



RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SELEÇÃO DE EVENTOS TRANSFORMADOS DE ALGODÃO
RESISTENTE A INSETOS POR MEIOS MOLECULARES E DE
IMUNODETECÇÃO**

CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA

RECIFE-PE
2014



RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

TESE DE DOUTORADO

**SELEÇÃO DE EVENTOS TRANSFORMADOS DE ALGODÃO
RESISTENTE A INSETOS POR MEIOS MOLECULARES E DE
IMUNODETECÇÃO**

CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA

Apresentação:

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO no ponto focal Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia na Agropecuária

Linha de Pesquisa: Melhoramento Vegetal

RECIFE-PE
2014

Ficha catalográfica

S586s Silva, Carliane Rebeca Coelho da
Seleção de eventos transformados de algodão resistente a insetos
por meios moleculares e de imunodeteccção / Carliane Rebeca
Coelho da Silva. – Recife, 2014.

97 f. : il.

Orientador: Péricles de Albuquerque Melo Filho.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2014.

Ponto focal em Pernambuco - Universidade Federal
Rural de Pernambuco.

Inclui referências e anexo(s).

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

CDD 620.8



TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA

**Seleção de eventos transformados de algodão resistente a insetos por meios
moleculares e de imunodeteccção**

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/2014

Orientador:

Prof. Dr. *Péricles de Albuquerque Melo Filho*
Departamento de Agronomia - UFRPE

Examinadores:

Prof. Dr. *Manoel Adrião Gomes Filho*
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. *Paulo Roberto Eleutério de Souza*
Departamento de Biologia - UFRPE

Dr. *José Jaime Vasconcelos Cavalcanti*
Pesquisador da Embrapa Algodão

Dr. *José Luiz Sandes de Carvalho Filho*
Departamento de Agronomia - UFRPE

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. Ao meu esposo *Igor Santos*, pelo companheirismo, amor, por ser minha fortaleza. 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 RENORBIO, 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 a CAPES pela concessão da bolsa.

Ao 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, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A minha família, especialmente meus pais, pelo amor incondicional, conselhos, credibilidade, apoio, compreensão, enfim, por está comigo conquistando mais esta vitória. A minha tia Edna Monteiro, que torce e ora por mim.

Ao meu esposo, Igor Santos, companheiro de todas as horas, foi a pessoa que mais aguentou meus nervosismos e angustias desta fase...Sempre me incentivou a não desanimar. Obrigada por tudo meu esposo, amigo e cúmplice. Palavras não são suficientes para descrever tamanha gratidão.

Ao Prof. Manoel Adrião, pelo grande apoio e atenção. Tenho muito a agradecer por sua perseverança, confiança e amizade.

Aos amigos do laboratório FAMA, pelo companheirismo e amizade: Diogo, Elaynne, Ellen, André Mariano, Sandra, Luciana e Jamilly.

Aos amigos do laboratório LABEG, pela ajuda, pelos conhecimentos partilhados e momentos de descontração: Kaliny, Isabel, Jacqueline e Morganna.

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 minha avó materna, Maria Nunes, pelas orações, pela fé. A minha avó paterna, Iolanda Silva, por contribuir, de alguma forma, para a realização deste sonho.

A Manoel Monteiro e a Antonia Dias, (*in memoriam*), por terem estado sempre ao meu lado, quando em vida; por suas orações e por seu amor incondicional. Eterna saudade.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figure 1. Diagrammatic scheme of constructions used to microinjection in cotton bolls, via ovary-drip. Pág.22

Figure 2. Detail of hygromycin assay in cotton leaves of putative transformed plants. A-leave without reaction to hygromycin, B-yellowish blotting in non-transformed plant. Pág.26

Figure 3. PCR amplicons (0.44 Kb) and PCR-*Southern blot* of putative transgenes derived by *ccc* treatment in four cotton cultivars. C- Negative control (no transformed plant), 1-4: lines derived from BRS Antares, 5-6: lines derived from BRS Cedro, 7-8: lines derived from BRS Araçá, 9-15: lines derived from BRS 293, G: *cryIIa* gene. M- Marcador Ladder Plus (Invitrogen). Pág.27

Figure 4. BLAST search in putative transgene (up) and consensus among 15 nucleotide sequences of putative transgene lines and *cryIIa* (DQ535488), by using *MultipleM sequence alignment* program (down). A45 to A14: lines derived from BRS Antares, A20-A17: lines derived from BRS Cedro, A7-31: lines derived from BRS Araçá, A46-A28: lines derived from BRS 293. Pág.28

Figure 5. Amplicons obtained by RT-PCR in T0-lines derived from BRS293, separated by 0.8% agarose gel. Primer combinations to *cryIIa*-CNPA: A: 1F/2R (0.96Kb), B: 2F/2R (0.36 Kb), and to β *actin*: C: BA-F/BA-R (0.33 Kb). M: 1-Kb molecular marker (Ladder Plus, Invitrogen). G: positive control (*cryIIa*-CNPA). C: negative control (non-transformed plant). Pág.29

Figure 6. Consensus analysis of nucleotide sequences obtained by using 2F2R primers (0.360 Kb) in T0-25 (H-04) and T0-34 (H-03) putative transgenes, both derived from BRS 293, and *cryIIa*-CNPA. Analysis was done with *MultipleM sequence alignment* program. Pág.29

Figure 7. Southern blot hybridization analysis of genomic DNA extracted from leaves of two transgenic cotton lines and non-transformed plant (BRS 293). A- DNA digested with *HindIII* and B- blot exposition in X-ray. C+: Positive control (0.93 Kb probe, 1 ng/ μ L), C-: Negative control (BRS 293). M: 1-Kb molecular marker (Ladder Plus, Invitrogen). Pág.30

Figure 8. Amplicons obtained by PCR in T1 lines separated by 08% agarose gel. 1 -21: T1 lines descendant from T0-34. G: *cryIIa* probe (0.96 Kb), C-: negative control (BRS 293). M: 1-Kb molecular marker (Ladder plus, Invitrogen). Pág.31

Capítulo III

Figura 1. Expressão temporal da proteína CryIa (μ g/g de tecido fresco) via DAS-ELISA em

folhas de algodão, situadas no terço superior (▲ TS), terço médio(■ TM) e terço inferior (◆TI) das plantas da cv. Bollgard I, em diferentes fases fenológicas. Dados baseados na média de três repetições de leitura da proteína no ELISA Reader, obtidas nas 30 plantas selecionadas ao acaso.). Pág.46

Capítulo IV

Figura 1. Taxa de mortalidade de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas completamente expandidas, situadas no terço superior das plantas T0 de algodão, aos 45 dias. Médias corrigidas em função do controle (5%). Ctrl: planta não transformada (BRS 293). Pág.57

Figura 2. Concentração da proteína Cry1Ia em folhas situadas no terço inferior das plantas T0, aos 65 dias. Médias corrigidas em função do controle (0,6 µg/g). Ctrl: Ctrl: planta não transformada (BRS 293). Pág.57

Figura 3. Secções do intestino médio de *A. grandis* exposto a dieta com adição de botão floral da planta T0-34 visualizadas em microscopia de luz. Reação de conjugação com anti-corpo anti Cry1Ia biotilado, revelado com avidina conjugada a fosfatase alcalina e com NBT/BCIP. A- Controle 1: intestino de larvas alimentadas apenas com dieta artificial (100x); B- Controle 2: intestino de larvas alimentadas com dieta artificial acrescida de botão floral liofilizado (50 mg/mL) de BRS293 (100x); C (40x) e D (100x)- Intestino de larvas alimentadas com dieta artificial acrescida de 50 mg/mL de botão floral liofilizado de planta T0-3; As setas indicam as microvilosidades (MV). Pág.58

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Number of putative transgenic lines (NPTL) based on previous hygromycin assay and PCR amplicons, in ccc and mlc treatments.Pág.27

Capítulo IV

Tabela 1. Análise de variância para toxicidade da proteína CryIIa contra *S. frugiperda*.
.....Pág.57

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Bovine Serum Albumin
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
IgG	Imunoglobulina G
NPTL	Number of putative transgenic lines
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PNPP	P-nitrophenil-phosphatase disodium
RNA	Ácido ribonucleic
RT- PCR	Reação da <i>transcriptase reversa</i> , seguida de m cadeia da polimerase
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DAS-ELISA	Direct Antibody Coating Enzyme Linked Immunoassay
PIB	Produto Interno Bruto

RESUMO

Várias instituições de ensino e pesquisa, em todo o mundo têm devotado esforços na descoberta de novas proteínas inseticidas e dos respectivos genes para o controle de pragas agrícolas. Trabalhos têm evidenciado o potencial de algumas moléculas no controle de insetos como as toxinas Bt do *Bacillus thuringiensis*, inibidores de proteases e de alfa-amilases e lectinas. Genes codificantes para essas proteínas têm sido estavelmente integrados ao genoma de plantas transgênicas conferindo-lhes resistência a pragas, como é o caso das culturas de tabaco, tomate, batata, milho e algodão Bt com resistência a lepidópteros que já são amplamente comercializadas em vários países. Vários estudos comprovam a economia e o benefício ecológico dessas cultivares no agronegócio internacional. Na lavoura algodoeira as pragas das ordens lepidóptera e coleóptera são os principais problemas econômicos em nível mundial. A Embrapa desenvolve pesquisas voltadas para o controle de pragas do algodoeiro com o intuito de reduzir os custos de produção, destes, 20 a 30% são para controle das pragas. Apesar dos importantes resultados obtidos até o momento o controle químico ainda tem sido o de melhor resposta embora mais oneroso no aspecto financeiro e mais agressivo no aspecto ambiental. O gene *cryIIa* derivado da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S1451 pode ser responsável por este tipo de controle. A atividade inseticida deste gene foi testada visando a análise da proteína recombinante para o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e para a lagarta *Spodoptera frugiperda*. Indicando que este gene é bastante promissor para uso na área molecular visando obtenção de cultivar transgênica de algodão resistente a estas duas importantes pragas. Em um trabalho anterior esse gene foi inserido em três cultivares comerciais de algodão pela técnica de microinjeção via *ovary drip*. Nesse momento as cultivares receberam duas diferentes construções, compostas por um cassete linear mínimo *mlc* (\approx 3 Kb) e uma construção circular completa *ccc* (\approx 15 Kb), ambas contendo o gene *cryIIa*. A integração do gene e expressão de proteína foram analisadas por PCR de DNA genômico, RT-PCR semi-quantitativo, *Southern blot* e ELISA. Mais de 1.800 transgenes foram testados e a integração do gene completo (1 cópia) foi detectada pelo ensaio de *Southern blot* e encontrada em apenas um único evento denominado T0 34 que foi derivado da cultivar BRS 293 no tratamento *mlc*, sugerindo uma tendência genótipo-dependente. A expressão da proteína CryIIa no evento T0 34, estimada por ELISA, foi semelhante a Bollgard comercial (Monsanto, EUA). A transmissão do transgene para progênies T1 foi demonstrada por análise de PCR e nenhum efeito pleiotrópico foi verificado nessas plantas que foram fenotipicamente normais, com flores férteis e produção de sementes abundantes. No aspecto entomológico larvas da lagarta militar foram utilizadas em bioensaios de alimentação com folhas dos eventos T0 resultantes da BRS 293. Essas mesmas plantas também foram analisadas quanto a expressão da proteína CryIIa, via ELISA. De um total de 48 plantas, apenas a T0 34 foi selecionada em ambos os ensaios, com taxa de mortalidade de 89% e elevada concentração da proteína tóxica nas folhas. Botões florais desidratados dessa planta foram fornecidos a larvas do bicudo do algodoeiro para estudo de imunodeteção via microscopia ótica, utilizando-se tecidos do intestino médio do inseto. Verificou-se que a proteína presente nos botões florais se ligaram especificamente ao anticorpo utilizado demonstrando que esse evento é muito promissor para posteriores estudos de melhoramento visando resistência a duas importantes pragas da lavoura algodoeira.

