

Transformação de milho com o gene *cry1C* de *Bacillus thuringiensis* visando o controle da lagarta-do-cartucho

[Previous](#) [Top](#) [Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

FERNANDO H. VALICENTE, NEWTON P. CARNEIRO, RUTH H. UTIDA,
EDILSON PAIVA e ANDRÉA A. CARNEIRO

Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151
andreac@cnpmis.embrapa.br

INTRODUÇÃO

Raças adaptadas da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) compõem uma das mais importantes pragas que afetam genótipos tropicais de milho, chegando a causar até 34% de redução na produção dessa cultura no Brasil (Cruz, 1995). Tradicionalmente, o controle dessa praga é realizado com base em inseticidas químicos, que intrinsecamente trazem conseqüências colaterais negativas em termos de toxicidade ao homem, animais e ao meio-ambiente.

O controle biológico da *S. frugiperda* é feito utilizando a bactéria de solo *Bacillus thuringiensis*, muito conhecida pela sua forma abreviada 'Bt', é de ocorrência cosmopolita, sendo encontrada nos mais diversos ecossistemas. O gênero *Bacillus* possui uma fase de esporulação característica no seu desenvolvimento na qual o esporo bacteriano e cristais proteicos são simultaneamente formados, sendo estes últimos sob forma de inclusões parasporais. Tais cristais em Bt, também chamados de 'δ-endotoxinas' são codificados pelos chamados genes *cry* e, vem sendo utilizados nos últimos 40 anos na formulação de bioinseticidas comerciais que forneceram níveis adequados e consistentes de controle biológico para diversas espécies de insetos-praga na agricultura (Estruch *et al.*, 1997; Schnepf *et al.*, 1998). Uma das principais e importantes características das proteínas inseticidas CRY é sua alta especificidade em relação às espécies-alvo de insetos afetados. A especificidade dessas toxinas deve-se a uma co-evolução de proteínas receptoras de superfície no intestino médio (mesentero) dos insetos-alvo sensíveis; estes receptores ligam-se de forma específica às δ-endotoxinas, modificando sua conformação e causando vazamento de íons e dano osmótico das células, o que conduz, conseqüentemente, à desintegração do mesentero e morte do inseto.

Apesar do custo baixo e segurança ambiental oferecido por este sistema de controle biológico, o mesmo não é mais amplamente difundido devido a problemas tais como (i) reduzida persistência das toxinas puras sobre a planta por tempo suficiente para a ação entomocida eficaz, (ii) difícil acesso da toxina à praga pelas suas características físico-químicas, e (iii) os ainda elevados custos de fabricação destes bioinseticidas (Maagd *et al.*, 1999).

O progresso atual dos conhecimentos no campo da Engenharia Genética e da Biotecnologia Moderna tem permitido o desenvolvimento de alternativas concretas para viabilizar um mais amplo emprego do controle biológico de pragas na cultura do milho. Dentre elas, destaca-se a possibilidade de obtenção e uso de plantas transformadas contendo genes codificadores das entomotoxinas de Bt.

Apesar dos cereais serem uns dos grupos mais difíceis de se transformar, plantas transgênicas têm sido conseguidas utilizando estratégias tais como eletroporação, biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997). Bombardeamento de micropartículas cobertas com DNA de interesse, biobalística, tem sido utilizado na produção rotineira de milho transgênico pelo Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo. Neste artigo descrevemos produção de plantas transgênicas de milho utilizando o gene *cryIc*, isolado do DNA da estirpe de *Bacillus thuringiensis* cepa 1644 pertencente ao Banco de *Bacillus* da Embrapa Milho e Sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Montagem cassette gênico - Promotor Ubiquitina + gene *cryIc* + terminador NOS:

Inicialmente o terminador NOS foi amplificado por PCR do vetor pCAMBIA 3301 utilizando os primers descritos na tabela 1. O fragmento foi ligado no vetor TOPO-TA (Invitrogen, USA), o plasmídeo amplificado em *E. coli*, extraído utilizando método descrito por Sambrook *et al.* (1987), clivado com EcoRI e clonado no vetor pCAMBIA 3301 clivado com a mesma enzima. O segundo passo foi o isolamento do promotor ubiquitin do vetor pAHC17 utilizando as enzimas HindIII/BamHI. O fragmento correspondendo ao promotor foi isolado do gel utilizando o Kit Qiagen (USA) e ligado no vetor pCAMBIA 3301 (já contendo o terminador NOS) clivado com as mesmas enzimas. O mapa do vetor Pcambia 3301 é descrito na Figura 1. O gene *Bt cryIc* foi isolado do DNA da estirpe de *Bacillus thuringiensis* cepa 1644 por PCR utilizando primers específicos (Tabela I). A enzima utilizada para o PCR foi a AdvantageTaqPol (Clontech, USA) e as condições de amplificação foram 30 ciclos de 95°C 15S; 60°C 30S e 72°C 3 min. A metodologia utilizada para isolamento do DNA da bactéria *Bt* foi conforme descrito em Sambrook *et al.* (1987). O produto de PCR representando o gene *cryIc* foi isolado do gel e clonado no vetor TOPO-TA. Após confirmação de sua seqüência, o gene *cryIc* foi clivado do TOPO-TA com BamHI e o ligado no vetor pCAMBIA 3301 cortado com a mesma enzima (já contendo o promotor Ubiquitina e o terminador NOS) (Figura 1). As reações de clivagem e ligação foram feitas conforme instruções do fabricante (Invitrogen, USA). As reações de seqüenciamento para confirmação da construção gênica foram feitas utilizando primers correspondendo a diferentes regiões do promotor, o gene *cryIc* e as regiões flanqueadoras do polylinker do plasmídeo Pcambia 3301 (M13F e M13R) e o kit "Big Dye Terminator" v. 3.01 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as recomendações dos fabricantes. As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando um seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências foram montadas utilizando o programa CAP3 (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>), obtendo-se uma seqüência consenso para cada clone.

