



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

Análise molecular e de expressão em plantas de algodão contendo o  
gene *cry1la* que confere resistência a insetos

**CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA**

Recife - PE

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

**CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA**

Análise molecular e de expressão em plantas de algodão contendo o gene *cry1a* que confere resistência a insetos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Melhoramento Genético de Plantas

**Orientação: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho**

**Co-orientação: Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos**

Recife - PE

2011

## CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA

Análise molecular e de expressão em plantas de algodão contendo o gene *cry1la* que confere resistência a insetos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Melhoramento Genético Vegetal

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2011

Orientador:

---

Prof. Dr. ***Péricles de Albuquerque Melo Filho***

Departamento de Agronomia - UFRPE

Examinadores:

---

Dra. ***Liziane Maria de Lima***

Pesquisadora da Embrapa Algodão

---

Prof. Dr. ***Reginaldo de Carvalho***

Departamento de Biologia - UFRPE

---

Profa. Dra. ***Angélica Virgínia Valois Montarroyos***

Departamento de Agronomia - UFRPE

Recife – PE

2011

Ficha catalográfica

S586a Silva, Carliane Rebeca Coelho da

Análise molecular e de expressão em plantas de algodão  
contendo o gene cry1Ia que confere resistência a insetos /  
Carliane Rebeca Coelho da Silva. -- 2011.

50 f.: il.

Orientador: Péricles de Albuquerque Melo Filho.

Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Agronomia, Recife, 2011.

Inclui referências e anexo.

1. Controle de pragas 2. Transformação 3. Microinjeção  
4. *Gossypium hirsutum* I. Melo Filho, Péricles de Albuquerque,  
orientador II. Título

CDD 581.15

## DEDICATÓRIA

“Tudo o que sou e o que vier a ser eu ofereço e agradeço a Deus.”

A meus pais, *Carlos Alberto e Eliane Monteiro*, pela vida, pelo amor, pelos ensinamentos. Muito obrigada por me apoiarem todo este tempo. Faço desta conquista uma simples homenagem a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, por estar me proporcionando este momento e por todas as minhas conquistas, pois sem *Ele* eu nada seria.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), particularmente ao Programa de Melhoramento Genético de Plantas do Departamento de Agronomia, aos professores e funcionários pela realização do curso de pós-graduação.

À Embrapa Algodão/FINEP pelo suporte financeiro concedido para o desenvolvimento desse trabalho e ao CNPq pela concessão da bolsa.

A meu orientador, Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho pela confiança, e incentivo dedicados para a realização deste trabalho.

Às valiosas contribuições e ensinamentos concedidos pelas Dras. Roseane Cavalcanti dos Santos e Liziane Maria de Lima, pesquisadoras da Embrapa Algodão.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Carvalho pelo apoio e pelas facilidades concedidas quando de sua gerência no Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA (Genoma).

Aos colegas de turma Morganna, Uiara, Georgia, Kaliny, Silvany, Paulo, Fábio, Pedro, André, Odemar, Amanda, Aurélia, Taciana, Gemima, pelas lutas, vitórias e amizade construída durante o período do curso.

Aos amigos dos Laboratórios Genoma (Dep. de Biologia, UFRPE), em especial Igor, Kaliny, Karin, Sérgio, Lucas, Luiza; de Biotecnologia (Embrapa Algodão), Morganna, Pollyne, Joabson, Marlon, Fábria, Antônio, Karen, Vandrê e Milena, e de Expressão Gênica (Dep. de Agronomia, UFRPE), Isabel, Jacqueline, Felipe, Roberto, Sr. Ivaldo, Jéssica, Ellayne e Camila, pela ajuda, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração.

Às amigas Uiara Cavalcante e Kaliny Veiga, pela amizade consolidada, respeito, conhecimentos compartilhados e pelas noites de estudos inacabáveis. Em especial, minha gratidão a Morganna Pollyne, pela paciência, amizade, dedicação e companheirismo; pelo constante apoio e sugestões em todas as etapas deste trabalho.

A todos os amigos que, mesmo sem entender, permanecem comigo de alguma forma, em especial Ana Emilia e Clécia Siqueira, a quem agradeço pela amizade, carinho, compreensão e por me receberem sempre de braços abertos.

A Igor Santos, pela ajuda, apoio e incentivo; pela compreensão, companheirismo, amor, afeto, cuidado e atenção. Palavras não são suficientes para descrever tamanha gratidão.

A minha família, especialmente meus pais, pelo amor incondicional, conselhos, credibilidade, apoio, compreensão, enfim, por está comigo conquistando mais esta vitória.

A minha avó materna, Maria Nunes, pelas orações, pela fé, por estar sempre ao meu lado me apoiando. A minha avó paterna, Iolanda Silva, por contribuir, de alguma forma, para a realização deste sonho.

Ao meu avô materno, Manoel Monteiro, (*in memorian*), por ter estado sempre ao meu lado, quando em vida; por suas orações e por seu amor incondicional. Eterna saudade.

A Antonia Dias (*in memorian*) serei eternamente grata por seu amor e apoio incondicional. Não existem palavras para expressar minha gratidão e meu amor. Sempre sentirei sua falta.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

*Muito Obrigada!*

## SUMÁRIO

	<b>Págs</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1. Aspectos gerais sobre a lavoura algodoeira.....	4
2.2. Botânica do gênero <i>Gossypium</i> .....	5
2.3. Transgenia na cultura do algodão.....	5
2.3.1. Gene <i>cry</i> de Bt.....	8
2.3.2. Cultivares de algodão geneticamente modificadas.....	9
2.4. Técnicas de Transformação.....	11
2.4.1. Biobalística.....	13
2.4.2. Agrobacterium.....	13
2.4.3. Via microinjeção ( <i>ovary drip ou pollen tube pathway</i> ).....	14
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	15
<b>CAPÍTULO II – Toxicidade e expressão temporal da proteína Cry1Ia de <i>Bacillus thuringiensis</i> em eventos de algodão</b> .....	25
<b>Resumo</b> .....	26
<b>Abstract</b> .....	27
<b>Introdução</b> .....	28
<b>Material e Métodos</b> .....	30
Seleção dos eventos.....	30
Ensaio de toxicidade contra <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	30
Ensaio de Imunodeteccção via Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay .....	31
<b>Resultados e Discussão</b> .....	32
<b>Conclusões</b> .....	34



<b>Agradecimentos</b> .....	35
<b>Referências</b> .....	35
<b>Anexos</b> .....	41
Instruções para submissão de trabalhos na Revista PAB.....	42

## Lista de Figuras

Capítulo 2

**Figura 1.** Percentual de mortalidade de *S. frugiperda* em eventos T0 de algodão, corrigido por Abbott (1925).....40

**Figura 2.** Concentração da proteína cry1la em eventos T0 de algodão por meio de *ELISA*.....42

## Lista de Tabelas

Capítulo 2

**Tabela 1.** Síntese da análise de variância para toxicidade da proteína cry1a contra *S. frugiperda*.....45

**Tabela 2.** Expressão temporal da proteína cry1a via *ELISA* direto no evento BRS 293 T0-34, aos 45, 60 e 80 dias após a emergência das plantas.....47

## Lista de Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucléico
Bt	Bacillus thurigiensis
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polimerase chain reaction</i> )
RT- PCR	Reação da <i>transcriptase reversa</i> , seguida de reação em cadeia da polimerase
LGM	Lavouras Geneticamente Modificadas
NCBI	National Center for Biotechnology Information

## Resumo

As pragas agrícolas são um dos grandes problemas econômicos no manejo das grandes lavouras. Isso porque, dependendo da incidência, os prejuízos são consideráveis, incorrendo até mesmo na perda da lavoura. O controle mais efetivo se dá por meio de inseticidas químicos que oneram entre 20 e 40% o custo de produção, além de causar vários prejuízos ao homem e ao ambiente. Devido a grande dificuldade de se conseguir culturas agrícolas com resistência efetiva à insetos por meio das técnicas convencionais, várias instituições de pesquisa têm investido na aquisição de resistência via transgenia, por ser segura, efetiva e econômica. Em 2007, a equipe de biotecnologia da Embrapa Algodão editou e inseriu o gene *cry11a* de *Bt* em uma cultivar de algodão BRS 293 de modo a torná-la resistente a alguns insetos em especial a lagarta *Spodoptera frugiperda*. Neste trabalho foi realizado um amplo estudo molecular e de expressão em plantas T0 de algodão, resultantes dos trabalhos de transformação da cultivar BRS 293 de modo a constatar a integração e expressão da proteína codificante nos transgenes selecionados, por meio de bioensaios de toxicidade contra *Spodoptera frugiperda* e por imunodeteção via *ELISA*. Entre os eventos analisados, apenas cinco denominados de BRS 293 T0-34, BRS 293 T0-49, BRS 293 T0-56, BRS 293 T0-57 e BRS 293 T0-66 apresentaram taxa de mortalidade acima de 50%, destacando-se a BRS 293 T0-34 com taxa de 89%. Este mesmo evento apresentou a mais alta concentração da proteína, com valores similares a da Bollgard I em três fases fenológicas analisadas via *ELISA*.

**Palavras chave:** transformação, microinjeção, *Gossypium*

## **Abstract**

The pests are big economic problems in the management of major crops. This is because, depending on the occurrence, the losses are considerable, incurring even the loss of the crop. The effective control is through chemical insecticides that raises between 20% and 40% production costs and causing several damages to man and environment. Due to the great difficulty of getting crops with effective resistance to insects by means of conventional techniques several research institutions have invested in the acquisition of resistance via transgenesis, to be safe, effective and economical. In 2007, the Biotechnology team of the Cotton Embrapa edited and inserted the Bt cry1Ia gene in cotton cultivar BRS 293 in order to make it resistant to some insects in particular the caterpillar *Spodoptera frugiperda*. In this work was performed a comprehensive molecular study and expression analysis in T0 cotton plants, resulting of the transformation work the BRS 293 in order to verify the integration and expression of the protein-coding in selected transgenes through toxicity bioassays against *Spodoptera frugiperda* and by ELISA and western blot. Among the events analyzed, only five named BRS 293 T0-34, BRS 293 T0-49, BRS 293 T0-56, BRS 293 T0-57 and BRS T0-66, showed mortality rate above 50%, highlighting BRS 293 T0-34 with 89%. This same event had the highest protein concentration, with values similar to the Bollgard I in three growth stage analyzed by ELISA.