Palavras chave: transformação, microinjeção, resistência a insetos, *Gossypium*

ABSTRACT

Various educational institutions and research throughout the world have devoted efforts in the discovery of new insecticidal proteins and their genes for the control of agricultural pests. Studies have shown the potential of some molecules in insect control as the *Bacillus thuringiensis* Bt toxins, protease inhibitors and alpha-amylase and lectins. Genes coding for these proteins have been stably integrated into the genome of transgenic plants giving them resistance to pests, such as cultures of tobacco, tomato, potato, corn and cotton with Bt resistance to lepidopteran which are widely marketed in various countries. Several studies have confirmed the economy and the ecological benefit of these cultivars in international agribusiness. In cotton field lepidopteran and coleoptera orders are the worldwide major economic problems. Embrapa develops research for the control of cotton pests in order to reduce production costs, of these, 20-30% are for pest control. Despite the important results obtained so far chemical control has still been the best answer although more costly in financial and more aggressive aspect in environmental aspect. The *cryIIa* gene derived from *Bacillus thuringiensis* strain S1451 may be responsible for this type of control. Insecticidal activity of this gene was tested aiming at the analysis of the recombinant protein for the boll weevil (*Anthonomus grandis*) and *Spodoptera frugiperda* caterpillar. Indicating that this gene is very promising for use in molecular area aimed at obtaining cultivate transgenic cotton resistant to these two important pests. In previous work this gene was inserted into three commercial cotton cultivars by microinjection technique via *ovary drip*. At that moment the cultivars received two different buildings, composed of a minimum linear cassette *mlc* (\approx 3 Kb) and a circular complete construction *ccc* (\approx 15 Kb), both containing the gene *cryIIa*. The integration of the gene and protein expression was analyzed by PCR of genomic DNA, semi-quantitative RT-PCR, *Southern blot* and ELISA. Over 1,800 transgenes were tested and the full integration of (1 copy) gene was detected by *Southern blot* assay and found in only a single event called T0 34 which was derived from the cultivar BRS 293 in *mlc* treatment, suggesting a genotype-dependent trend. The expression of CryIIa protein in T0 34, estimated by ELISA was similar to the commercial event Bollgard (Monsanto, USA). The transmission of the transgene to T1 progeny was demonstrated by PCR analysis and no pleiotropic effects were observed in these plants were phenotypically normal, fertile flowers and with abundant production of seeds. In entomological aspect of military caterpillar larvae were used in feeding bioassays with leaves of T0 events resulting from BRS 293. These same plants were also analyzed for expression of CryIIa protein via ELISA. A total of 48 plants were only T0 34 selected in both tests, the mortality rate of 89% and a high concentration of the toxic protein in the leaves. Dried flower buds of this plant were provided to larvae of the boll weevil to study immunodetection via optical microscopy, using midgut tissues of the insect. It was found that this protein in flower buds specifically bound to the antibody used to demonstrate that this event is very promising for further studies of improvement of resistance to two important pest of the cotton crop.

Key Word transformation, microinjection, insect resistance, *Gossypium*

SUMÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO	i
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cenário da cotonicultura nacional	3
2.2. O bicudo do algodoeiro	4
2.3. Controle de insetos via transgenia	5
2.4. Métodos de transformação de plantas de algodão	8
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
CAPÍTULO II.....	16
Success rate of transformation of cotton by microinjection with two different cryIIa-cassettes	16
CAPITULO III	40
Expressão temporal da proteína Cry1Ac indexada na cultivar de algodão Bollgard I.....	40
CAPITULO IV	51
Toxicidade e imunodeteção de eventos de algodão-cryIIa resistentes ao bicudo do algodoeiro e a lagarta militar.....	51
ANEXOS	62
PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER.....	63
REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA, (ISSN 0045-6888 IMPRESSO E 1806-6690 ONLINE).....	74
GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH (GMR).....	81

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de algodão com uma produção superior a 4 milhões de toneladas (IBGE, 2014). Apesar do crescente aumento da lavoura algodoeira, esta é uma atividade de elevado custo, devido, principalmente aos gastos com as práticas de mecanização e controle de pragas e plantas invasoras que oneram em mais de 40% os custos de produção (FREIRE, 2007). No Brasil os gastos realizados com defensivos químicos, especialmente com inseticidas, são elevados. Só para a cultura do algodão cerca de 27% do total vendido no país são destinados para esta lavoura (BARROSO e HOFFMANN, 2007).

Dentre as principais pragas que exigem controle químico destacam-se o coleóptero *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro) e os lepdópteros *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do milho), *Plutela xylostella* (traça-das-crucíferas), *Heliothis virescens* (lagarta da maçã), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada) e *Anticarsia gemmatilis* (lagarta da soja) (SANTOS, 2001). O uso de cultivares resistentes torna-se limitado devido a inexistência de germoplasma que responda de modo eficaz a ação do inseto. Uma alternativa que tem sido amplamente adotada no mundo é o uso de lavouras transgênicas contendo genes que expressam proteínas tóxicas contra várias classes de insetos. A economicidade e benefício ecológico dessas lavouras no agronegócio internacional têm sido largamente reportado especialmente para as grandes lavouras.

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. Esta, durante sua esporulação sintetiza cristais protéicos, conhecidos como cry ou α -endotoxina com propriedade inseticida mesmo que em baixa

concentração (SCHNEPF et al., 1998).

A equipe de controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) detêm atualmente mais de 3000 isolados de *Bt* que possuem proteínas tóxicas contra várias ordens de insetos. No final de 2005, a equipe isolou o gene *cryIIa*, com potencial para o controle do bicudo do algodoeiro (*A. grandis*) e da lagarta do cartucho do milho (*S. frugiperda*) (MARTINS et al., 2005). Em 2007, sua atividade inseticida foi expressa em células de inseto visando a análise da proteína recombinante, revelando-se altamente tóxica para a lagarta *Spodoptera frugiperda* e tóxica para o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*).

Levando-se em consideração todos os resultados obtidos um cassete de expressão contendo o gene *cryIIa* foi construído e utilizado para introduzir este gene em três cultivares comerciais de algodão pela técnica de microinjeção via *ovary drip*. O uso desta técnica consiste na introdução de um DNA exógeno em um embrião de algodão, por meio de uma microseringa. Assim, o gene de interesse pode ser integrado dentro do genoma da cultivar receptora, sem precisar passar por processos de regeneração. Considerando este aspecto, desenvolveu-se a presente pesquisa objetivando selecionar eventos transformados de algodão resistentes a insetos baseando-se em análises moleculares e de imunodeteção. Os resultados da presente pesquisa servem de subsídio para avançar nos trabalhos de transgenia desenvolvidos pela Embrapa Algodão que são de alta importância para o desenvolvimento estratégico do agronegócio brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cenário da cotonicultura nacional

O algodoeiro pertence ao gênero *Gossypium*, que contem mais de 50 espécies identificadas, entre as quais 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí, e uma no nordeste brasileiro (PENNA, 1999; BALLAMINUT, 2006). As espécies cultivadas mais conhecidas são *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L., sendo a primeira a de maior valor comercial, e uma das principais *commodities* internacionais (FREIRE, 2007; CRAVEN et al, 1994).

A espécie *G. hirsutum* é um tetraploide que responde por mais de 90% da produção de fibras e fio em todo mundo. Além de ser destinada a indústria têxtil, as sementes utilizadas na indústria oleoquímica e os resíduos da extração, alimentam as indústrias de farelo e ração (FREIRE, 2007).

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

No Brasil, a safra de 2013 registrou uma produção de 4.343.626 de algodão em caroço em 939 093 ha. A perspectiva de crescimento de área para a safra de 2014 está estimada em 22% (IBGE, 2014).

A cotonicultura é uma lavoura responsável pelo desenvolvimento econômico e social do principal pólo de produção que é a região dos Cerrados do Centro-Oeste e Baiano (FREIRE, 2007). Nessa região encontram-se áreas extensivas onde os agricultores praticam um manejo altamente tecnificado, com alto impacto tecnológico. Na região do Semiárido, que já foi o celeiro do algodão até a década de 70, a lavoura é conduzida por pequenos produtores,

geralmente em sistemas agroecológicos, onde as cultivares de fibras coloridas tem sido mais adotadas.

No manejo extensivo, o custo de produção situa-se entre U\$ 3,000 a 3,500/ha, um dos mais elevados em função dos custos com maquinários e controle de pragas, incluindo ervas daninhas, patógenos e insetos.

Em função do complexo de pragas que incide sobre a cultura, o controle é frequentemente realizado com inseticidas químicos, a despeito da agressão ao homem e ao meio ambiente. O uso inadequado tem permitido o surgimento de populações resistentes em varias lavouras. Estimativas registradas pelos produtores do Cinturão do Algodão, na região dos Cerrados, apontam que atualmente, são necessárias entre 15-20 aplicações de inseticidas químicos para o controle de pragas. Isso minimiza a competitividade do agronegócio da cotonicultura nacional além de desfavorecer a adesão dos pequenos agricultores devido aos elevados custos no manejo.

2.2. O bicudo do algodoeiro

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman 1843) é uma das mais sérias pragas do algodão porque provoca sérios danos a lavoura devido a rápida disseminação, elevada proliferação e, mais principalmente, por se alimentar exclusivamente de estruturas florais causando prejuízos diretos à produção e comercialização da fibra de algodão (SANTOS, 2003; ALMEIDA e SILVA, 1999; HAYNES, 1992). A principal razão dos prejuízos que o bicudo faz as plantas de algodão é que todo processo preferencial de alimentação e oviposição ocorrem nos botões florais, afetando também as maçãs e, conseqüentemente, a formação das sementes. Dessa forma, o habitat do inseto torna-se muito protegido a praticas de controle, que não sejam sistêmicas. A despeito disso, na fase de colheita, o inseto se abriga em refúgios nas matas ou nas soqueiras, aguardando o novo

plântio, sendo uma praga de difícil controle.

