantas não transgênicas. Essas plantas-isca servem de refúgio para os insetos, o que levaria a uma diluição na população com alelo de resistência. A criação de refúgios na lavoura é uma medida especificada como condição de cultivo no rótulo do produto (PEREIRA et al., 1998). Um outro método utilizado é a expressão da toxina direcionada para tecidos específicos ou controlada temporalmente para determinada fase de desenvolvimento da planta, o que limitaria a expressão contínua da toxina. Neste caso, algumas estratégias já foram desenvolvidas, como a inserção dos genes *cry* em cloroplastos ou sob o controle de

determinados promotores como o PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilase), promovendo a expressão da toxina apenas nos tecidos verdes, ou sob controle de outros promotores, direcionando a expressão do gene em determinados tecidos (MCBRIDE et al., 1995; CAROZZI & KOZIEL, 1997). A natureza procariótica dos plastídios vegetais permite a transcrição dos genes *cry*, tradução e processamento do RNA mensageiro de forma mais eficiente. Porém, a transformação de cloroplastos não é uma técnica simples e não pode ser utilizada como rotina para a maioria das plantas, com aplicação restrita a plantas modelo de tabaco e tomate (BOBROWISK et al., 2003).

Alguns casos de resistência de insetos as delta-endotoxinas já foram relatados. As bases teóricas para a indução da resistência, assim como os exemplos já existentes serão discutidos mais adiante.

Em função da pressão da sociedade em relação ao uso dos organismos geneticamente modificados, e de investimentos nas pesquisas de impacto ambiental provocados por estes organismos, resultados preliminares estão sendo obtidos nesta área. CHEN et al. (2004), observaram alta intensidade no metabolismo do nitrogênio no algodão Bt quando comparadas as plantas não transgênicas, especialmente durante o desenvolvimento do capulho. Os autores apontam esta característica como prejuízo em relação as plantas não transgênicas, já que ocorrerá maior demanda de nitrogênio no algodão Bt.

Vários trabalhos tem sido realizados com o intuito de investigar o efeito das PGM na microbiota e na atividade enzimática do solo. Foram avaliados os microrganismos do solo cultivado com plantas de arroz contendo o gene *cry1Ab* e aqueles de solo cultivado com plantas não transgênicas. Os resultados indicaram que o arroz Bt avaliado (Transgenic rice KeMingDao) não foi tóxico para a variedade de microrganismos avaliadas (bactérias aeróbicas, actinomicetos e fungos, bactérias anaeróbicas fermentativas, bactérias denitrificantes, bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio e bactérias metanogênicas). Os autores também não observaram diferença significativa na atividade das enzimas