**Key words:** transformation, microinjection, *Gossypium*.

## 1. INTRODUÇÃO

A lavoura do algodoeiro é uma das principais *commodities* internacionais e no Brasil, é responsável pelo desenvolvimento econômico e social do principal pólo de produção que é a região dos Cerrados do Centro-Oeste e Nordeste (FREIRE, 2007). Na região do Semi-árido, esta lavoura tem sido anualmente soerguida, especialmente com as novas cultivares precoces e de fibra colorida, possibilitando agregação de renda especialmente nas propriedades que vivem da agricultura familiar.

Apesar do atual crescimento da lavoura algodoeira em nível nacional, o manejo é uma atividade de elevado custo, principalmente nas regiões Sudeste e dos Cerrados onde as práticas de mecanização e controle de pragas e invasoras oneram em mais de 40% os custos de produção (FREIRE, 2007).

De uma forma geral, os gastos realizados com defensivos químicos para controle de pragas, doenças e invasoras das grandes culturas são elevados, especialmente com inseticidas. Considerando-se apenas a cultura do algodão, cerca de 27% do total de defensivos vendidos no país são destinados para esta lavoura (BARROSO e HOFFMANN, 2007). Essa quantidade varia em função dos vários insetos-praga que ocorrem na cultura, sendo os principais o bicudo do algodoeiro (coleóptero, *Anthonomus grandis*) e algumas lagartas, tais como a do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), traça-das-crucíferas (*Plutela xylostella*), lagarta da maçã (*Heliothis virescens*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e lagarta da soja lepidóptera (*Anticarsia gemmatalis*) (MIRANDA, 2006).

O controle dessas pragas só é efetivo por meio de inseticidas químicos, embora agrida ao homem e ao meio ambiente e também incorra no surgimento de populações resistentes devido ao mau uso na dosagem do produto. A resistência natural por meio da transgenia constitui-se numa alternativa que tem sido muito adotada por países industrializados e em desenvolvimento e tem demonstrado, além do aspecto de seguridade, significativa economia no que se refere aos custos de produção, que se situa entre 40 e 50% (JAMES, 2009). Basicamente, essa tecnologia emprega o uso de ferramentas moleculares da engenharia genética pela qual se isola genes candidatos e transfere-os para outras plantas por meio das várias técnicas disponíveis de transformação (RAJASEKARAN et al., 2000; PANJEKAR et al. 2003). Esta estratégia tem possibilitado manipular genes

específicos, o que é dificultado pelos métodos clássicos de melhoramento genético, além de minimizar os danos causados ao meio ambiente (JENKINS et al, 1993).

Dentre os transgenes mais conhecidos em nível mundial, citam-se aqueles que contêm os genes Bt, oriundos de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria endofítica não patogênica de várias culturas, a qual, durante sua esporulação sintetiza cristais protéicos, conhecidos como cry ou  $\delta$ -endotoxina, com propriedade inseticida (SCHNEPF et al., 1998). Os genes responsáveis pela síntese dos cristais protéicos são os da família *cry* e a ação inseticida é verificada principalmente, sobre dípteros (Cry IV), coleópteros (Cry III) e lepidópteros (Cry I; Cry II) (RAJASEKARAN et al., 2000).

A inserção dos genes Bt em plantas de algodão foi conseguida pela primeira vez por Perlak et al. (1990), nos EUA, que inseriram os genes *cry1Ab* ou *cry1Ac* do Bt com intuito de controlar as pragas *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*. Daí em diante, várias plantas de algodão geneticamente modificadas foram desenvolvidas. No Brasil já se cultiva mais 116 mil ha de algodão Bt, com cultivares oriundas de multinacionais (JAMES, 2009).

Em 2006, a equipe de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) isolou o gene *cry1la*, a partir de uma estirpe brasileira de *B. thuringiensis* S1451, a qual, em testes de toxicidade, revelou-se altamente tóxica contra *Spodoptera frugiperda* e tóxica contra o bicudo do algodoeiro (MARTINS et al., 2008). A sequência gênica foi cedida a Embrapa Algodão e posteriormente editada, baseando-se no *codon usage* do algodão, para posterior introdução nas plantas via microinjeção. Escolheu-se para tal atividade a cultivar BRS 293, um excelente material no aspecto agrônômico e têxtil, lançado pela Embrapa Algodão em 2009 e recomendado para a região dos cerrados.

Neste trabalho são apresentados os resultados dos estudos moleculares e de expressão em plantas T0, resultantes dos trabalhos de transformação via *ovary-drip* na cultivar BRS 293.



## Capítulo I

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Aspectos gerais sobre a lavoura algodoeira

A cotonicultura é uma das atividades de maior interesse econômico, em nível mundial. A planta do algodoeiro é de aproveitamento completo e oferece variadas formas de produtos de utilização universal, nos segmentos têxteis, oleoquímicos, alimentares, entre outros (BELTRÃO, 2006; BALLAMINUT et al., 2006; FREIRE, 2007).

Esta fibrosa é considerada uma das mais antigas plantas domesticadas pelo homem com registros de utilização que datam mais de 4.000 anos. Seu cultivo comercial abrange mais de 100 países, com área anual superior a 40 milhões de hectares (FREIRE, 2007).

Segundo dados publicados no Boletim Anual do Mercado de Grãos de Algodão em 2010, a produção mundial de algodão em pluma na safra de 2009/2010 foi de 22,2 milhões de toneladas, estando a China em primeiro lugar neste *ranking* (6,8 milhões de toneladas), seguido pela Índia (5,1 milhões de toneladas), Estados Unidos (2,7 milhões de toneladas), Paquistão (2,1 milhão de toneladas) e Brasil (1,2 milhão de toneladas em pluma e 2 milhões de toneladas em caroço).

O Brasil destina cerca de 835,7 mil ha para o plantio de lavouras de algodão dos quais 63% da produção em caroço concentra-se na região dos Centro-Sul e Nordeste, sendo Mato Grosso, Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul os principais estados produtores (CONAB, 2010).

A cotonicultura nacional apresenta atualmente dois cenários, um que envolve o sistema de produção dos cerrados, que se caracteriza por grandes produtores que adotam manejo de forma extensiva e altamente tecnificada e o outro que envolve o sistema de produção no semi árido, a maioria realizada por médios e pequenos produtores que se defrontam frequentemente com problemas climáticos e fitossanitários, incorrendo em elevação dos custos de produção, inviabilizando economicamente a manutenção da lavoura (FREIRE 2007).

Levando-se apenas em consideração o aspecto fitossanitário, os gastos realizados com agrotóxicos no Brasil são elevados e tem crescido anualmente, especialmente com inseticidas. De acordo Barroso e Hoffmann (2007), apenas na cultura do algodão, cerca de 27% do total vendido no país são destinados para esta lavoura.

## 2.2 Botânica do Gênero *Gossypium*

Taxonomicamente, o gênero *Gossypium* encontra-se classificado como pertencente a tribo Hibisceae, família Malvaceae, ordem Malvales, classe Dicotyledoneae e filo Angiospermae (FRYXELL, 1979; APG II, 2003).

Um dos principais gêneros dentre as malváceas é o *Gossypium*, formado por cerca de 50 espécies classificadas, das quais 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí, e uma no Nordeste brasileiro (PENNA, 1999; BALLAMINUT, 2006). Neste gênero, as espécies que se destacam mundialmente, quanto ao seu cultivo, são as *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L. (CRAVEN et. al., 1994). Segundo classificação botânica, seus representantes são caracterizados por apresentarem porte arbustivo ou herbáceo, com folhas simples e nervuras secundárias dispostas geralmente por todos os dentes da folha (SOUZA e LORENZI, 2005).

O surgimento dos primeiros botões florais desta malvácea inicia-se por volta de 35 a 45 dias após a germinação, sendo estes envolvidos por casulos formados por três brácteas que auxiliarão na proteção do mesmo até o aparecimento da primeira flor (após 20 dias do surgimento) (PENNA, 1999).

O fruto, também conhecido como maçã, é em forma de cápsula com deiscência, apresentando de três a cinco lóculos, cada um com seis a oito sementes. Podem apresentar formato arredondado ou alongado na ponta; após sua abertura recebe o nome de capulho (BALLAMINUT, 2006). As sementes contêm óleo de excelentes propriedades nutricionais podendo ser cobertas ou não com línter.

## 2.3 Transgenia na Cultura do Algodão

Dentre os objetivos almejados nos programas de melhoramento do algodão no Brasil, assim como no resto do mundo, destacam-se a necessidade de melhorias de produtividade, rendimento, uniformidade e resistência a fatores bióticos e abióticos (FREIRE e COSTA, 1999).

Tradicionalmente um programa de melhoramento genético vegetal faz uso de estratégias baseadas em técnicas clássicas onde, por meio de cruzamentos e

seleção de fenótipos superiores, são desenvolvidas variedades que venham a atender expectativas do mercado. No geral, características geneticamente herdáveis, de heranças qualitativas ou quantitativas, podem ser perfeitamente repassadas para o algodão por meio das técnicas convencionais, tais como elevação da produtividade, melhoria nas características das fibras, elevação e melhoria nas características do óleo, resistência a doenças e a fatores abióticos, etc. Há limitação, contudo, para certas características que além da herança definida, dependem de demais fatores para que o gene seja definitivamente integrado a planta. Cita-se como exemplo a resistência a pragas, a herbicidas, entre outras. Para tal situação, o uso de estratégias complementares, como as atuais ferramentas da engenharia genética, pela qual é possível prospectar genes inseticidas, isolá-los e transferi-los para outras plantas, pode contribuir significativamente para eliminar estas barreiras (RAJASEKARAN et al., 2000; PANJEKAR et al. 2003; SANTOS, 2003).

De um modo geral, a vantagem na adoção das ferramentas biotecnológicas se deve principalmente a possibilidade da transposição de barreiras de incompatibilidade sexual via hibridizações somáticas ou da transformação em células vegetais, gerando novas perspectivas para a obtenção de variedades com resistência a fatores de difícil consecução por meio das vias do melhoramento convencional (BENEDICT et al., 1991; JENKINS et al.; 1993, RANJASENKARAN et al., 2000).

No caso específico de resistência à insetos, a obtenção de plantas comerciais resistentes tem sido um dos principais alvos perseguidos por várias instituições de pesquisa, nacional e internacional. Tal aspecto é um reflexo da situação das lavouras mundiais onde bilhões de dólares são despendidos anualmente para a aquisição de inseticidas químicos (JAMES, 2007).