Trata-se de um coleóptero, pertencente à família Curculionidae, subfamília *Anthonominae*, que já provocou severos danos na cotonicultura mundial, devastando áreas de produção e, conseqüentemente, a economia têxtil de vários países, inclusive os Estados Unidos. No Brasil, o inseto foi identificado em campos no cinturão do algodão no início da década de 80, situados principalmente na Paraíba e São Paulo, na ocasião, principais produtores nacionais (SANTOS, 2003).

Em várias partes do mundo, a política de erradicação do inseto foi seriamente adotada de modo que em alguns deles, a ocorrência do inseto praticamente não existe. No Brasil, contudo, a demora na atitude de ações pertinentes e ainda o atraso cultural de alguns produtores permitiram que o inseto se disseminasse em todo território nacional, afetando completamente toda economia advinda da cotonicultura, inclusive a social, uma vez que, com a expressiva elevação dos custos de produção, vários produtores preferiram desistir de manter a lavoura (SANTOS, 2003; ALMEIDA e SILVA, 1999).

Desde o estabelecimento do inseto nos campos de produção e constatação dos níveis de danos, várias estratégias de controle foram planejadas, tais como: a) utilização de *Beauveria bassiana*, devido a larga aplicação desse patógeno no controle biológico de insetos, b) utilização de armadilhas de captura de botões florais, c) desenvolvimento de cultivares precoces, e d) controle com inseticidas sintéticos. Esse último, apesar de encarecer em mais de 20% o custo de produção, continua sendo, até a atualidade a forma mais efetiva de controle, apesar dos severos malefícios ao homem e ao ambiente (BARROSO e HOFFMANN, 2007; SANTOS, 2003; SILVA, 2001).

2.3. Controle de insetos via transgenia

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, situando-se na faixa entre 40 e 65% (JAMES, 2013). 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, 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 α -endotoxina, com propriedade inseticida (SCHNEPF et al., 1998). Dentre os genes com tal propriedade destacam-se os da família cry onde as proteínas apresentam ampla ação inseticida, principalmente sobre dípteros (Cry IV), coleópteros (Cry III) e lepidópteros (Cry I; Cry II) (RAJASEKARAN et al., 2000).

A ativação das proteínas Cry ocorre no lúmen intestinal dos insetos susceptíveis da seguinte forma: (i) por meio da solubilização da toxina 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 e (iii) pela ligação das toxinas a receptores específicos das células epiteliais do intestino médio das larvas. Tais ações promovem a formação de canais iônicos que elevam a pressão osmótica intracelular, promovendo o aumento e a lise celular (SCHNEPF et al., 1998; FIUZA, 2004).

As proteínas Cry ou α -endotoxinas de *B. thuringiensis* fazem parte de um grupo de proteínas com atividade contra diferentes ordens de insetos. A especificidade da proteína 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, Hemíptera, Orthoptera, Isoptera e Malophaga (FEITELSON et al., 1992; DE MAAGD et al. 1999; CASTILHO-FONTES, et al., 2002), além de Nematóides (MARROQUIN et al., 2000), Protozoários e Fitopatógenos.

Atualmente, são comercializados diferentes eventos de algodão GM expressando proteínas Cry. Entre estes, estão plantas de milho GM contendo o gene *cryIAb* (Syngenta Bt176, Bt11; Monsanto Mon80100, Mon802, Mon809, Mon810), o gene *cryIAc* (Dekalb DBT418 - Bt XtraTM), o gene *cry3Bb1* (Monsanto, Mon863-5), o gene *cry9C* (Avenis ACS-ZM4-3, StarLinkTM); e plantas de algodão GM com o gene *cryIAc* (Monsanto, Mon531-Bollgard[®]) e transformadas com o gene *cryIAc* associado com o gene *cry2Ab* (BollgardII[®], DOW 3006, Calgene 31807).

A inserção de Bt em plantas de algodão foi conseguida pela primeira vez por Perlak et al. (1990), nos EUA, que inseriram os genes *cryIAb* ou *cryIAc* do Bt com intuito de controlar as pragas *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*. Daí em diante, várias plantas de algodão geneticamente modificadas foram desenvolvidas e no Brasil já se cultiva mais 710 mil ha de algodão Bt, com cultivares oriundas de multinacionais (JAMES, 2013).

A ampla adoção do algodão *Bt* é explicada pelos múltiplos benefícios alcançados pelos agricultores que adotam esta tecnologia, incluindo o aumento de produtividade, diminuição do custo de produção e redução na aplicação de inseticidas, resultando em benefícios econômicos, sociais e ambientais.

Apesar das valiosas cultivares GM disponíveis atualmente no mercado, nenhuma delas oferecem resistência ao bicudo-do-algodoeiro. Um esforço integrado nessa tentativa tem sido feito pela Embrapa Cenargen e Embrapa Algodão, em parceria com várias instituições nacionais. A Embrapa já detém duas construções gênicas contendo os genes *cry10* e *cry11a*

que conferem resistência ao bicudo, sendo que a última também oferece resistência a lagarta militar (*S. frugiperda*) (MARTINS et al, 2008). Ambas as construções tem sido utilizadas em trabalhos de transgenia do algodão com perspectiva de desenvolver futuras cultivares com resistência a insetos, com tecnologia genuinamente nacional.

2.4. Métodos de transformação de plantas de algodão

A transformação genética em plantas é um meio pelo qual se pode transferir um DNA exógeno para um genoma receptor, originando assim um organismo transgênico (TACCHINI e WALBOT, 1986; GOULD, 1991).

Vários métodos de transformação de plantas encontram-se disponíveis atualmente, muitos dos quais oferecem níveis diferentes de sucesso em função da espécie trabalhada. Dentre os mais utilizados, citam-se os métodos via *Agrobacterium* e bombardeamento ou biobalística.

O método via *Agrobacterium* apresenta a capacidade natural de transferir parte de seu DNA para a planta hospedeira sendo este posteriormente integrado e expresso (HOHN, 1992; ZAPATA et al. 1999). Apresenta maior precisão de transferência, possibilitando a integração de um menor número de cópias do transgene.

A técnica de biobalística é mais difundida e baseia-se na capacidade de acelerar microprojéteis de metais (ouro e tungstênio) associados a segmentos de ácidos nucleicos, fazendo com que os mesmos penetrem no interior celular por meio da transposição da parede celular e a membrana citoplasmática, sem comprometer a viabilidade da mesma (SANFORD, 1988). Este método emprega um equipamento que produz uma força propulsora, usando pólvora, gás ou eletricidade, que projeta as micropartículas inertes, cobertas com DNA, em direção às células alvo e posterior integração, transcrição e expressão no genoma alvo (FINER et al., 1996).

Um dos inconvenientes desses métodos é a necessidade de regeneração da planta, o que encarece substancialmente o processo de transformação e ainda pode ser um fator limitante no caso de espécies recalcitrantes como é o caso do algodoeiro (CARVALHO et al, 1998).

Há ainda os métodos via eletroporação de protoplastos, absorção de DNA mediada via polietilenoglicol (PEG) e microinjeção.

A técnica de microinjeção é uma das menos onerosas e baseia-se na introdução do DNA exógeno na planta receptora, pelo canal do tubo polínico ou pelo ovário (ZHOU et al.; 1983). A grande vantagem desse método é porque não requer as etapas de regeneração de plantas e não necessita de técnicos especializados para o procedimento.

A introdução de DNA exógeno no embrião da planta se dá logo após a fertilização. As células da nucela formam um canal para permitir a passagem do tubo polínico até o saco embrionário. A aplicação de uma solução contendo DNA se faz no orifício do fruto deixado pela remoção do estigma da flor, permitindo que o DNA exógeno alcance o ovário e possa se integrar às células zigóticas já fertilizadas, mas não divididas. O processo de transformação ocorre porque as células ainda não apresentam parede celular, apenas protoplastos. Dessa forma, o gene de interesse pode ser integrado ao genoma da cultivar receptora, gerando sementes transformadas sem a necessidade de passar por um sistema de regeneração.

Após a constatação da transformação, vários testes são necessários para estimar o número de cópias do gene inserido no genoma da planta e seu padrão de expressão, cujos padrões dependem dos níveis de transcrição e podem estar sujeito a fatores epigenéticos (VAUCHERET et al., 1998).

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. P.; SILVA, C. A. D. Manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: Beltrão, N.E. de M. (ed.) **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Comunicação para Transferência de

Tecnologia Embrapa, Brasília, v.2, p.753-820, 1999.

BALLAMINUT, C. 2006. Disponível em

<http://www.algodao.agr.br/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=73&Itemid=132>. Acesso em: 28/07/2014.

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, 2007. p. 918.

CARVALHO, J.M.F.; GONZALEZ-BRITO, E.; PEREZ, C.; SANTOS, J.W. Resposta de duas cultivares de algodão à embiogênese somática em diferentes meios de cultivo. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.2, n.1, p.13-20, 1998.

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.

CRAVEN, L.A; STEWART, M.C.D.; BROWN, A.H.D.; GRACE, J.P. The Australian wild species of *Gossypium*. In: PROCEEDINGS OF THE WORLD 26 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.

FEITELSON, J.; SPAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology**, v.10, p.271-275, 1992.

FINER, J.J.; FINER, K.R.; SANTAREM, E.R. Plant Cell Transformation, physical methods for. In: MEYERS, R.A. **Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine**. Weinheim: VCH Publishers, 1996.

FIUZA, L.M.. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. n.32, p.84-89, 2004.

FREIRE, E.C. **Algodão no Cerrado do Brasil**. ABRAPA: Brasília, DF. 2007

GOULD, J.H.; MAGALLANES-CEDENO, M.M. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology Report**, v.16, n.3 p.1-10, 1991.

HAYNES, J.W., SMITH, J.W. Longevity of Laboratory-Reared Boll-Weevils (Coleoptera, Curculionidae) Offered Honey Bee-Collected Pollen and Plants Unrelated to Cotton. **Journal of Entomological Science**, v. 27, n. 4, p. 366-374, 1992.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillusthuringiensis*. **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.

IBGE, 2014. Disponível em:
<http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201406_2.shtm
> Acessado em: 28/07/2014

JAMES, C, 2013. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: *ISAAA Brief*, n.46
Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/>>.
Accessed 10 July 2014.

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

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

MARTINS, E. S.; AGUIAR, R. W. de 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. Algodão, uma fibra natural. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 2005. 1 CD-ROM.