Tabela 1. Composição química das silagens das quatro cultivares de milho.

	Silagem de milho			
	QPM-129	AO-1051	BRS-3000	SRS-4040
Matéria seca - MS (%)	47,3	48,1	47,6	46,1
Proteína bruta (% da MS)	8,2	7,1	7,0	8,2

Transformação Genética de Milho: Para a produção de milho transgênico via biobalística, embriões imaturos, 1,0 - 1,5 mm, foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 28 dias em meio CI (Chu *et al.*, 1975) e bombardeados de acordo com Carneiro *et al.*, 2000. A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 15 dias após bombardeamento quando os calos de milho foram transferidos para meio SM (meio CI sem prolina) suplementado com glufosinato de amônia. Calos foram subcultivados a cada duas semanas em dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3 e 9 mg/l). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura, capazes de crescer em presença do agente seletivo, foram transferidas para solo em casa de vegetação.

Análises Moleculares: DNA genômico foi isolado de 5 plantas transformadas usando o protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). A presença da construção gênica Ubiquitin.*Cry1C.NOS* nas plantas regeneradas foi confirmada utilizando PCR com primers específicos. Cada 25 µl de reação continha tampão de PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos primers, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. As reações foram feitas utilizando um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação (94°C-15", 55°C-60", 72°C-30"), e uma extensão final a 72°C por 7 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 13 plantas transgênicas da linhagem L3 (Linhagem Elite do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo) e 8 plantas transgênicas da linhagem L282 após o bombardeamento das plantas (Figura 1). As plantas de milho depois de bombardeadas foram mantidas em casa de vegetação em condições controladas e totalmente isoladas. Suas folhas foram fornecidas a lagartas do cartucho sadias provenientes da criação artificial, de 1 dia de idade, e colocadas em placas de petri. A troca de folha foi realizada quando a mesma havia sido comida pelo inseto, ou começava a murchar dentro da placa. Observações visuais e de mortalidade foram realizadas diariamente. Os resultados mostraram uma diferença significativa no consumo entre as folhas de milho fornecidas aos insetos e a mortalidade, dos 8 eventos provenientes da linhagem L282, 4 mataram as lagartas do cartucho que delas se alimentaram, porém nenhuma destas linhagens produziu sementes e o experimento não pode ser continuado. Das 13 plantas transgênicas da linhagem L3, 5 mostraram efeito de mortalidade contra a lagarta do cartucho, sendo que a LA12 matou 100% das lagartas que dela se alimentaram (Figura 3).

LITERATURA CITADA

- CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; CARVALHO, C. H. S.; VASCONCELOS M. J. V.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Milho Transgênico : Melhoria da Qualidade Nutricional do Grão. *Bio Tecnologia*. 15: 42-46. 2000.
- CHU, C C; WANG, C C; SUN, C S; HSU, C; YIN, K C; CHU, C Y; BI, F Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* 18; 659 – 668. 1975.
- Cruz, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, embrapa/cnpms, (embrapa/cnpms, Circular Técnica, 21). 1995.
- DELLAPORTA, S L; WOOD, J; HICKS, J B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19 – 21. 1983.

Estruch, J.J.; Carozzi, N.B.; Desai, N.; Duck, N.B.; Warren, G.W.; Koziel, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*, v.15, p.137-141. 1997

HIEI, Y; OHTA, S; KOMARI, T; KUMASHO, T. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of T-DNA. *Plant J* 6: 271 – 282. 1994.

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 Biotech.* 14 : 745 – 750. 1996.

KLEIN, T M; WOLF, E D; WU, R; SANDFORD, J C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 6117: 70 – 73. 1987.

Maagd, R.A.; Bosch, D.; Stiekema, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*, v.4, p.9-13. 1999.

Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, 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*. v.62, p.775-806. 1998.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