Dentre os principais insetos-praga destaca-se o bicudo do algodoeiro, um coleóptero de elevado poder destrutivo e dificuldade de controle (MARTINS et al., 2007). A falta de controle desse inseto leva a danos na produção de fibras que podem chegar a 75% (MARTINS et al. 2007). Outro inseto que vem apresentando larga disseminação e agressividade na lavoura algodoeira é a lagarta do cartucho do milho, que também é de difícil controle e apresenta amplo espectro de atuação, afetando diversas culturas, tais como milho, sorgo, arroz, trigo, alfafa, feijões,

amendoim, tomate, algodão, batata, couve, espinafre e abóbora (MONNERAT et al., 2000).

A transformação genética em plantas é entendida como sendo um meio pelo qual se pode transferir um segmento de DNA específico para um genoma receptor, sem que necessariamente haja a introdução do mesmo por fecundação, originando assim um organismo transgênico (TACCHINI e WALBOT, 1986; GOULD, 1988).

Desde meados da década de 80 já existem lavouras geneticamente modificadas (LGM) plantadas no mundo. Em nível comercial, a primeira cultivar geneticamente modificada foi o tomate “Flavr Savr”, produzida pela empresa Calgene e comercializada em 1994, nos EUA. Esta cultivar produz frutos de amadurecimento tardio que conferem maior resistência ao armazenamento. Depois dela, várias outras cultivares geneticamente modificadas foram liberadas para a comercialização, movimentando cerca de US\$ 200 bilhões (BOREM e SANTOS, 2003).

Atualmente, a área global cultivada com LGM tem crescido a cada ano. Em 1996, foram cultivados 1.7 milhões de hectares; em 2010, a área superou os 148 milhões de ha, sendo as mais expressivas a soja, milho, algodão e canola (JAMES, 2010).

O número de países que adotam essa tecnologia subiu para 29, em 2010, abrangendo 15 países emergentes e 10 países industrializados, sendo eles, em ordem de hectares cultivados, EUA, Brasil, Argentina, Índia, Canadá, China, Paraguai, Paquistão, África do Sul, Uruguai, Bolívia, Austrália, Filipinas, Myanmar, Burkina Faso, Espanha, México, Colômbia, Chile, Honduras, Portugal, República Tcheca, Polônia, Egito, Slovakia, Costa Rica, Romênia, Suécia e Alemanha. O Brasil encontra-se em segundo lugar, com cerca de 25,4 milhões de ha de LGM (JAMES, 2010).

De acordo com especialistas, estas lavouras ofereceram benefícios econômicos e ambientais substanciais aos agricultores tanto nos países industrializados quanto nos emergentes. Isso porque estas LGM, desenvolvidas pela integração genômica de genes de resistência provenientes de microorganismos, constituem-se em mais uma alternativa com grande potencial de proteção contra as perdas causadas por insetos-praga ou espécies invasoras (SCHULER et al., 1998; HILDER e BOULTER, 1999; BETZ et al., 2000).

Dentre os transgenes mais conhecidos em nível comercial, citam-se aqueles que contêm os genes com resistência a herbicidas e a toxina Bt, oriunda de *Bacillus thuringiensis*, que é uma bactéria endofítica não patogênica de várias culturas, a qual, durante sua esporulação sintetiza cristais protéicos, conhecidos como cry ou  $\delta$ -endotoxina, com propriedade inseticida, mesmo que em baixa concentração (SCHNEPF et al., 1998).

### 2.3.1. Gene *cry* de *Bt*

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva caracterizada por produzir cristais protéicos de inclusão com conhecida atividade inseticida durante a esporulação. Estes cristais são compostos de proteínas com elevada toxicidade para as larvas de diferentes ordens de insetos e de algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari (FEILTEISON, 1994). Essas proteínas são conhecidas como  $\delta$ -endotoxinas, por causa de sua localização intracelular, ou Cry devido à sua natureza na forma de cristal (KOSTICHKA et al., 1996; MONNERAT e BRAVO, 2000).

Os mecanismos responsáveis pela ativação das proteínas Cry atuam sobre as larvas de insetos susceptíveis ocorrem da seguinte forma: (i) por meio da solubilização do corpo de inclusão paraesporal em pH alcalino no intestino médio do inseto, (ii) pela ação de enzimas proteolíticas que atuam sobre a proteína Cry, degradando-a em fragmentos de 60-65 kDa com propriedades tóxicas (SCHNEPF et al., 1998) e (iii) pela ligação das toxinas a receptores específicos das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio destas larvas (FIUZA, 2004). Tais ações promovem a formação de canais iônicos que elevam à pressão osmótica intracelular, promovendo assim a lise celular (SCHNEPF et al., 1998; FIUZA, 2004).

Segundo Pinto e Fiúza (2002), mais de 60.000 isolados de *Bt*. já foram descritas, correspondentes a 82 subespécies, com cerca de 300 genes *cry* distribuídos em 34 classes. Taylor et al. (1992) descreveu o primeiro gene *cry1la*, codificante de uma proteína com 81 kDa e 62% de identidade com o gene *cry1Ba*.

A especificidade da ação da proteína Cry tem sido relatada nas mais diversas ordens de insetos, tais como Lepdoptera (*Cry I*; *Cry II*), Díptera (*Cry IV*), Coleóptera

(*Cry III*) (HOFTE e WHITELEY, 1989; TAILOR et al. 1992; SCHNEPF et al., 1998; RAJASEKARAN et al., 2000; ZHONG et al., 2000; TOUNSI et al. 2003; FIUZA, 2004), Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Isoptera e Malophaga (FEITELSON et al., 1994; DE MAAGD et al. 1999; CASTILHO-FONTES, et al., 2002), além de Nematóides (MARROQUIN et al., 2000).

Uma das grandes vantagens associadas às plantas transgênicas que possuem o gene *cry* de *Bt*. é que as proteínas oriundas deste gene apresentam ação seletiva, não afetando insetos não-alvos ou vertebrados (BELTZ et al., 2000; GLARE e O'CALLAGHAM, 2000, FIUZA, 2004), bem como reduz emprego excessivo de pesticidas, que são altamente danosos ao meio ambiente (MARTINS et al., 2008).

As primeiras plantas *Bt* (tomate e tabaco) resistentes a lepdópteros, expressando as proteínas Cry (*Cry1Ab* e *Cry1Ac*) foram produzidas no ano de 1987 (FISCHHOFF, 1987; VAECK et al., 1987). A inserção de genes de *Bt* em plantas de algodão para a produção das endotoxinas foi conseguida pela primeira vez por Perlak et al. (1990), nos EUA, tendo inserido os genes *cry1Ab* ou *cry1Ac* do *Bt* com intuito de combater as primeiras pragas alvo *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*. Em 2005, a equipe de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) isolou o gene *cry1la*, com potencial para o controle do bicudo do algodoeiro e da lagarta do cartucho do milho (MARTINS et al., 2008). Esse gene, obtido a partir de uma estirpe brasileira de *B. thuringiensis* S1451, foi cedido a Embrapa Algodão para posterior edição, baseando-se no *codon usage* do algodão, e introdução nas plantas via microinjeção.

A repercussão do emprego destes transgênicos com resistência ao ataque de pragas já se encontra refletida no contexto da cotonicultura mundial. As LGM de algodão já ocupam o terceiro lugar dentre as culturas transformadas contendo genes oriundos de *Bt*, ocupando uma área superior a 260 mil ha (JAMES, 2010).

### **2.3.2. Cultivares de algodão geneticamente modificadas**

No ano de 2010, foram plantados cerca de 148 milhões de hectares de culturas geneticamente modificadas, no mundo. Este alto índice de crescimento,

sem precedentes, considerando-se os 1,7 milhões de hectares em 1996, denota o poder de adesão dos novos processos tecnológicos em benefício da agricultura.

No Brasil, as lavouras OGM ocuparam 25,4 milhões de hectares em 2010, que equivaleu a uma expansão equivalente a 4 milhões de hectares quando comparado com a safra anterior de 21,4 milhões de hectares. Segundo James (2010), esse crescimento representa o maior aumento em qualquer país do mundo. Com relação ao algodão, cerca de 145.000 hectares são plantados com cultivares Bt e 29.000 hectares com cultivares tolerantes a herbicida (James, 2009).

A primeira cultivar de algodão OGM liberada comercialmente foi a Bollgard®, evento 531 que contém a proteína Cry1Ac, de Bt. Este evento, desenvolvido pela Monsanto, obteve liberação comercial após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 0513/2005 - Algodão BT, seguindo a Instrução Normativa CTNBio n.º 10, de 19.02.98 e a lei n.º 11.105 de biossegurança. Esta tecnologia representou um novo conceito de controle de pragas, de forma eficiente e mais ecológica, proporcionando benefícios significativos aos agricultores, ao meio ambiente e à sociedade em geral, além de abrir um leque para novos adventos tecnológicos na cultura do algodão.

Três anos mais tarde, foi liberada para plantio comercial a cultivar Liberty Link (evento LLCOTTON25), desenvolvida pela Bayer CropScience, com resistência ao glufosinato de amônio. Essa cultivar obteve liberação comercial, após a aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 1521/2008. No mesmo ano, foi aprovado o parecer técnico da CTNBio n.º 1598/2008 que concede a liberação para uso comercial da cultivar Roundup Ready (Evento MON 1445), desenvolvida pela Monsanto, com resistência ao glifosato.

Em 2009, foram liberadas três cultivares OGM. A primeira, em março, foi a cultivar WideStrike (evento 281-24-236/3006-210-23), desenvolvida pela Dow AgroSciences, que contém as proteínas Cry1Ac e Cry1F, para controle de lepidópteros. A liberação comercial foi obtida, após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 1757/2009. Em maio, foi liberada a Bollgard II (evento MON 15985), da Monsanto, que contém as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2), para controle de lepidópteros. A liberação comercial foi obtida, após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 1832/2009. Finalmente, em outubro, foi liberada a MON 531 x MON 1445, com resistência a insetos e tolerante a herbicida (glifosato), também da



Monsanto. A MON 531 x MON 1445 expressa as proteínas CryIAc (confere resistência a insetos) e CP4 EPSPS (tolerante ao glifosato), respectivamente.