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*). **The Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 1363–1371, 2008.

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, p.321-329, 2003.

PENNA, J.C.V. Hibridacao em Algodao. In: BOREM, A. (Ed.). **Hibridação Artificial de Plantas**. Vicosa: UFV. p.63-81, 1999.

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.

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.

SANFORD, J.C. The Biolistic Process. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.6, p.299-302, 1988.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In:

Algodão: tecnologia de produção. Dourados-MS: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 181-226. 2001.

SANTOS, R.C. **Estudos biológicos e moleculares da colestero 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, n.3, p. 775–806, 1998.

SILVA, C.D.A. Efeito da formulação e aplicação de *Beauveria bassiana* no controle do bicudo do algodoeiro. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.5, n.3, p. 433-437, 2001.

TACCHINI, P.; WALBOT, V. Transformation of plants. **Nestlé Research News**, v. 87, p. 19-30, 1986.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin 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 cry1Ia-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. **The Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.23–28. 2003.

VAUCHERET, H. *et al.* Transgene-induced Gene Silencing in Plants. **The Plant Journal**, Oxford, v.16, p.651-659, 1998.

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**, v.98, n.2, p.252-256, 1999.

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.

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

CAPÍTULO II

Success rate of transformation of cotton by microinjection with two different cry1Ia-cassettes

Submetido a Revista: Plant Molecular Biology Reporter

De: Plant Molecular Biology Reporter <em@editorialmanager.com>

Para: Carliane Silva <carliane.rebeca@gmail.com>

Assunto: Acknowledgement of Receipt

Dear Dra. Carliane Silva:

Thank you for submitting your manuscript, "Frequency of transformation in Brazilian cotton cultivar microinjected with two different cryIIa-cassettes", to Plant Molecular Biology Reporter.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site: <http://pibr.edmgr.com/>

With kind regards,

The Editorial Office
Plant Molecular Biology Reporter

Success rate of transformation of cotton by microinjection with two different *cryIIa*-cassettes

Carlíane Rebeca Coelho da Silva¹, Rose Monnerat², Liziane Maria de Lima³, Érica Soares Martins², Péricles Albuquerque Melo Filho¹, Morganna Pollynnne Nóbrega Pinheiro¹, Roseane Cavalcanti dos Santos³

Affiliations ¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil, E-mail:

carliane.rebeca@gmail.com,pericles@depa.ufrpe.br, morgannapollynne@yahoo.com.br,

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, SAIN, Parque Rural, W3 Norte, 70770-700, Brasília-DF, Brasil, CEP: 700990-700, E-mail: rose.monnerat@embrapa.br, ericamartins@imamt.com.br,

³Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143, Centenário, Campina Grande-PB, Brasil, CEP: 58428-095; Campina Grande-PB, Brasil, E-mail: liziane.lima@embrapa.br, roseane.santos@embrapa.br.

Corresponding author: Roseane Cavalcanti dos Santos, Rua Oswaldo Cruz, 1143 – Centenário, Campina Grande - PB - Brasil - 58428-095

Tel: 55 (83) 3182-4300

Fax: 55 (83) 3182-4367

E-mail: roseane.santos@embrapa.br

Abstract

Insect pests are major constraints of crop production and important factor for increasing production costs. The development of cultivars with resistance against pests using only conventional breeding is limited when there are not genetic resources holding resistance traits to important pests. Genetically modified (GM) crops are an option to overcome the absence of traits for resistance. The success of a technique for insertion of transgenes depends on the choice of procedures and on the possibility of *in vitro* plant regeneration. For recalcitrant plants, such as cotton, methods that do not require plant regeneration are faster and cheaper options to insert transgenes. In this study, we report the development of insect-resistant transgenic cotton expressing an optimized *cryIIA* gene from *Bt*, using the technique of ovary-drip microinjection. Four Brazilian cotton cultivars were microinjected with two different constructs: a minimal linear cassette (*mlc* ~3 Kb) and a complete circular construction (*ccc* ~15 Kb), both containing the *cryIIa*. The gene integration was analyzed by PCR, semiquantitative RT-PCR, and Southern blot assays. More than 2,600 putative transformed lines were tested. Complete gene integration was found only in the transgene deriving from cv. BRS 293 in the *mlc* treatment. The transmission of *cryIIa* to T1 progenies was confirmed by PCR analysis. No pleiotropic effect was found in these plants, which were phenotypically normal with fertile flowers and abundant seed production.

Key words: *Gossypium hirsutum*, microinjection, gene construction, inheritance

Introduction

Cotton is an important traded agricultural commodity in the world market. Brazil is a leading global producer of cotton. Its annual lint production exceeds 4 million ton (IBGE, 2014). The cotton production system is based on high technology and cultivars adapted to the tropical environment (Morello et al, 2012, Morello et al, 2010). A challenge for cotton production in Brazil is the lack of natural traits for tolerance against important pests, which limits the efficacy of conventional breeding. Pest management accounts for a significant portion of the high production costs because in a tropical environment cotton plants are attacked by many insects that require chemical control (Lima Jr et al, 2013; Silva et al, 2011).

The annual costs for pest control in cotton crop are around US\$ 2–3 billion, and they account for approximately 10% of the production costs and up to 50% of the pesticides used in developing countries (Deguine et al, 2008; Haney et al, 2012).

These barriers were overcome in some crops after the development of genetically modified (GM) plants containing an exogenous gene conferring resistance to several pest species (Nagano et al, 2013). The management of those GM crops is cheaper and less dependent on pesticides; however, so far GM crops were made resistant only against lepidopterae insects (James, 2013). In Brazil, boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae) is the most important pest due to its high capacity of reproduction and because larvae and adults feed primarily on reproductive structures, and they cause direct damage to the commercial product (Santos et al, 2003; Santos et al, 2002). GM plants with resistance against cotton-boll weevil could bring significant financial and environmental benefits.

There are several methods for development of GM plants. The predominant methods used in cotton are *Agrobacterium* and biolistics (Gould and Magallanes-Cedeno, 1998; Zapata et al., 1999, Rajasekaran et al., 2000). Nevertheless, these methods require laborious and

expensive procedures of plant regeneration, and cotton is a recalcitrance species that can be hardly regenerated by tissue culture procedures (Aragão et al, 2005; Yang et al., 2009a).

Transformation via DNA microinjection is a feasible and easy method, first reported in cotton by Zhou et al. (1983). The method consists on applying an exogenous DNA onto the excised style after pollination. The DNA goes along the pollen tube pathway into the embryonic sac, egg, and zygote. As these cells generally do not have normal cell walls, they are like natural protoplasts prone to take up foreign DNA. The advantage of this method is the introduction of donor or exogenous DNA into ovaries at approximately the time of fertilization or right after fertilization, avoiding the constraints imposed by plant regeneration (Liu et al., 2009). Some successful procedures have been reported in several crops, including rice (Luo and Wu, 1989), soybean (Liu et al, 2009; Gao et al., 2007), and maize (Yang et al, 2009a).

In addition to the transformation methods, researchers have focused on safety assessment of GM crops, which often contain vector backbone sequences and selectable marker genes that confer resistance to specific antibiotic or herbicide (Liu et al., 2009; Yang et al., 2009a; Aragão et al, 2005). Transgenic plants successfully obtained by vector and selectable marker-free were reported in potato (Romano et al., 2003), grapevine (Vidal et al., 2006), wheat (Yao et al., 2007) and maize (Yang et al., 2009a, b). The success rate of the transformation in each species depends on its genetic complexity and on the technique. Despite to larger requirements necessary to identify the transgenes in the selection procedures, the ecological benefits are magnified because all plants are vector backbones-free. This paper reports a successful vector- free transformation procedure, to obtain transgenic cotton plants by using ovary-drip method.

Material and methods

Gene constructs

The gene used in the construction (*cryIIa*) was isolated by our team (Martins et al (2009), from *Bacillus thuringiensis* S1451 strain, which demonstrated high toxicity against *A. grandis* and *S. frugiperda* in previous bioassays. The original sequence of *cryIIa* was reissued with 40% changes based on the cotton codon usage. A linear cassette was designed (promoter+open reading frame+terminator), named *cryIIa*-CNPA (~3 Kb, Figure 1A) and further used in the microinjection procedures (minimal linear cassette, *mlc* treatment).

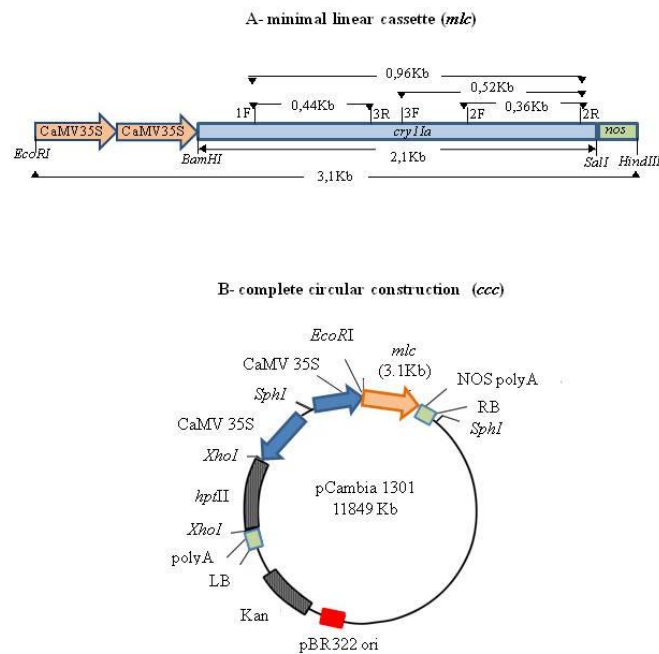


Figure 1. Diagrammatic scheme of constructions used to microinjection in cotton bolls, via ovary-drip.

Later, the *mlc* was cloned in pCAMBIA 1301 vector, performing a complete circular construction, named *ccc* treatment (~15 Kb, Figure 1B) and also used for further microinjection in cotton plants.

Transformation procedures

Given the recalcitrance to regeneration of some *Gossypium hirsutum* genotypes, a direct method was chosen, by ovary-drip microinjection applied on four cultivars, developed by the breeding program of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA): BRS Antares, BRS Araçá, BRS Cedro, and BRS 293. In greenhouse, cotton seeds were sown in pots (40 cm diameter × 30 cm high) filled with nutrient-rich soil and daily watered. Each pot contained only two seedling. Microinjection procedures of each *mlc* and *ccc* treatment were carried out at full blooming (50-60 days after emergence) on 10 young bolls of each plant. A drip of 10 µL (100 ng/µL) was microinjected onto the newly fertilized boll ovaries using a 0.13 mm diameter microsyringe (Hamilton, USA). All putative transformed seeds (T0 generation) were collected and sown in greenhouse for further assays.