A Embrapa desenvolve pesquisas visando a obtenção de lavouras geneticamente modificadas há mais de uma década. O enfoque principal, para o caso do algodoeiro, é resistência a insetos e tolerância a herbicidas. Várias linhas de pesquisa envolvendo isolamento de genes e transformação de plantas estão em andamento. Outros trabalhos envolvendo transferência dos genes para as cultivares comerciais da Embrapa tem sido desenvolvido por meio de licenciamento de genes promovido entre a Embrapa e empresas detentoras da tecnologia, como a Monsanto, por exemplo. Atualmente, a Embrapa dispõe de várias linhagens oriundas destes cruzamentos as quais encontram-se em avaliação, em regime de contenção, com perspectivas de posterior síntese de cultivar, desde que atendam as características exigidas pelo mercado consumidor.

#### **2.4. Técnicas de Transformação**

Por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas foi o melhoramento clássico, envolvendo cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável. Porém, esse processo é lento, necessitando vários anos para produzir e liberar comercialmente uma nova variedade (CHRISTOU, 1992). A engenharia genética de plantas não só acelera o processo de melhoramento, como permite transpor as barreiras de incompatibilidade sexual através da hibridização somática ou da introdução de genes específicos em células vegetais, utilizando os métodos de transformação (MORAES e FERNANDES, 1987).

A transformação genética é definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucléicos em um genoma receptor, excluindo-se a introdução por fecundação (TACCHINI e WALBOT, 1986), compreendendo operações de isolamento, modificação e transferência de segmentos de DNA (GOULD, 1988).

Com os avanços da tecnologia de DNA recombinante, é possível transferir para plantas genes isolados de outras plantas, ou mesmo de animais e microrganismos (PERANI et al., 1986), permitindo a criação de novas variedades que podem ser usadas em programas de melhoramento convencional. Diferentes técnicas de transformação genética de plantas foram estabelecidas com a combinação das técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de

genes da cultura de tecidos e da engenharia genética (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

Os métodos utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas podem ser classificados como: diretos, que provocam modificações nas paredes e membranas celulares para introdução de DNA exógeno, através de processos físicos (eletroporação, biobalística e eletrofusão de protoplasto) (FINER e McMULLEN, 1990, RAJASEKARAN et al., 2000), ou químicos (via polietileniglicol/PEG) (GOULD et al. 1991); e indiretos, que além de provocar modificações requerem a utilização de um vetor biológico para a introdução do DNA na planta (ZAPATA et al., 1999). Os vetores mais utilizados são os de *Agrobacterium tumefaciens* e *rhizogenes*, patógenos vegetais com a capacidade de transferir parte de seu DNA para o genoma da planta. Porém o maior obstáculo na utilização destas técnicas está na dificuldade de regeneração de plantas, mesmo quando a regeneração é obtida, as plantas podem apresentar problemas de redução de fertilidade (RHODES et al., 1989), além de várias espécies ainda serem consideradas recalcitrantes para essa tecnologia, como o algodão (BIRCH, 1997; MATHER e ROBERTS, 1998).

Durante as últimas décadas a cultura do algodão vem sendo melhorada por meio de métodos convencionais, utilizando a própria variabilidade natural dentro de diferentes recursos genéticos (GYVES, 1994a). No entanto, algumas características não puderam ser melhoradas utilizando o melhoramento clássico, seja pela sua ausência no *pool* genético do algodão, seja pela dificuldade de cruzamento, uma vez que, para que isso ocorra, alguns requisitos são necessários como à compatibilidade entre espécies e o tempo necessário para a transferência dos caracteres desejáveis (GYVES 1994b).

O algodão é uma cultura com custos altos de produção, o que torna constantemente necessária a busca por novas tecnologias, como a aplicação da transgenia. A transformação genética pode contribuir substancialmente para o melhoramento do algodoeiro, permitindo a introdução de genes que contribuam para o aumento da produtividade e estabilidade da produção, além de resistência a fatores bióticos e abióticos (resistência à praga, tolerância a herbicida, resistência à seca, frio) (GATEHOUSE e GATEHOUSE, 2000; OLIVEIRA NETO et al., 2004a; OLIVEIRA NETO et al., 2004b; OLIVEIRA NETO et al., 2003). O algodoeiro foi uma das primeiras espécies em que cultivares geneticamente modificadas foram

comercialmente explorados. O marco inicial foi a liberação comercial de cultivares tolerantes ao herbicida bromoxinil, em 1994 nos EUA (BARROSO e HOFFMANN, 2007).

#### **2.4.1. Biobalística**

Esse método foi desenvolvido por Sanford e colaboradores na Universidade de Cornell, e foi designado biobalística (biológico + balística = biobalística) ou biolística.

Utiliza micropartículas (1,0 a 1,50 mm) de ouro ou tungstênio. As partículas são aceleradas com o auxílio de um aparelho de pressão (1.000-1.200 psi) por ar comprimido (Hélio) a altas velocidades (superiores a 1.500 km/h) para carrear e introduzir ácidos nucleicos e outras moléculas em células e tecidos *in vitro* (FINER et al., 1992). As micropartículas aceleradas penetram na parede e membrana celular de maneira não-letal, localizando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Em seguida, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do meio intracelular, ocorrendo o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser modificado (ARAGÃO et al., 1998; LACORTE et al., 1999). É uma técnica relativamente simples e rápida e não envolve muito investimento de infra-estrutura e equipamentos. Uma das principais vantagens é a eficiência na transformação de Gimnosperma e Angiospermas monocotiledôneas. Segundo Milki et al. (1993) a eficiência deste procedimento depende de alguns fatores ligados à técnica, como tamanho das micropartículas, resistência ao vácuo, força de propulsão e uniformidade na superfície do tecido alvo. Plantas de soja, feijão e algodão foram transformadas por ARAGÃO et al. (2008), utilizando meristema apical e eixos embrionários.

#### **2.4.2. *Agrobacterium***

*Agrobacterium* é uma bactéria de solo, Gram negativa, aeróbica, pertencente à Família *Rhizobiaceae* (ZAMBRISKY, 1988), tem a capacidade de penetrar em algumas espécies vegetais, principalmente dicotiledôneas. Sua importância para os estudos de transformação de plantas reside na capacidade natural que esses patógenos possuem de introduzir DNA em plantas hospedeiras. Esse DNA é integrado e passa a ser expresso como parte do genoma da planta (HOHN, 1992). Este gênero apresenta dois tipos de bactérias que mediam o processo de

transformação, *Agrobacterium tumefaciens* (causadora da galha da coroa) e *Agrobacterium rhizogenes* (causadora da proliferação de raízes) (LIPP-NISSINEN, 1993), todavia a mais empregada é *A. tumefaciens*. Estas bactérias possuem plasmídeos que recebem denominações de acordo com a alteração de desenvolvimento vegetal que provocam, conhecidos como Ti (do inglês “tumor-inducing”) em cepas de *A. tumefaciens* e Ri (do inglês “root-inducing”) em cepas de *A. rhizogenes* (HOOYKAAS e MOZO, 1994; WALKERPEACH e VELTEN, 1994).

O método via *Agrobacterium* tem sido usado com sucesso em transformações de inúmeras espécies dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas como o milho, trigo, arroz (HIEI, et al., 1994; ATKINSON, 2002; WIMMER, 2003).

*A. tumefaciens* é uma das cinco espécies do gênero *Agrobacterium* que é responsável pela formação de tumores, denominado galha da coroa. Esta bactéria possui um plasmídio indutor de tumor denominado Ti, parte pelo qual é incorporado nas células das plantas hospedeiras por um processo infeccioso, passando assim a produzir hormônios vegetais e opinas (compostos sintetizados para a nutrição das bactérias). O plasmídio Ti é modificado (denominada T-DNA ou DNA de transferência), de forma que possa expressar genes não-essenciais para a transformação, por genes de interesse (HOHN, 1992). A técnica consiste em um co-cultivo com a bactéria e explantes (de potencial regenerativo, como segmentos de folhas jovens, embriões zigóticos, entrenós, cotilédones), as bactérias então infectam o tecido vegetal iniciando o processo de transferência e transformação do genoma da planta, em seguida o tecido é regenerado em meio de cultivo, *in vitro*, contendo antibiótico para a eliminação da *Agrobacterium* e um agente seletivo para identificar as células transformadas, posteriormente estas são aclimatadas (BRASILEIRO, 1993; GELVIN, 2000; JOUANIN et al., 1993; BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

#### **2.4.3. Transformação via microinjeção (*ovary drip ou pollen tube pathway*)**

O uso desta técnica de transformação via tubo polínico foi divulgada pela primeira vez por Zhou e colaboradores em 1983, e várias modificações foram realizadas nos últimos anos, aumentando a eficiência deste método e tornando este um dos protocolos mais promissores para a transformação de diferentes culturas, especialmente por dispensar o processo de regeneração de plantas (NEWELL, 2000; KIMURA, 2001; PEFFLEY, 2003; OLIVEIRA NETO, 2005).

A técnica via tubo polínico consiste na introdução de um DNA exógeno em um embrião de algodão, por meio de uma microseringa. O uso desta técnica requer o emprego da planta inteira e, em estágio de floração, período em que são aplicadas as microinjeções com as construções gênicas desejáveis. Ocorre via tubo polínico após a polinização, onde as células da nucela formam um canal que permite a passagem do tubo polínico até o saco embrionário, e dessa forma, com a remoção do estigma e a aplicação de uma solução de DNA na parte superior da maçã jovem, o DNA exógeno pode alcançar o ovário, através da passagem deixada pelo tubo polínico e se integra às células zigóticas, já fertilizadas, mas não divididas. As células podem ser transformadas, uma vez que as mesmas ainda não apresentam parede celular formada. Assim, o gene de interesse pode então ser integrado dentro do genoma da cultivar receptora. Uma vez incorporado no genoma e expresso de maneira estável, o transgene passa a fazer parte do patrimônio genético da planta, não alterando sua constituição genética global (OLIVEIRA NETO, 2005; SONG et al., 2007).

Este trabalho teve por objetivo introduzir o gene *cry1la* em plantas de algodão via *ovary drip* e estimar a atividade da proteína expressa nos transgenes através da técnica de DAS-ELISA

### 3. REFERÊNCIAS

APG II - THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** , v.141, p.399–436, 2003.