Polymerase chain reaction (PCR) assays

Seeds (T0) collected from *mlc* treatment were tested by PCR assays. Genomic DNA from control (non-transformed plant) and T0 lines were obtained by using Easy-DNA kit (Invitrogen) according to the manufacturer's directions.

PCR assays were performed in reaction of 25 µL, containing 1 µL DNA (20 ng/µL), 2.5 µL 10× Taq buffer, 1.5 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL dNTP (10 mM), 1 µL each forward, and reverse primer at 10 µM and 0.3 µL Taq polymerase (5 U/µL). Three specific primer combinations were used to amplify partial fragments of *cryIIa*-CNPA (Figure 1A): 1F (5' ATCTTCGGAAAAGAATGGGG 3')/3R (5' AGGAGCATTGTTGTTATACC 3'): 0.44 Kb, 2F (5' ACAGAATCACTTGCTGGATTG 3')/2R (5' TCCTGAAGACAAATTGAAAGC 3'): 0.36 Kb, and 3F (5' GAATAGGGGAGAAGATTTGG 3')/2R: 0.52 Kb.

The PCR conditions (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) were: initial denaturation at 96°C/5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 96°C/1 min, annealing at 56°C/45 s

and extension at 72°C/1 min, and a final extension at 72°C/10 min. A 15 µL aliquot of PCR products were resolved by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and further photo documented.

Hygromycin resistance assays

Given that pCAMBIA 1301 vector contains *hptII* as marker gene (Figure 1), plants obtained from *ccc* treatment were first evaluated to hygromycin resistance. Leaves from middle canopy of all putative transgene lines were utilized to assays. Hygromycin solution (50 mg/L) were prepared and applied on leaf surface using cotton swab. Necrotic symptoms was described as indicator of negative line (non-transformed plant). Data were recorded weekly. Plants with no-blotting were assumed as putatively transformed and were also tested in PCR assays using the same primer combinations described above.

Sequencing of PCR products

Fragments obtained from PCR amplification from putative transformed plants were purified (Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit, GE Healthcare) and submitted to sequencing analysis (Sequence Analyzer MegaBace 1000, Amersham/GE Healthcare) using DyEnamic™ ET-Terminators Kit. Five replications were used for each sample. The sequences obtained were first analyzed and edited using BioEdit (7.0.9.0) program and further analyzed in BlastN (Basic Local Alignment Search Tool) available in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The alignment of the sequences was performed by *MultipleM sequence alignment* program (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>).

RT-PCR expression of cryIIa-CNPA by semiquantitative assay

Total RNA was isolated from leaves 30 days old of putative transformed lines previously

confirmed by PCR assays, by using Plant RNA Mini-Spin Invisorb kit (Invitec, Berlin, Germany) according to the manufacturer's instructions. Then, total RNA was used for cDNA synthesis using Super SMART PCR cDNA Synthesis kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

The cDNA was used as a template for PCR amplification of the transgene specific fragments.

The 25 μ L RT-PCR mixture contained 1 μ L of each cDNA (1 μ g/ μ L), 2.5 μ L 10 \times Taq buffer, 1.5 μ L of MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ L dNTP (10 mM), 1 μ L each 1F/2R (0.96 Kb) and 2F/2R (0.36 Kb) primers at 10 μ M, and 0.5 μ L *Taq* polymerase (5 U/ μ L).

The thermal conditions were the same used for PCR assays. The products of the reactions were analyzed in agarose gel (0.8%) with a 1 Kb DNA ladder (Plus DNA Ladder; Invitrogen).

Two primers were designed from β -*actin* gene as an internal reference, BA-F: 5' GATCTGGCATCACACCTTC 3'; and BA-R: 5' AGGAAGCTCGTAGCTCTT 3', generating an amplicon of 0.33 Kb.

Southern blot analysis

Genomic DNA was isolated from leaves using the Illustra DNA Extraction kit Phytopure (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions. DNA (15 μ g) was digested with *Bam*HI (Promega), separated on a 0,8% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond N+, Healthcare Amersham). The membrane was hybridized with DIG-labeled *cryIIa* probe (1F/2R, 0.96 Kb) using DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche Applied Science, Switzerland) according to the manufacturer's directions. Immunological detection was performed using CDP-Star detection solution (Roche Applied Science). The membrane was exposed to X-ray for 30 min and developed for further blotting analysis. The assay was performed in three replicates.

Genetic analysis of T1 lines

T1 generation transformants were analyzed through amplification by PCR assays (1F/2R primer combination: 0.96 Kb) of self-pollinated plant leaves. Genomic DNA was isolated as previously described. Chi-square (χ^2) analysis was performed to determine the segregation ratio and consistency with Mendel laws.

Results

Transgene identification and integration by Southern blot

More than 2,600 putative transgenic seeds were collected from microinjected bolls of four Brazilian cultivars and sown in greenhouse. To *ccc* treatment (cassette~15 Kb, containing pCAMBIA 1301 vector), 1,220 lines were first evaluated to hygromycin resistance (50 mg/L). Only nineteen plants did not show leaf necrosis (see symptoms in Figure 2): BRS Antares (6 lines), BRS Araçá and BRS Cedro (2 lines each), and BRS 293 (9 lines) (Table 1, *ccc* treatment).



Figure 2. Detail of hygromycin assay in cotton leaves of putative transformed plants. A- leaf without reaction to hygromycin, B- yellowish blotching in non-transformed plant.

Table 1. Number of putative transgenic lines (NPTL) based on previous hygromycin assay and PCR amplicons, in ccc and mlc treatments

Cultivars	Treatment									
	ccc					mlc				
	N° lines	higromicina	2F2R	1F3R	3F2R	N° lines	2F2R	1F3R	3F2R	NPTL
BRS Antares	310	2	-	.	-	296	+	-	-	2
BRS Araçá	288	1	-	.	-	315	-	-	+	1
BRS 293	296	3	-	.	-	301	+	+	+	3

ccc- complete circular cassette, mlc- minimal linear cassette. In each treatment, 10 bolls were DNA-microinjected to each cultivar.

These selected lines were further tested by PCR, and fifteen showed robust amplicons in only one primer combination (0.44 kb), which was also confirmed by a PCR-*Southern blot* assay (Figure 3).

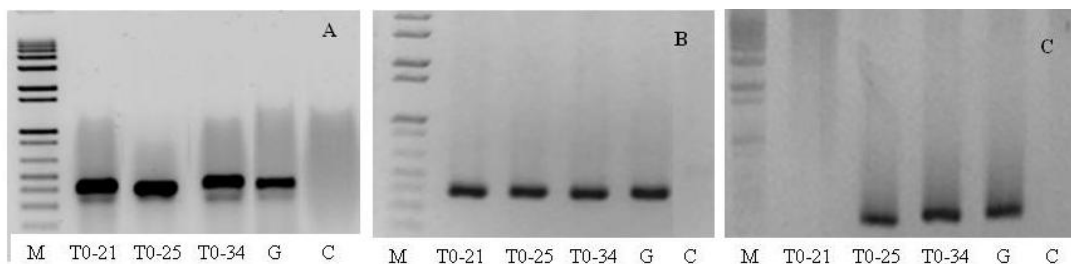


Figure 3. PCR amplicons (0.44 Kb) and PCR-*Southern blot* of putative transgenes derive by *ccc* treatment in four cotton cultivars. C- Negative control (no transformed plant), 1-4: lines derive from BRS Antares, 5-6: lines derive from BRS Cedro, 7-8: lines derive from BRS Araçá, 9-15: lines derive from BRS 293, G: *cryIIa* gene. M- Marcador Ladder Plus (Invitrogen).

All these fragments were purified, sequenced and analyzed in BLAST tools, confirming the presence of Bt-*cryIIa* gene (DQ535488, E value: 3^e^{-63} to 1^e^{-12}) and indicating that *ccc* cassette was introduced onto the plant but the gene integration was not complete. The output

of BLAST search (Figure 4A) and the consensus of alignment of the fifteen sequences were compared to *cryIIa* gene deposited in NCBI bank (Figure 4B).

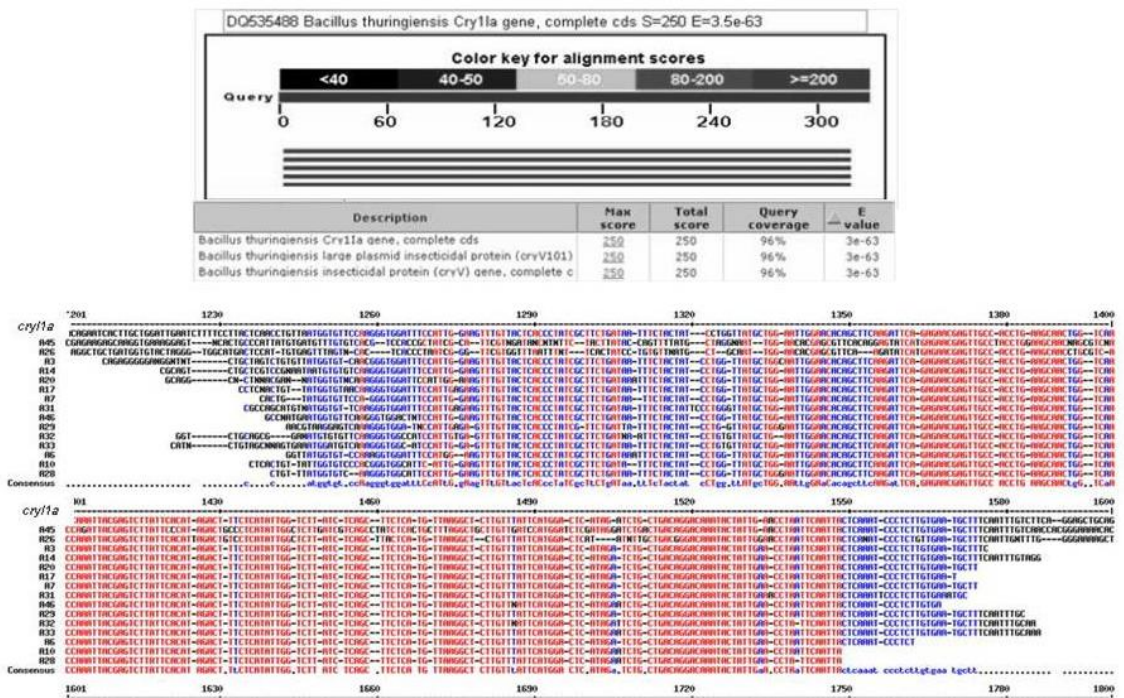


Figure 4. BLAST search in putative transgene (up) and consensus among 15 nucleotide sequences of putative transgene lines and *cryIIa* (DQ535488), by using *MultipleM sequence alignment* program (down). A45 to A14: lines derive from BRS Antares, A20-A17: lines derive from BRS Cedro, A7-31: lines derive from BRS Araçá, A46-A28: lines derive from BRS 293.

In *mlc* treatment (cassette~3 Kb, containing only promoter+open reading frame+terminator, without vector), all lines were directly tested by PCR. Amplicons were seen in only one line derive from BRS Antares, with 2F2R primer combination (Table 1), and in three lines derive from BRS 293, in all combinations (Table 1). Considering that result seen in *mlc*-BRS Antares could possibly be the same situation reported in *ccc* treatment, the further analysis were done just in three lines from BRS 293. These, now named T0-21, T0-25, and T0-34, were evaluated by semiquantitative RT-PCR, using two primer

combination and transcripts were seen in T0-25 and T0-34 (Figure 5), T0-34 had an expression level similar to the constitutive control (β *actin*).

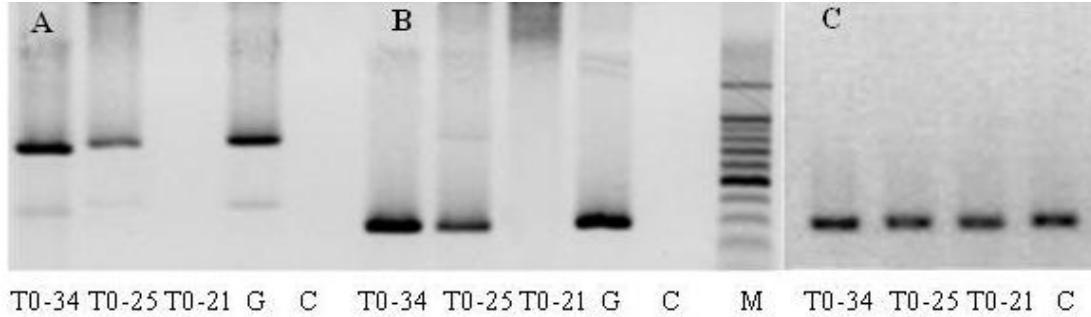


Figure 5. Amplicons obtained by RT-PCR in T0-lines derivate from BRS293, separated by 0.8% agarose gel. Primer combinations to *cryIIa*-CNPA: A: 1F/2R (0.96Kb), B: 2F/2R (0.36 Kb), and to β *actin*: C: BA-F/BA-R (0.33 Kb). M: 1-Kb molecular marker (Ladder Plus, Invitrogen). G: positive control (*cryIIa*-CNPA). C: negative control (non-transformed plant).

Then, a PCR-fragment (0.36 Kb) of both lines were purified and sequenced. Analysis in BLAST confirmed the *cryIIa* gene in nucleotide sequences of these lines, both with high identity with the edited *cryIIa*-CNPA sequence (Figure 6).

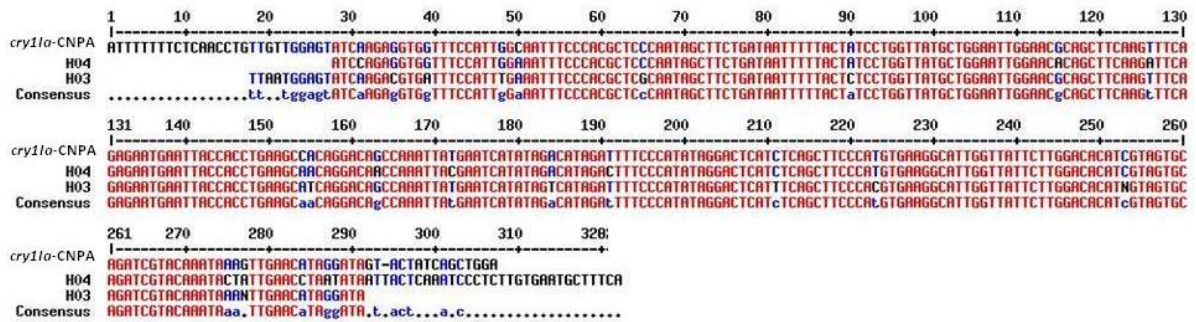


Figure 6. Consensus analysis of nucleotide sequences obtained by using 2F2R primers (0.360 Kb) in T0-25 (H-04) and T0-34 (H-03) putative transgenes, both derivate from BRS 293, and *cryIIa*-CNPA. Analysis was done with *MultipleM sequence alignment* program.

The full gene integration was analyzed by genomic-Southern blot. DNA of T0-25 and T0-34 lines were *Bam*HI-digested and hybridized using a specific *cryIIa*-CNPA probe (0.96 Kb). A hybridization signal at ~6.0 kb was seen only in T0-34 line (Figure 7), indicating that complete gene construction was successfully introduced.

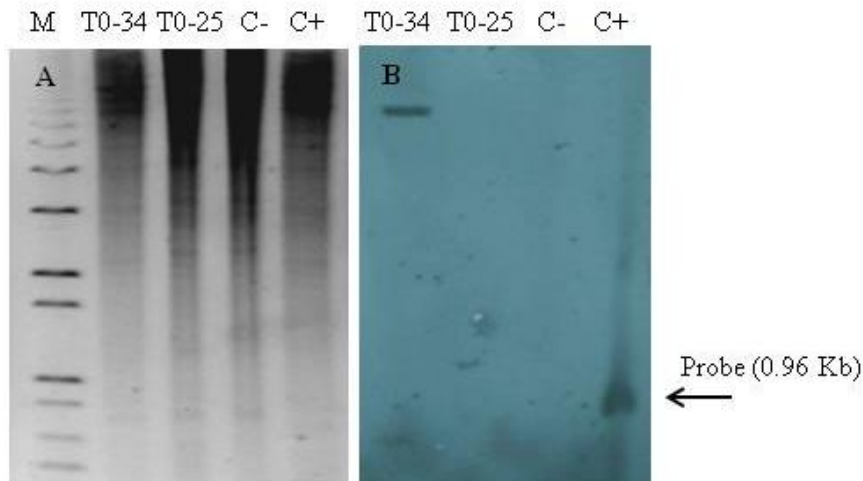


Figure 7. Southern blot hybridization analysis of genomic DNA extracted from leaves of two transgenic cotton lines and non-transformed plant (BRS 293). A- DNA digested with *Hind*III and B- blot exposition in X-ray. C+: Positive control (0.93 Kb probe, 1 ng/ μ L), C-: Negative control (BRS 293). M: 1-Kb molecular marker (Ladder Plus, Invitrogen).

Descendant analysis of T1-lines

Twenty self-fertilized transgenic plants, all descendants from T0-34, were screened by PCR analysis for presence of the *cryIIa* gene. Seventeen plants transferred the gene to the T1 generation (Figure 8), exhibiting a segregating ratio consistent with a Mendelian fashion (3:1; $\chi^2 = 0.67$, $P = 3.84$, $df = 1$), and indicating integration of the transgene at a single locus. In greenhouse, all plants were phenotypically normal with fertile flowers and seed production similar to BRS 293 (non-transformed plant). No pleiotropic effect was verified in plants during phonological cycle.

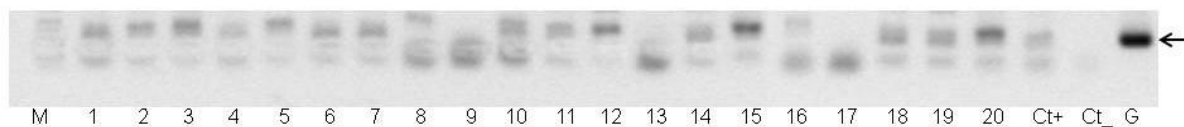


Figure 8. Amplicons obtained by PCR in T1 lines separated by 08% agarose gel. 1 -21: T1 lines descendant from T0-34. G: *cryIIa* probe (0.96 Kb), C-: negative control (BRS 293). M: 1-Kb molecular marker (Ladder plus, Invitrogen).

Discussion

In this study, we developed and analyzed transgenic cotton plants expressing a *cryIIa* gene by using two different gene constructs, introduced by ovary-drip microinjection. The stable genomic integration, inheritance, and expression of the transgenes were confirmed by PCR, Southern blot, and RT-PCR analyses.

The technique of microinjection is a direct method that does not require the step of plant regeneration. The frequency of transformation in four Brazilian cotton cultivars seemed to be genotype-dependent, with the highest success rate in BRS 296, and the lowest in BRS Araçá and BRS Cedro. As reported in other transformation techniques, the difficult integration of large cassettes occurs in microinjection, and that limitation to reduces the rate of success.

Among 2,630 lines that were tested, 18 lines were putatively transformed (15 in *ccc* treatment and three in *mlc*). However, only one line had *cryIIa* effectively integrated in plant genome.

Although the *ccc* treatment resulted proportionally in a greater number of putative transgenes, the introduction of larger cassettes in the ovary, following the path along with the pollen tube growth, possibly makes it more exposed to the action of endogenous components which can change, in any site, their size or composition. According to Vidal et al (2006), during the process of transgene integration into the plant genome, it is likely to occur losses in

DNA sequences at 5' and 3' ends of the cassette, with the subsequent loss of diagnostic fragments. Additionally, it is known that several plants have high heterochromatin in the genome, and this portion has the property of silencing genes because it is a highly methylated region and can lock the gene expression. Thus, a transgene will not work if it was transversely transferred and located in the heterochromatic region. Those statements perhaps justifies the results seen in Table 1, as just smaller fragments (0.44 Kb) were seen in putative lines, although they were positive to hygromycin assays. In biolistics procedures, Rech et al (2008) reported that, although stable gene integration has been achieved in cotton, some putative transgenic lines have shown only transformation of the epidermal cortex cell layer of the plant and most of the progeny did not inherit the transgene.

Most commercial GM crops have larger cassettes composed of open read frame linked to expression vectors. Artelt et al. (1991) reported that the presence of backbone sequences in the plant genome may promote transgene rearrangement and exert endogenous gene expression. The use of large cassettes containing expression vectors has advantages in the selection procedures of the putative transgenes due to possibility of using selective agents in large scale assays, such as hygromycin, in vectors containing *hptII* gene. However, the presence of genes for antibiotic resistance in transgenic plants has been widely discussed in aspect of biosafety. According to Zhao et al (2007), a desirable construction may contain as little foreign DNA as possible.