ARAGÃO, F. J. L.; ELÍBIO, L. R.; VIANNA, G.R. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1-9, 2008.

ARAGÃO, F. J. L.; GIOVANNI, R.V.; RECH, E. L. Feijão transgênico. **Biotecnologia**, v. 5, p..46-49, 1998.

ATKINSON, P. W. Genetic engineering in insects of agricultural importance. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v.32, p 1237-1242, 2002.

BALLAMINUT, C. 2006. Disponível em [http://www.algodao.agr.br/cms/index.php?option=com\\_content&task=view&id=73&Itemid=132](http://www.algodao.agr.br/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=132), acessado em 25 de setembro de 2010.

BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V. Algodoeiros geneticamente modificados. In: FREIRE, E. C. **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, p. 918, 2007.

BELTRÃO, N.E.M. Fisiologia da produção do algodoeiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 94).

BELTZ, F.S.; HAMMOUND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.32, p.156-173, 2000.

BENEDICT, J.H.; ALTMAN, D.W.; DEATON, W.R.; RING, D.R. DESPAIN, R.R. Field evaluation of BT cottons for resistance to injury from tobacco budworm and bollworm. **Agricultural Experimental Station**, 1991.

BIRCH, R. G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297-326, 1997.

BOLETIM ANUAL DO MERCADO DE GRÃOS: ALGODÃO - Safra 2009/2010,.**DesenBahia**, 2010, 12p.

BOREM, A.; SANTOS, F.R. A biotecnologia. In: COSTA, N.M.B.; BOREM, A. **Biotecnologia e nutrição**. São Paulo: Nobel, 2003. 214p.

BRASILEIRO, A C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução à transformação genética de plantas. In. BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p.13-33.

BRASILEIRO, A.C.M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, v.20, p. 2-6, 1993.

CASTILHO-FONTES, R.; MATSUMURA, A.T.S.; DIEHL, E.; FIUZA, L.M. Susceptibility of *Nasutitermes ehrhadi* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.221-224, 2002.

CHRISTOU, P. Soybean and Other Glycine species. In: **Genetic Engineering and in Vitro Culture of Crop Legumes**. Lancaster: Technomic Publ. Co., 1992.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. Disponível em [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br), acessado em 28 de setembro de 2010.

CRAVEN, L.A; MCD. STEWART.; BROWN, A.H.D.; GRACE, J.P. The Australian wild species of *Gossypium*. In: Proceedings of the world cotton research conference, 1. Brisbane, Australia. **Challenging the future**, p.278 – 281, 1994.

DE MAAG, R.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends Plant Science**, v.4, p.9-13, 1999.

FEILTEISON, J.S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In **Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**. Montpellier, France: SIP. p.19–184, 1994.

FINER, J. J.; MCMULLEN, M. D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Rep.**, v. 8, p. 886-889, 1990.

FINER, J.J.; VAIN, P.; JONES, M.W. Development of particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, p.323-328, 1992.

FISCHHOFF, D.A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Biotechnology**, v.5, p.807-813, 1987.

FIUZA, L.M.. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. nº32, p.84-89, 2004.

FREIRE, E.C. **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007.

FREIRE, E.C.; COSTA, J.N. Objetivos e métodos utilizados nos programas de melhoramento do algodão no Brasil. In: BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do algodão no Brasil**, v.1, p.273-293, 1999.

FRYXELL, P.A. The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae). **College Station: Texas A&M University Press**. p.245, 1979.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Genetic engineering of plants for insect resistance. In: RECHCIGL, J. E., RECHCIGL, N. A. (Ed.). **Biological and biotechnological control of insects pests**. Washington: Lewis Publishers D.C., 2000.

GELVIN, A.B. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. **Chicester: John Wiley**, p.350, 2000.

GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **BioScience**, v. 38, n. 1, p. 26-33, 1988.

GOULD, J. H.; MAGALLANES-CEDENO, M. M. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, p.1-10, 1991.



GYVES, E. M. Técnicas de mejoramiento genético no convencionales. [Mexico]: Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., 1994b. p. 20-45.

GYVES, E.M. Técnicas de mejoramiento genético no convencionales. In. GYVES, E.M., ed. Agrobiotecnología. México: Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., p. 10-17. 1994a.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant Journal**, n. 6, p. 271-282, 1994.

HILDER, V.A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, v.18, p.177-191, 1999.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v.52, p.242-255, 1989.

HOHN, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: RUSSO, V. E. A. **Development: the molecular genetic approach**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

HOOYKAAS, P. J. J.; MOZO, T. *Agrobacterium* molecular genetics. **Plant Molecular Biology Manual**. v. B3, p. 1-9, 1994.

JAMES, C. **Uptake of GM crops**. ISAAA Briefs, International Service of the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, n.37, 2007.

JAMES, C. **Uptake of GM crops**. ISAAA Briefs, International Service of the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, n.42, 2010.

JENKINS, J.N.; PARROT, W.L.; McCARTY, J.C.; DEATON, W.R. Growth and survivals of *Heliothis virescens* (Lepdoptera: Noctuidae) on transgenic containing a truncated form of the delta endotoxin gene *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology**, v. 86, p. 181-185, 1993.

JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A.C.M.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annual Science Forest**, v. 50, p. 325-336, 1993.

KIMIURA, K. Transposable element-mediated transgenesis in insects beyond *Drosophila*. **Journal Neurogenet**, v. 15, p. 179-192, 2001.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.; MULLINS, A.D.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J. Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal of Bacteriology**. v.178, p.2141–2144, 1996.

LACORTE, C.; ARAGÃO, F. J. L.; VAINSTEIN, M. H.; RECH, E. L. Biobalística. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1999. p. 761-781.

LIPP-NISSINEN, K. Molecular and Cellular Mechanisms of *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 104-111, 1993.

MARROQUIN, L.D.; ELYASSNIA, D.; GRIFFITTS, J.S.; FEITELSON, K.S.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* toxinsusceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v.155, p.1693-1699, 2000.

MARTINS, E.S, PRACÇA, L.B., DUMAS, V.F., SILVA-WERNECK, J.O., SONE, E.H., WAGA, I.C., BERRY, C. AND MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biology Control**, v.40, p.65–68, 2007.

MARTINS, É.S.; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant *Cry1Ia* protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1363–1371, 2008.

MATHER, J. P.; ROBERTS, P. E. **Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique**. Plenum Press. 314 p. 1998.

MILKI, B.L.; FOBERT, P.E.; CHAREST, P.J.; IYER, V.N. Procedure for introducing foreign DNA into plants. In: GLICK, B.R.; THOMPSON, J.E. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. London: CRC Press, 1996. Chap.6, 342p.

MIRANDA, J. E. Manejo de pragas do algodoeiro no Cerrado Brasileiro. Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006. 24 p. (Embrapa Algodão, Circular Técnica, 98).

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência, v. 3, In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP, p.136–200. 2000.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF. v. 22, p. 881-896, 1987.

NEWELL, C. A. Plant transformation technology: developments and applications. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 53-65, 2000.

OLIVEIRA NETO, O. B.; BATISTA, J. A.; RIGDEN, D. J.; FRAGOSO, R. R.; SILVA, R. O.; GOMES, E. A.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; CORDEIRO, C. M.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-AS, M. F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 34,n. 9, p. 903-918, 2004b.

OLIVEIRA NETO, O. B.; BATISTA, J. A.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R. MONTEIRO, A. C.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-AS, M. F. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 68, n. 6, p. 1235-1242, 2004a.

OLIVEIRA NETO, O. B.; BATISTA, J. A.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; FALCAO, R.; FRAGOSO, R. R.; MELLO, L. V.; DOS SANTOS, R. C.; GROSSI-DE-SA, M. F. Molecular cloning of alpha-amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. **Journal Protein Chemical.**, v. 22, n. 1, p. 77-87, 2003.

OLIVEIRA NETO, O. B.; EVANGELISTA, I. B. R.; Oliveira R. S.; VIANA, A. A. B.; PAES N. S.; GROSSI DE SÁ, M. F. Efeito da técnica de microinjeção no abortamento de maçã de algodoeiro cv. Coker 310. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005, Salvador. **Algodão, uma fibra natural Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. CD-ROM.

PANJEKAR, P.K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J. KUMAR, P.A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, v.84, n.3, p.321-329, 2003.

PEFFLEY, E. B.; ALLEN, R.; SONG, P.; SHANG, X. **Direct transformation of higher plants through pollen tube pathway.** Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/6583335.html>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

PENNA, J.C.V. Hibridação em Algodão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação Artificial de Plantas.** Viçosa: UFV. p.63-81, 1999.

PERANI, L.. Gene Transfer Methods of Crop Improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 68, p. 566-570, 1986.

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

PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa biotecnológica aplicada ao manejo de insetos. **Biociências**, v.10, n.2, p.03-13, 2002.

RAJASEKARAN, K.; HUDSPETH, R. L.; CARY, J. W.; ANDERSON, D. M.; JACKS, T. J.; STROMBERG, K.; CLEVELAND, T. E. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. **Plant Cell Report**, v. 19, p. 539-545, 2000.

RHODES, C.A.; PIERCE, D.A.; METTLER, I.J. Genetically transformed maize plants from protoplasts. **Science**, v. 240, p. 204-207, 1989.

SANTOS, R.C. Aplicabilidade da transgenia na agricultura moderna. IN: In: **Curso de Biotecnologia Aplicada a Agricultura**, 2, 2008, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. CD-ROM.

SANTOS, R.C. **Estudos biológicos e moleculares da colesterol oxidase visando ao controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman 1843)**. Universidade de Brasília: Brasília. 2003. Tese de doutorado. 155p.

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.

SCHULER, T.H. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.168-174,1998.

SONG, X.; GU, Y.; QIN, G. Application of a transformation method via the pollen-tube pathway in agriculture molecular breeding. **Life Science Jornal**, v. 4, p. 77-79, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.B. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005, 640p.

TACCHINI, P.; WALBOT, V. Transformation of plants. **Nestlé Research News**, p. 19-29, 1986.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, p.1211–1217, 1992.

TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1la*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal Applied Microbiology**, v.95, p.23–28. 2003.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; BEUCKELEER, M. D. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v.328, p.33-37, 1987.

WALKERPEACH, C. R.; VELTEN, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. **Plant Molecular Biology Manual**. v. B1, p. 1-19, 1994.

WIMMER, E. A. Innovations applications of insect transgenesis. **National Review of Genetic**, v. 4, p. 225-232, 2003.