GM plants containing minimal linear cassettes with vector backbone-free have been reported in several crops. In soybean, Vianna et al (2011) achieved a rate of 0.8% in using microparticle bombardment, while Gao et al (2007) reported 13% by pollen-tube pathway. In maize, Yang et al (2009b) achieved rate of 6.5% by ovary-drip. In cotton, GM cultivars have been developed by *Agrobacterium* or biolist procedures, the majority derivate from cv. Coker or Coker-derived, containing vector backbones (Chaudhary et al, 2003; Sunilkumar and

Rathore, 2001; Finer and McMullen, 1990). To our knowledge, no report of transformation by ovary-drip microinjection using minimal cassette has been reported. The cultivar BRS 296 was better suited to this methodology, showing a transformation rate next to 0.4%, based on the total number of putative transgenes tested (257), and the positive signal seen in integration assay via Southern blot (Figure 7). Aragão et al (2005) achieved rates between 0.45% to 0.71% by biolistic procedures in Brazilian cultivars.

Considering that cotton is known to be recalcitrant to various steps involved in plant transformation and regeneration (Kumar et al, 2004), this technique is suggested as a viable option to obtain transgenic plants in addition to the current available methodologies. However, the most important aspect seen in this work is that the line obtained, T0-34, represents an excellent genetic resource for incorporation in cotton genetic improvement because it contains a *cryIIa* gene previously identified as highly toxic against boll weevil and fall armyworm (Martins et al, 2009). The progress in selection procedures made in their T1-descendant lines, can result in the identification of promising materials, with large perspective to contribute to protection of cotton plants against these target insects.

Acknowledgments

To Fundação de Incentivo a Cultura de Algodão em Goiás (FIALGO) and *Banco do Nordeste do Brasil* (BNB) for funding the study; to Marc Giband (Centre de Cooperation en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD), Wagner Lucena (Embrapa Algodão), and Igor Luiz Vieira de Lima Santos (Universidade Federal de Campina Grande, UFCG), for scientific support.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest between the partners with the dissemination of

results.

References

Aragão FJL, Vianna GR, Carvalheira SBRC, Rech, EL (2005). Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Science* 168: 1227–1233.

Doi:10.1016/j.plantsci.2004.12.024

Artelt P, Grannemann R, Stocking C, Friel J, Bartsch J, Hauser H (1991). The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene* 99: 249-254. Doi:10.1016/0378-1119(91)90134-W

Chaudhary B, Kumar S, Prasad KVSK, Oinam GS, Burma PK, Pental D (2003). Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). *Plant Cell Rep* 21: 955–960.

Doi:10.1007/s00299-003-0613-x

Deguine JP, Ferron P, Russell D (2008). Sustainable pest management for cotton production.

Agron Sustain Dev 28: 113–137. Doi:10.1051/agro:2007042

Finer JJ, McMullen MD (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep*, 8: 586-589. Doi:10.1007/BF00270059

Gao XR, Wang GK, Su Q, Wang Y, An LJ (2007). Phytase expression in transgenic soybeans: stable transformation with a vector-less construct. *Biotechnol Lett* 29: 1781-1787.

Doi:10.1007/s10529-007-9439-x

Gould JH, Magallanes-Cedeno MM (1998). Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol Biol Rep* 16:1-10.

Doi:10.1023/A:1007438104369

Haney PB, Lewis WJ, Lambert WR (2012). Cotton production and boll weevil in Georgia: History, cost of control and benefits and eradication. The University of Georgia CAES n. 428, 60p. http://extension.uga.edu/publications/files/pdf/RB%20428_2.PDF

IBGE. 2014.

[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201407_2.shtm].

Accessed 17 September 2014.

James C (2013): Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: *ISAAA Brief*, n.46

[<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/>]. Accessed 10

September 2014.

Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol* 56: 203–216. Doi:10.1007/s11103-004-2907-y

Lima Junior IS, Degrande PE, Miranda JE, Santos JW (2013). Evaluation of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) suppression program in the state of Goiás, Brazil. *Neotrop Entomol* 42: 82-88. Doi:10.1007/s13744-012-0083-3

Liu J, Su Q, An L, Yang A (2009). Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free smGFP cassette into soybean via ovary-drip transformation. *Biotechnol Lett* 31: 295-303.

Doi:10.1007/s10529-008-9851-x

Luo ZX, Wu R (1989). A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway. *Plant Mol Biol Rep* 7: 69-77. Doi:10.1007/BF02669248

Martins ES, Aguiar RWDS, Martins NF, Melatti VM, Falcão R, Gomes ACMM, Ribeiro BM, Monnerat RG (2009). Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis Boheman*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J Appl Microb* 104: 1363–1371. Doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03665.x

Morello CL, Pedrosa MB, Suassuna ND, Lamas FM, Chitarra LG, Silva Filho JL, Andrade, FP, Barroso PAV, Ribeiro JL, Godinho VPC, Lanza, MA (2012). BRS 336: A high-quality fiber upland cotton cultivar for Brazilian savanna and semi-arid conditions. *Crop Breed Appl Biotechnol* 12: 92-95. Doi:10.1590/S1984-70332012000100012

Morello CL, Suassuna ND, Farias FJC, Lamas FM, Silva Filho JL, Pedrosa MB, Ribeiro JL, Godinho VP, Freire EC (2010). *BRS 293: A midseason high-yielding upland cotton cultivar for Brazilian savanna*. *Crop Breed Appl Biotechnol* 10: 180-182. Doi:10.12702/1984-7033.v10n02c03

Rajasekaran K, Hudspeth RL, Cary JW, Anderson DM, Jacks TJ, Stromberg K, Cleveland TE (2000). High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 19: 539-545.

Doi:10.1007/s002990050770

Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3: 410-418.

Doi:10.1038/nprot.2008.9.

Romano A, Raemakers K, Bernardi J, Visser R, Mooibroek H (2003). Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Res*, 12:461–473. Doi:10.1023/A:1024267906219.

Santos RC, Marcellino LH, Monnerat RG, Gander ES (2003). Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. *Pesq Agropec Bras* 38: 1351-1356. Doi:10.1590/S0100-204X2003001100015

Santos RC, Monnerat RG; Sá MFG; Cordeiro CMT, Gomes AC, Gander ES (2002). Cholesterol oxidase interference on the emergence and viability of cotton boll weevil larvae. *Pesq Agropec Bras* 37: 1525-1530. Doi:10.1590/S0100-204X2002001100002

Silva TBM, Siqueira HAA, Oliveira AC, Torres JB, Oliveira JV, Montarroyos PAV, Farias MLDC (2011). Insecticide resistance in Brazilian populations of the cotton leaf worm, *Alabama argillacea*. *Crop Protection* 30: 1156-1161. Doi:10.1016/j.cropro.2011.05.022

Sunilkumar G, Rathore KS (2001). Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Mol Breed* 8: 37-52.

Doi:10.1023/A:1011906701925

Vianna GR, Aragao FJ, Rech EL (2011). A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*). Genet Mol Res 10: 382-390. Doi:10.4238/vol10-1gmr1058

Vidal JR, Kikkert JR, Donzelli BD, Wallace PG, Reisch BI (2006). Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology. Plant Cell Rep 25: 807-814. Doi:10.1007/s00299-006-0132-7

Yang A, Su Q, An L (2009a). Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector- and marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear GFP cassette transformation. Planta 229: 793-801. Doi:10.1007/s00425-008-0871-5

Yang A, Su Q, An L, Liu J, Wu W, Qiu Z (2009b). Detection of vector- and selectable marker-free transgenic maize with a linear GFP cassette transformation via the pollen-tube pathway. J Biotechnol 139: 1-5. Doi:10.1016/j.jbiotec.2008.08.012

Yao Q, Cong L, He G, Chang J, Li K, Yang G (2007). Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency. Mol Biol Rep 34 :61-67. Doi:10.1007/s11033-006-9016-8

Zapata C, Park SH, El-Zik KM, Smith RH (1999). Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and shoot apex. Theor Appl Genet 98: 252-256. Doi:10.1007/s001220051065

Zhao Y, Qian Q, Wang H, Huang D (2007). Hereditary behavior of bar gene cassette is

complex in rice mediated by particle bombardment. *J Genet Genomics* 34: 824-835.

Doi:10.1016/S1673-8527(07)60093-9

Zhou GY, Weng J, Zeng Y, Huang J, Qian S, Liu G (1983). Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods Enzymol* 101: 433–481. Doi:10.1007/978-1-4612-2958-2_54

CAPITULO III

Expressão temporal da proteína Cry1Ac indexada na cultivar de algodão Bollgard I

Manuscrito submetido à Revista Ciência Agronômica

De: Alek Sandro Dutra ccarev@ufc.br

Para: "Dra. Carliane Rebeca Coelho da Silva" <carliane.rebeca@gmail.com>

Assunto: Agradecimento pela Submissão

Dra. Carliane Rebeca Coelho da Silva,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "Expressão temporal da proteína Cry1Ac indexada na cultivar de algodão Bollgard I" para Revista Ciência Agronômica. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/author/submission/4064>

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Alek Sandro Dutra
Revista Ciência Agronômica

Expressão temporal da proteína Cry1Ac indexada na cultivar de algodão Bollgard I
Temporal expression of Cry1Ac protein indexed in Bollgard I cotton cultivate.

RESUMO - Plantas de algodão Bollgard I foram cultivadas em campo com objetivo de estimar a expressão temporal da proteína Cry1Ac durante a fenologia da cultura. Folhas jovens, situadas nos terços superior, médio e inferior da cobertura vegetal foram utilizadas para de análise de imunodeteção via DAS-ELISA. As análises foram realizadas aos 15, 30 , 45, 60, 75 e 90 dias após a germinação. Verificou-se que em todas as folhas, o padrão de expressão foi maior no início do desenvolvimento das plantas, decaindo gradativamente aos 90 dias. A variação no padrão de expressão variou entre 4,5 a 2,0 µg/g, dos 15 a 90 dias de cultivo, sendo estes valores suficientes para controle das lagartas alvo, com segurança.

Palavras chave: *Gossypium*. ELISA. Toxicidade

ABSTRACT - Bollgard cotton plants were grown in field conditions in order to estimate the temporal expression of Cry1Ac protein in leaves during crop phenology. Leaves located in the upper, middle and lower canopy were used for immunodetection analysis via DAS-ELISA. The analysis were performed at 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days after germination. It was found that all leaves showed pattern of expression highest at the beginning of plant development, decreasing gradually at 90 days. The variation in the pattern of expression ranged from 4.5 to 2.0 µg/g, from 15 to 90 days of cycle. These values were sufficient to control safely lepidopteran insects .

Key word: *Gossypium*. ELISA. Toxicity

INTRODUÇÃO

O algodão é uma importante *commodity* mundial, no Brasil essa lavoura traz benefícios socioeconômicos promovendo o crescimento do agronegócio especialmente no Cerrado (JAMES, 2013). Apesar disso esta lavoura tem mais de 40% dos gastos destinados para mecanização e controle de pragas, principalmente, ervas daninhas e insetos (FREIRE, 2007).