ZAMBRYSKI, P. Basic Processes Underlying *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer to Plant Cells. **Annual Review of Genetics**, Cambridge, v. 22, p. 1-30, 1988.

ZAPATA, C.; PARK, S. H.; EL-ZIK, K. M.; SMITH, R. H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and shoot apex. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 252-256, 1999.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.76, p.131-139, 2000.

ZHOU, G. J.; ZENG, Y.; HUANG, J.; QIAN, S.; LIU, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Methods in Enzymology**, v. 101, p. 433-448, 1983.

## Capítulo II

Toxicidade e expressão temporal da proteína Cry1Ia de *Bacillus thuringiensis* em eventos de algodão

Manuscrito enviado à revista:  
**Pesquisa Agropecuária Brasileira**

## **Toxicidade e expressão temporal da proteína Cry1Ia de *Bacillus thuringiensis* em eventos de algodão**

Carlíane Rebeca Coelho da Silva<sup>1</sup>, Péricles de Albuquerque Melo Filho<sup>1</sup>, Rose Gomes Monerat<sup>2</sup>, Erica Martins<sup>2</sup>, Liziane Maria de Lima<sup>3</sup>, Roseane Cavalcanti dos Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife, PE. E-mails: carliane.rebeca@gmail.com, pericles@depa.ufrpe.br; <sup>2</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, SAIN Parque Rural, Final W3, Brasília, DF. CEP: 70770-900, E-mails: rose@cenargen.embrapa.br, erica@cenargen.embrapa.br; <sup>3</sup> Embrapa Algodão, CP 174, Campina Grande, PB, CEP 58428-095. E-mails: liziane@cnpa.embrapa.br, caval@cnpa.embrapa.br

**Resumo** – A toxicidade e a expressão temporal da proteína Cry1Ia de *Bt* foram avaliadas em eventos transformados de algodão, por meio de bioensaios de toxicidade contra *Spodoptera frugiperda* e por imunodeteção via *ELISA*. Folhas jovens, coletadas aos 45 dias de 48 eventos T0 foram utilizadas para ambos ensaios. Para o ensaio de *ELISA*, um anticorpo policlonal específico, cedido pela equipe de Controle Biológico da Embrapa Cenargem, foi utilizado para ligação com a proteína alvo. A proteína foi expressa em µg/g de peso fresco, a partir do *ELISA Reader*, a 405 nm. Entre os eventos analisados, apenas cinco (BRS 293 T0-34, BRS 293 T0-49, BRS 293 T0-56, BRS 293 T0-57 e BRS 293 T0-66) apresentaram taxa de mortalidade acima de 50 %, destacando-se BRS 293 T0-34 com taxa de 89%. Este mesmo evento apresentou a mais alta concentração da proteína, com valores similares a da Bollgard I em três fases fenológicas analisadas.

**Termos para indexação:** *Gossypium hirsutum*, controle de pragas, transformação, microinjeção,



**Abstract** – Toxicity and the temporal expression of CryIIa Bt-protein were evaluated in cotton T0 events through toxicity bioassays against *Spodoptera frugiperda* and immunodetection assays via *ELISA*. Young leaves collected at 45 days from T0 48 events were used to both tests. For the *ELISA* assays, a polyclonal and specific antibody, provided by Biological Control team, from Embrapa Cenargem was used to linkage with target protein. Protein concentration was expressed in g/g fresh weight by *ELISA* Reader at 405 nm. Among all events analyzed, just five (BRS 293 T0-34, 293 T0-49, BRS 293 T0-56, BRS 293 T0-57 and BRS 293 T0-66) showed mortality rate above 50%, highlighting BRS 293 T0-34 with 89%. This same event also showed the highest protein concentration, with values similar to the Bollgard I in three growth stage analyzed.

**Index terms:** *Gossypium hirsutum*, insect control, transformation, microinjection

## Introdução

O algodoeiro é uma das principais *commodities* mundiais e o Brasil situa-se entre os maiores produtores, tanto pela produção de fibras como de sementes. As regiões Centro-Oeste, Sudeste e o Nordeste, mais especificamente o Cerrado baiano, são as principais produtoras, que, juntas, detêm mais de 70% da área cultivada nacional (IBGE, 2010).

O manejo da lavoura, contudo, é um dos mais onerosos em termos de custo, especialmente devido aos gastos com maquinários e insumos químicos, para defesa de plantas contra insetos, doenças e ervas daninhas, que consomem cerca de 40% do gasto total (FREIRE, 2007).

No aspecto entomológico, os insetos-pragas provocam sérios prejuízos na lavoura algodoeira. Os níveis de danos são variados porque dependem da época de ocorrência e grau de infestação. A consecução de variedades resistentes é bastante complexa, uma vez que os fatores genéticos que condicionam a resistência podem ser independentes e ter ou não ação acumulativa. Assim, para a maioria das pragas de importância agrícola, o controle químico ainda é o principal método utilizado pelos cotonicultores cuja aplicação exige grande investimento, onerando ou mesmo inviabilizando o manejo (RAMIRO e FARIA, 2006; FREIRE, 2007). De acordo com Barroso e Hoffmann (2007), os gastos realizados com defensivos químicos, especialmente inseticidas, na lavoura algodoeira situa-se em torno de 27% do total vendido no país.

Dentre as pragas que atacam o algodoeiro, em nível mundial, destacam-se os coleópteros e os lepidópteros que são de difícil controle e causam prejuízos consideráveis a agricultura.

O manejo com as cultivares transgênicas atualmente disponíveis no mercado tem fornecido uma contribuição expressiva aos agricultores em termos de redução de custo, mantendo-se as características extrínseca e intrínseca da fibra exigidas pelo mercado nacional

e internacional. No Brasil, as lavouras de algodão transgênico são de cultivares desenvolvidas por empresas multinacionais, contudo, as empresas de pesquisa nacional têm envidado esforços para desenvolver suas próprias cultivares atendendo as demandas dos grandes produtores.

Nas últimas décadas vários pesquisadores tem envidado esforços consideráveis para o desenvolvimento de cultivares resistentes, por meio da transgenia (GREENPLATE, 1999; RAJASEKARAN et al., 2000; PANJEKAR et al., 2003; KRANTHI et al., 2005). Atualmente várias cultivares geneticamente modificadas de algodão, milho, soja, entre outras, estão disponíveis no mercado, a maioria delas com resistência a lagartas, fornecendo expressiva contribuição aos agricultores em termos de redução de custo, além de minimizar consideravelmente o impacto ambiental advindo do uso massivo de defensivos químicos.

Com enfoque no algodão, desde 2005 a cultivar Bollgard I Evento 531 da empresa Monsanto, tem sido utilizada nas lavouras brasileiras, especialmente nas regiões do Cerrado. Este evento foi obtido a partir da transformação da cultivar Coker 312 por meio de *Agrobacterium tumefaciens* (CTNBIO, 2005), inserindo-se uma construção contendo o gene *cry1Ac*, proveniente de *Bacillus thuringiensis*, mediada pelo promotor duplicado CAMV35S. A proteína Cry1Ac, presente na Bollgard I tem sido bastante efetiva contra *Alabama argillacea*, *Heliothis virescens* e *Pectinophora gossypiella* (MONSANTO, 2007).

No Brasil, a Embrapa vem desenvolvendo pesquisas neste segmento desde a década de 90, prospectando moléculas com propriedades inseticidas para posterior introdução em plantas de algodão (NAKASU et al., 2010; De DEUS et al., 2010; SÁ et al., 2007; GOMES et al., 2005; FRANCO et al. 2004; SILVA et al., 2004).

Em 2005, a equipe de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) isolou um gene da família cry (*cryIIa*), a partir da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1451, a qual demonstrou, em bioensaios prévios, toxicidade contra o

bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a lagarta *Spodoptera frugiperda*, com DL<sub>50</sub> de 21 µg/mL e 0,289 µg/mL, respectivamente (MARTINS et al., 2005; MARTINS et al., 2008). A seqüência deste gene foi editada pela equipe de Biotecnologia da Embrapa Algodão, baseando-se nos *coddon usages* de *Gossypium hirsutum*, e posteriormente introduzida nas plantas por microinjeção via *ovary drip*. A construção foi constituída de um duplo promotor (CAMV 35S), a seqüência codante (2.7 Kb) e o terminador *nos*.

Este trabalho reporta sobre as análises desenvolvidas nos eventos de algodão potencialmente transformados, baseando-se em bioensaios de toxicidade contra lagarta *Spodoptera frugiperda*, e por imunodeteccção, via *ELISA* direto.

## **Material e Métodos**

### **Seleção dos eventos**

Trezentas sementes T0, oriundas dos trabalhos de microinjeção via *ovary drip* na cultivar de algodão BRS 293, foram cultivadas em casa de vegetação, em Campina Grande, PB, e previamente testadas quanto a presença do gene *cryIIa* via análise de PCR, usando-se uma combinação de primer previamente desenhada a partir da seqüência editada do gene. Deste total, 48 eventos confirmaram uma banda esperada de 360 pb, sendo estes utilizados para os trabalhos com bioensaios de toxicidade e imunodeteccção.

### **Ensaio de toxicidade contra *Spodoptera frugiperda***

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB. Folhas frescas de cada evento foram coletadas aos 45 dias e usadas na forma de discos foliares (1 cm de diâmetro) em placa de cultura de célula com 24 poços. Em cada poço deixou-se apenas uma larva de segundo instar de *S. frugiperda*, oriundas da criação mantida no mesmo laboratório. As placas foram incubadas em câmara BOD (25 °C

$\pm 2$  °C e fotofase de 14/10) e mantidas durante uma semana. Os registros de mortalidade foram procedidos a cada dois dias, quando também eram feitas as trocas dos discos foliares. Os bioensaios foram repetidos três vezes para cada evento. A taxa de mortalidade foi calculada no final do ensaio, considerando-se os insetos vivos presente nas placas. Os dados tabulados e analisados pelo programa SISVAR; a porcentagem de mortalidade foi calculada pela fórmula de Abbott (1925).

### **Ensaio de Imunodeteção via Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA-direto)**

As folhas coletadas no ensaio anterior foram utilizadas também para este ensaio. As proteínas totais foram extraídas seguindo protocolo de Aragão, (1998). A concentração protéica no sobrenadante foi determinada usando o método de Bradford (1976). Posteriormente, foi conduzido o ensaio de DAS-ELISA onde uma microplaca de 96 poços foi sensibilizada com 100  $\mu$ L/poço de anticorpo primário da proteína Cry1Ia (1:1000) diluído em PBS e incubado a 37 °C por 4 h. Após este período, a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween20 e bloqueada com 250  $\mu$ L de PBS-BSA 3%, por 4 h a 37 °C.

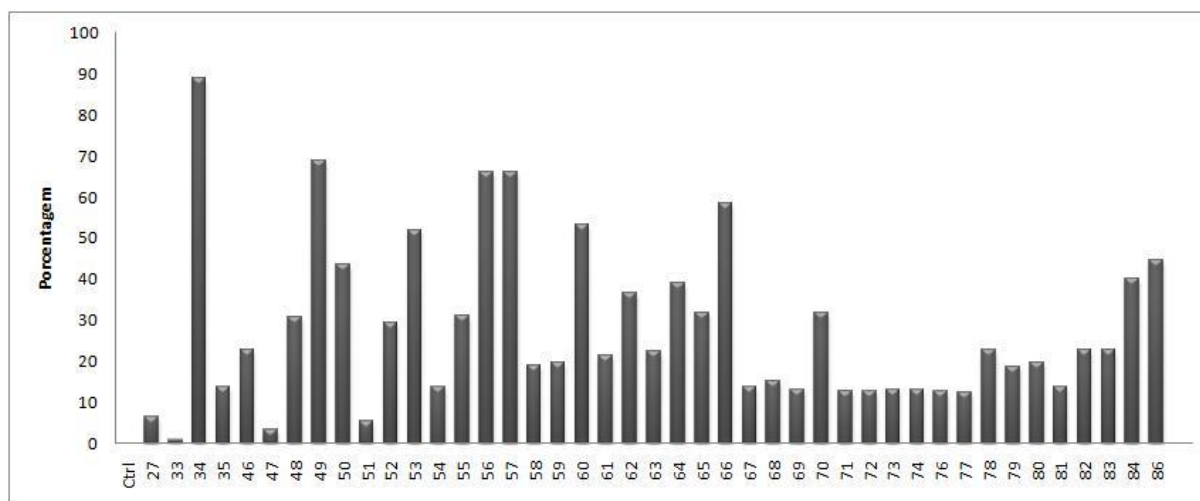
Após este período, foi adicionado em cada poço 100  $\mu$ L de extrato protéico total de folha e incubada a 4 °C *over night*. A seguir procedeu-se a lavagem e acrescentou-se 100  $\mu$ L/poço de IgG anti-cry marcado com biotina (1:100) e diluído em PBS. A microplaca foi incubada a 4 °C/2 h e após lavagem, foi adicionado 100  $\mu$ L/poço de Anti-biotina marcada com fosfatase alcalina (Sigma-Aldriche) e, mais uma vez, incubada a 4 °C/2 h.

Como última etapa, foi adicionado 100 $\mu$ L/poço do substrato P-nitrophenil-phosphatase disodium (Sigma) na concentração de 1  $\mu$ g/ml diluído em tampão dietanolamina (Merck) 10%. A reação foi interrompida após 20 minutos, com adição de 100  $\mu$ L/poço de NaOH 3N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Plate) em comprimento de onda 405 nm.

Os tratamentos utilizados foram: BRS 293 (controle negativo), Bollgard I (controle positivo), e os 48 eventos T0 pre-selecionados via PCR. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

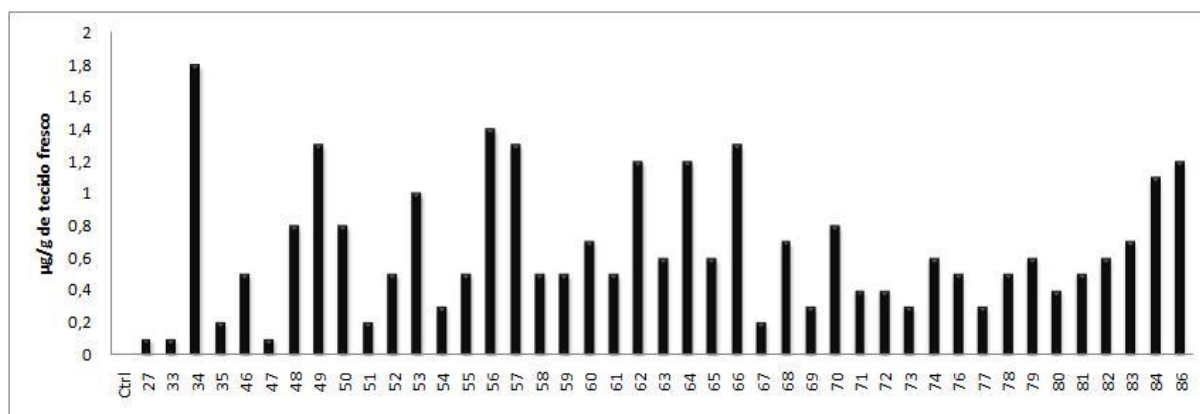
### Resultados e Discussão

Dos 48 eventos avaliados por meio de ensaios de toxicidade e imunodeteção, apenas cinco demonstraram resultados coerentes nos dois ensaios. Nos resultados sobre toxicidade contra *S. frugiperda*, foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos pela análise de variância realizada (Tabela 1). Verificou-se que, entre os materiais analisados, apenas os eventos BRS 293 T0-34, BRS 293 T0-49, BRS 293 T0-56, BRS 293 T0-57 e BRS 293 T0-66 apresentaram percentual de mortalidade acima de 50%, com destaque para a BRS 293 T0-34 que apresentou média de mortalidade de 89 % (Figura 1).



**Figura 1.** Percentual de mortalidade de *S. frugiperda* em eventos T0 de algodão, corrigido por Abbott (1925).

Estes mesmos eventos apresentaram nos ensaios de *ELISA*, concentração média da proteína acima de 1,3 µg/g de tecido fresco, , destacando-se, mais uma vez, o evento BRS 293 T0-34 que apresentou 1,8 µg/g (Figura 2).



**Figura 2.** Concentração da proteína *cry1Ia* em eventos T0 de algodão por meio de *ELISA*. Todas as médias foram corrigidas em função do controle (0,6 µg/g)

Visando proceder a um monitoramento da expressão temporal no evento BRS 293 T0-34, foram realizadas novas análises de *ELISA* utilizando-se a cultivar Bollgard I, da Monsanto, como controle. As análises foram realizadas aos 45, 60 e 80 dias, adotando-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Verificou-se que a concentração da proteína *Cry1Ia* nas plantas BRS 293 T0-34 e Bollgard I foi próxima em todas as análises realizadas e que a mesma foi reduzida em 50% no intervalo de 35 dias (45 a 80 dias). Essa redução confere com o que tem sido registrado na literatura a respeito da expressão deste gene (GREENPLATE, 1999; KRANTHI et al., 2005).

De acordo com Kranthi et al., (2005), que analisaram a expressão temporal de híbridos oriundos da Bollgard I, a concentração máxima da proteína em folhas ocorreu aos 30 dias com 5,1 µg/g de tecido fresco; a partir dos 60 dias, a expressão caiu em torno de 60% e seguiu diminuindo gradativamente, alcançando apenas 0,7 µg/g de tecido fresco aos 90 dias. Esses autores reportam que o nível crítico de expressão da proteína *Cry1Ac* é 1,9 µg/g de tecido de

fresco; abaixo disso o controle torna-se pouco efetivo podendo condicionar à sobrevivência das larvas.

Nos trabalhos de avaliação de segurança da cultivar Bollgard I (Safety Assessment of Bollgard<sup>®</sup> Cotton Event 531) feita em 2002, os testes mostraram que a expressão do gene *cry1Ac* variou entre 1 a 9 µg de Cry1Ac/g de tecido fresco, denotando a elasticidade que a toxina pode alcançar para conferir proteção total a lavoura que contém esse gene.

Segundo a literatura, além do fator temporal, a expressão da proteína cry varia em função do desenvolvimento da cultura e do tecido analisado, sendo maior nas folhas apicais. Em outros tecidos como botão floral, óvulo e pólen o nível de expressão é reduzido em 44%, 50% e 58% respectivamente, considerando-se o nível de expressão obtido nas folhas apicais (SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; GRENPLATE, 1999)

Os resultados deste trabalho são relevantes no aspecto de utilização de ferramentas rápidas e complementares para identificação de eventos transformados. Os resultados obtidos quanto a expressão do evento BRS T0-34 é bastante expressivo sendo este um candidato potencial para controle do algodão contra *S. frugiperda*.

### **Conclusão**

1. A adoção de bioensaios de toxicidade combinados com análises por imunodeteção fornecem respostas rápidas e complementares para identificação de eventos transformados, facilitando os trabalhos de seleção.
2. O evento BRS 293 T0-34 demonstra ser um genótipo bastante promissor para o controle de *S. frugiperda*. Estudos complementares que atestem a ausência de pleiotropia e manutenção das propriedades extrínsecas da fibra são necessários



para que este material se configure realmente como promissor, sob o ponto de vista agrônômico.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem pelo suporte financeiro concedidos pela FINEP e pelo Banco do Nordeste do Brasil e CNPq pela concessão das bolsas.

### **Referências**

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ARAGÃO, F.J.L.; RIBEIRO, S.G. Detecção de proteína pela técnica ELISA. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**: Serviço de Produção de Informação/Embrapa - Cenargem, Brasília, p.239-249, 1998.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein tilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Parecer técnico prévio conclusivo nº 513/2005**. In: REUNIÃO ORDINÁRIA DA CTNBIO, 86. 2005. 53 p.

DE DEUS BARBOSA, A.E.A.; FRAGOSO, R.R.; LIMA E SOUZA, D.S.; FREIRE, É.; OLIVEIRA NETO, O.B.; VIANA, A.A.B.; TOGAWA, R.C.; GUIMARÃES, L.M.; MARTINS, N.F.; CIA, E.; FERNANDEZ, D.; LIMA, L.M.; SILVA, M.C.M.; ROCHA, T.L.;

GROSSI-DE-SA, M.F.. Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, p. 492-497, 2009.

FRANCO, O L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J.A.N.; MENDES, A.C.M.; ARAÚJO, M.A.M.; GROSSI-DE-SA, M.F.; FREITAS, S.M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 343-349, 2003.

FRANCO, O.L.; DIAS, S.S.; MELO, F.R.; OLIVEIRA NETO, O.B.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SA, M.F. Effects of Soybean Kunits trypsin Inhibitors on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 81-89, 2004.

FREIRE, E. C. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília, D.F.: ABRAPA, 2007. 918 p.

GOMES, A.D.; DIAS, S.C.; BLOCH J.R.C.; MELO, F.R.; FURTADO, J.R.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SA, M.F.; FRANCO, O.L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds.. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 140, n. 2, p. 313-319, 2005.

GREENPLATE, J., 1999. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. **Jornal of Economic Entomology**, v. 92, p. 1377–1383, 1999.

GROSSI-DE-SA, M.F.; QUEZADO, M.; SILVA, M.S.; DIAS, S.C.; NAKASU, E.Y.; BRUNETTA, P.S.F.; OLIVEIRA, G.R.; OLIVEIRA NETO, O.B.; SOARES, L.H.B.;

AYUB, M.A.Z.; SIQUEIRA, H.A.; FIGUEIRA, E.L.Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 40, p. 773-782, 2007.

IBGE. [www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/)

KRANTHI, K.R.; NAIDU, S.; DHAWAD, C.S.; TATWAWADI, A.; MATE, K.; PATIL, E.; BHAROSE, A.A.; BEHERE, G.T.; WADASKAR R. M.; KRANTHI, S. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in *Bt*-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Noctuidae: Lepidoptera). **Current Science**, v.89, p. 291-298, 2005.

MARTINS, E.S.; AGUIAR, R.W.S.; MARTINS; N.F.; BATISTA, A.C.; MELATTI, V.M.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Isolamento e caracterização de um gene de *Bacillus thuringiensis* ativo contra insetos das ordens coleoptera e lepidóptera. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais. Algodão, uma fibra natural**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CD-ROM, 2005.

MARTINS, É.S.; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1363–1371, 2008.

MONSANTO DO BRASIL. **Cultivares transgênicas: Deltapine/MDM** - Sementes de Algodão, 2007. 2p. Folder

NAKASU, E.Y.; FIRMINO, A.A.P.; DIAS, S.C.; ROCHA, T.L.; RAMOS, H.B.; OLIVEIRA, G.R.; LUCENA, W.; CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SA, M.F. Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 227-230, 2010.

NUNES, J.C.S., SILVA, A.L., SANTOS, S.P., SANTO, S.V. Ensaio de campo visando ao controle químico do curuquerê (*Alabama argillacea*) do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, p. 53-55, 1999.

PANJEKAR, P.K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J. KUMAR, P.A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, v.84, n.3, p.321-329, 2003.

RAJASEKARAN, K.; HUDSPETH, R. L.; CARY, J. W.; ANDERSON, D. M.; JACKS, T. J.; STROMBERG, K.; CLEVELAND, T. E. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. **Plant Cell Report**, v.19, p.539-545, 2000.

RAMIRO, Z. A.; FARIA, A. M. Levantamento de insetos predadores nos cultivares de algodão Bollgard DP90 e convencional Delta Pine Acala 90. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, p.119-121, 2006.

ROSOLEM, C. A. **Fenologia e Ecofisiologia no Manejo do algodoeiro**. In: FREIRE, E. C., Algodão no Cerrado do Brasil. Ed. Brasília: Associação Brasileira dos produtores de algodão, 2007. 918p.

**Safety Assessment of Bollgard<sup>®</sup> Cotton Event 531**, 2002. 34p. Disponível em: [http://www.monsanto.com.ar/nuestros\\_productos/informacion\\_tecnica\\_seguridad/resumenes\\_seguridad/bollgard\\_es.pdf](http://www.monsanto.com.ar/nuestros_productos/informacion_tecnica_seguridad/resumenes_seguridad/bollgard_es.pdf) Acesso em 10 de janeiro de 2011.

SILVA, S.B.; SILVAWERNECK, J.O.; FALCÃO, R.; OLIVEIRA NETO, O.B.; GROSSI-DE-SA, M.F.; BRAVO, A.; MONNERAT, R.G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 2, p. 102-107, 2004.

SIVASUPRAMANIAM, S.; MOAR, W. J.; RUSCHKE, L. G.; OSBORN, J. A.; JIANG, C.; SEBAUGH, J. L.; BROWN, G. R.; SHAPPLEY, Z. W.; OPPENHUIZEN, M. E.; MULLINS, J. W. and GREENPLATE, J. T. Toxicity and Characterization of cotton Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 Proteins for Control of Lepidopteran Pests. **Jornal of Economic Entomology**, v. 101, n. 2, p. 546-554, 2008.

**Tabela 1.** Síntese da análise de variância para toxicidade da proteína *cry1Ia* contra *S. frugiperda*.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	43	39702.578	923.315	29.843**	0.0000
Erro	88	2722.666	30.939		
Total corrigido	131	42425.242			
CV (%)	15,56				
Média geral	35.74				

\*\* Significativo a 1%

**Tabela 2.** Expressão temporal da proteína *cry1Ia* via *ELISA* direto no evento BRS 293 T0-34, aos 45, 60 e 80 dias após a emergência das plantas.

Amostras	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )		
	45 dias	60 dias	80 dias
BRS T0-34	2,7a	1,9a	1,4a
Bollgard I	2,9a	1,9a	1,5a
Ctrl BRS 293	0,8b	0,6b	0,6b

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## *ANEXO*

Instruções para submissão de trabalhos na Revista PAB

## **INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB**

**Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico para publicação.**

Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassar a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo. São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

**Os trabalhos devem ser encaminhados por via eletrônica para: [pab@sct.embrapa.br](mailto:pab@sct.embrapa.br)**

A mensagem que encaminha o trabalho para publicação deve conter:

- \* Título do trabalho.
- \* Nome completo do(s) autor(es).
- \* Formação acadêmica e grau acadêmico do(s) autor(es).
- \* Endereço institucional completo e endereço eletrônico do(s) autor(es).
- \* Indicação do autor correspondente.
- \* Acima de quatro autores, informar a contribuição de cada um no trabalho.
- \* Destaque sobre o aspecto inédito do trabalho.
- \* Indicação da área técnica do trabalho.
- \* Declaração da não-submissão do trabalho à publicação em outro periódico.

Cada autor deve enviar uma mensagem eletrônica, expressando sua concordância com a submissão do trabalho. O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

### **APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível. A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material



e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

### **Título**

- \* Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- \* Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- \* Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- \* Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- \* As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.
- \* Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

### **Nomes dos autores**

- \* Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- \* O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

### **Endereço dos autores**

- \* São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- \* Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- \* Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

### **Resumo**

- \* O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separada do texto por travessão.
- \* Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

- \* Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.
- \* O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.
- \* Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- \* O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### **Termos para indexação**

- \* A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- \* Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- \* Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- \* Não devem conter palavras que componham o título.
- \* Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

### **Introdução**

- \* A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- \* Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
- \* Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- \* O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

### **Material e Métodos**

- \* A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- \* Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- \* Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- \* Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- \* Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- \* Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- \* Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- \* Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- \* Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.
- \* Pode conter tabelas e figuras.

### **Resultados e Discussão**

- \* A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- \* Deve ocupar quatro páginas, no máximo.
- \* Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- \* As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.

- \* Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.
- \* Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- \* Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- \* As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- \* Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- \* As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

- \* O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- \* Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- \* Não podem consistir no resumo dos resultados.
- \* Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- \* Devem ser numeradas e no máximo cinco.

### **Agradecimentos**

- \* A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- \* Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- \* Devem conter o motivo do agradecimento.

### **Referências**

- \* A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- \* Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- \* Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.
- \* Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- \* Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- \* Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- \* Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- \* Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- \* Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

*Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)*

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

#### Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

#### Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BASTISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

#### Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

#### Teses e dissertações

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

#### Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: <http://www.cpa0.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004> Acesso em: 18 abr. 2006.

#### Citações

- \* Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
- \* A autocitação deve ser evitada.

#### Redação das citações dentro de parênteses

- \* Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- \* Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- \* Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- \* Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- \* Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- \* Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

\* Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

#### *Redação das citações fora de parênteses*

\* Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

#### **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

\* Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.

\* No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

\* Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

#### **Tabelas**

\* As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.

\* Devem ser auto-explicativas.

\* Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

\* Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

\* O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

\* No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

\* Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

\* Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo; a coluna indicadora é alinhada esquerda.

\* Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

\* Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em notade-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

\* Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usálos ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.

\* Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

\* As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

#### *Notas de rodapé das tabelas*

\* Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

\* Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

\* Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

## **Figuras**

\* São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

\* Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

\* O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

\* Devem ser auto-explicativas.

\* A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

\* Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

\* Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

\* O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.

\* As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

\* Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

\* Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

\* As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

\* Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

\* Devem ser gravadas no programa Word ou Excel, para possibilitar a edição em possíveis correções.

\* Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

\* No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

\* Não usar negrito nas figuras.

\* As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

\* Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

## **NOTAS CIENTÍFICAS**

\* Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

### **APRESENTAÇÃO DE NOTAS CIENTÍFICAS**

\* A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- \* Resumo com 100 palavras, no máximo.
- \* Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- \* deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

### **NOVAS CULTIVARES**

\* Novas Cultivares são breves comunicações de cultivares que, depois de testadas e avaliadas pelo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), foram superiores às já utilizadas e serão incluídas na recomendação oficial.

### **APRESENTAÇÃO DE NOVAS CULTIVARES**

Deve conter: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, título em inglês, Abstract, Introdução, Características da Cultivar, Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação de Novas Cultivares são as mesmas do Artigo

Científico, exceto nos seguintes casos:

- \* Resumo com 100 palavras, no máximo.
- \* Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- \* Deve apresentar, no máximo, 15 referências e quatro ilustrações (tabelas e figuras).
- \* A introdução deve apresentar breve histórico do melhoramento da cultura, indicando as instituições envolvidas e as técnicas de cultivo desenvolvidas para superar determinado problema.
- \* A expressão Características da Cultivar deve ser digitada em negrito, no centro da página.
- \* Características da Cultivar deve conter os seguintes dados: características da planta, reação a doenças, produtividade de vagens e sementes, rendimento de grãos, classificação comercial, qualidade nutricional e qualidade industrial, sempre comparado com as cultivares testemunhas.

### **OUTRAS INFORMAÇÕES**

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

• Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: [pab@sct.embrapa.br](mailto:pab@sct.embrapa.br) ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica, Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB, Caixa Postal 040315, CEP 70770-901 Brasília, DF.