Os insetos-praga prejudicam a cotonicultura em vários níveis. Apesar dos possíveis controles, o químico é o mais empregado pelos cotonicultores e sua aplicação é muito onerosa (RAMIRO; FARIA, 2006; FREIRE, 2007). No Brasil gastos com defensivos químicos, especialmente inseticidas, para a cotonicultura são de 27% do total vendido (BARROSO; HOFFMANN, 2007).

Além dos coleópteros, em especial o bicudo (*Anthonomus grandis* Bohem.), os lepidópteros também causam prejuízos consideráveis a agricultura. As atuais cultivares geneticamente modificadas (GM) reduzem os custos no controle dos lepidópteros, contudo, para os coleópteros não existe uma alternativa de controle que elimine os defensivos químicos (JAMES, 2013; PANJEKAR et al., 2003; RAJASEKARAN et al., 2000). O Brasil ocupa o segundo lugar em área cultivada com GM no mundo, com 40,3 milhões de hectares cultivados com milho, soja e algodão, 10% acima da área de 2012 (JAMES, 2013).

Em 2005 a CTNBIO emitiu o parecer técnico nº 513/2005 pela liberação comercial no Brasil da variedade Bollgard I Evento 531 da Monsanto do Brasil LTDA. O algodão Bollgard evento 531 foi geneticamente modificado pela transformação da variedade comercial Coker 312 com o vetor PV – GHBK04, utilizando o sistema mediado por *Agrobacterium*. Isto inseriu os genes *cry1Ac*, *ntpII*, e *aad* no genoma desta variedade contendo o promotor duplicado CAMV35S. A proteína Cry1Ac, de *Bacillus thuringiensis*, forma cristais contendo endotoxinas com ação inseticida sobre lagartas da ordem Lepidoptera.

Segundo a Monsanto (2007), a Bollgard I no Brasil mostrou-se efetiva contra as lagartas

Alabama argillacea, *Heliothis virescens* e *Pectinophora gossypiella*. Existem no mercado cultivares GM de algodão resistentes a lagartas como: a) Bollgard II (Monsanto), com proteínas piramidadas Cry1Ac e Cry2Ab2, resistente a *A. argillacea*, *H. virescens*, *P. gossypiella*, *Chrysodeixis includens*, *Helicoverpa spp.* e *Spodoptera spp.*; b) WideStrike (Dow AgroSciences), liberada em 2009, com proteínas Cry1Ac e Cry1F, resistente a *H. virescens*, *H. zea*, *S. frugiperda*, *A. argillacea*, *P. gossypiella*, *S. exigua*, *S. eridania*, *Pseudoplusia includens* e *Trichoplusia ni*, c) Bt TwinLink (Bayer CropScience), liberada em 2014, com proteínas Cry1Ab e Cry2Ae resistente a *H. virescens*, *P. gossypiella*, *Helicoverpa* e *A. argillacea* li. Em 2015 deve-se liberar a Bollgard III, combinando os genes da Bollgard II com o COT102 (Vip3Aa19) da Syngenta, resistente a *A. argillacea*, *H. virescens*, *P. gossypiella*, *Helicoverpa spp.*, *Spodoptera spp.* e *Trichoplusia ni*.

Para a sustentabilidade dessa tecnologia é importante que a expressão dessas toxinas estejam em quantidades adequadas para proteção eficiente contra as pragas de insetos-alvo principalmente as lagartas. Estudos da cultivar Bollgard II na Austrália e nos Estados Unidos mostraram que a expressão da toxina Cry1Ac foi variável nos tecidos, a expressão da toxina e os níveis de mortalidade diminuem com a idade das plantas (KRANTHI et al, 2005). Os autores informam que a expressão da proteína Cry1Ac nas folhas situadas no terço médio das plantas variou entre 3.48–1.55 mg/g peso fresco aos 58–95 dias, respectivamente.

Neste trabalho objetivou-se estimar o nível crítico de expressão da Cry1Ac em plantas da Bollgard I utilizando o ELISA (enzima linked immunosorbent assay) em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de algodão GM (cv. Bollgard I) foram cultivadas no campo experimental da Embrapa Algodão (Campina Grande, PB , 07 ° 13 '50 " S, 35 ° 52'52 " W , 551 m) , durante a estação chuvosa de 2013 (abril-julho, 536 mm, temperatura diurna média de 28 °C e umidade

relativa do ar de 63%). O solo, classificado de vertissolo de textura franco-argilosa, foi previamente fertilizado de acordo com a recomendação da análise de solo (NPK, 30:60:30, sulfato de amônio, superfostato simples e cloreto de potássio), antes do plantio. As sementes foram semeadas em parcelas (70 m²), com fileiras de 10 m, no espaçamento de 0,70 x 0,20 cm e densidade de dez plantas por metro.

Após 15 dias de emergidas, 30 plantas foram selecionadas ao acaso na parcela para representarem as matrizes de coleta de tecidos foliares para os testes de imunodeteção via ELISA. Folhas situadas nos terços superior, médio e inferior da copa das plantas foram coletadas para extração de proteínas e posterior ensaios de expressão da proteína Cry1Ac, seguindo protocolo descrito em Aragão (1998). As coletas foram feitas quinzenalmente até os 90 dias de cultivo.

A concentração proteica no sobrenadante foi determinada usando o método de Bradford (1976). Para quantificação da expressão da proteína Cry1Ac, os ensaios de ELISA foram realizados em placas (96 poços), adicionando-se 100 µL do extrato proteico (20 ng/µL) em cada poço, com incubação a 4 °C por 12 horas. Posteriormente retirou-se o extrato proteico e procederam-se três lavagens (3 min) com tampão PBS-Tween 20. Em seguida foi adicionado 100 µL do anticorpo primário diluído 1:10000 em PBS-Tween 20 e a placa foi incubada a 4 °C por 3 horas, seguida de nova lavagem com PBS-Tween 20. A seguir, adicionou-se 100 µL do anticorpo secundário (AP Goat anti-rabbit IgG - Invitrogen) diluído 1:1000 em PBS 1x, com incubação a 4 °C por 3 horas. Depois de lavagem com o mesmo tampão, foi adicionado 100 µL do substrato P-nitrophenil-phosphatase disodium (Sigma) na concentração de 1 µg/ml diluído em tampão dietanolamina 10% (Merck). A reação foi interrompida após 20 minutos, com adição de 100 µl de NaOH 3N. A leitura dos dados foi feita no equipamento Elisa Reader (Thermo Plate) em comprimento de onda de 405 nm. As análises foram realizadas aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, onde utilizou-se uma curva padrão feita com diluições da proteína

específica para estimar a concentração. Após compatibilização, os dados foram submetidos à análise por meio de parâmetros descritivos (média, desvio padrão e coeficiente de variação).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão da proteína Cry1Ac expressa ao longo dos 90 dias da cultivar Bollgard I, situadas nos terços inferior, médio e superior das folhas encontra-se na Figura 1. Verificou-se que em todas as folhas, o padrão de expressão foi maior no início do desenvolvimento das plantas, decaindo a partir de 45 dias, de tal forma que, aos 90 dias a expressão da toxina foi reduzida em, praticamente, 50%.

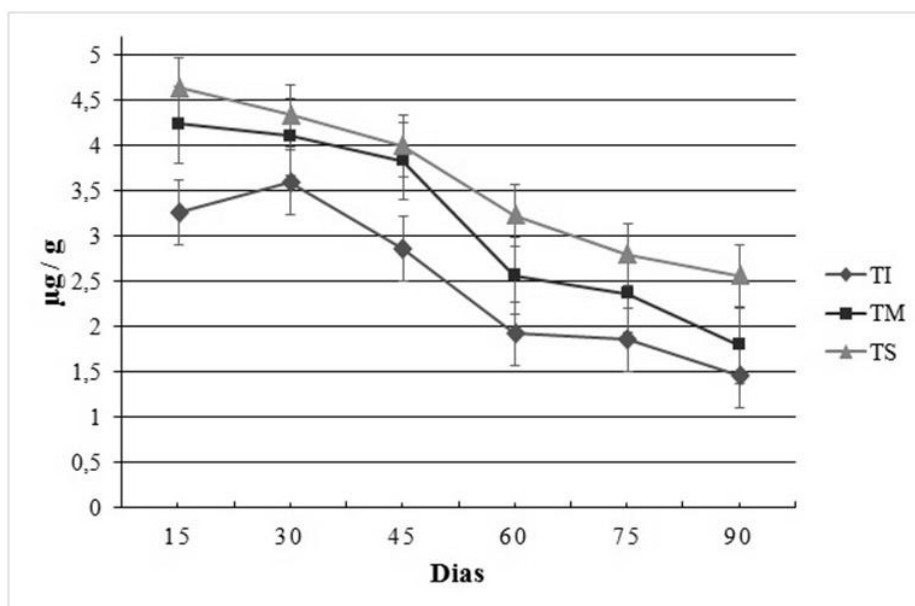


Figura 1. Expressão temporal da proteína Cry1Ac ($\mu\text{g/g}$ de tecido fresco) via DAS-ELISA em folhas de algodão, situadas no terço superior (\blacktriangle TS), terço médio(\blacksquare TM) e terço inferior (\blacklozenge TI) das plantas da cv. Bollgard I, em diferentes fases fenológicas. Dados baseados na média de três repetições de leitura da proteína no ELISA Reader, obtidas nas 30 plantas selecionadas ao acaso.

Nas folhas situadas no terço superior a expressão é mais elevada, embora muito próxima das situadas no terço médio. Esse resultado é expressivo porque as folhas do topo da planta se constituem no principal foco de alimentação de lagartas desfolhadoras e é onde a expressão de

uma proteína tóxica deve ser mais elevada (Perlak, 2001). Torres et al (2009) reportam que a variação na produção pode ocorrer com a idade e tecido da planta, com a variedade transformada e com condições edafoclimáticas onde o manejo está sendo procedido. O ideal é que essa variação no padrão de expressão da proteína não sofra grandes flutuações para não comprometer o desempenho do controle das pragas-alvo.

Kranthi et al. (2005) analisaram oito híbridos oriundo da cultivar Bollgard I e verificaram expressão diferenciada em função dos tecidos, da fenologia da cultura e também dos eventos testados. Segundo os autores a expressão da proteína Cry1Ac foi maior nas folhas e menor nos botões florais, anteras e ovário, condizendo com o tipo de promotor utilizado no comando do gene, o CaMV 35S, que tem expressão constitutiva, porém menor expressão em estruturas florais (WILKINSON et al, 1997; BENFEY and CHUA, 1989). Nas folhas a expressão foi maior aos 30 dias; a partir dos 60 dias o percentual de expressão caiu em torno de 39%.

Na avaliação de segurança da cultivar Bollgard I feita em 2002 pela empresa Monsanto, nos EUA, os testes mostraram que a expressão da proteína Cry1Ac variou de 1 a 9 $\mu\text{g/g}$ de tecido de fresco. Na Índia, Kranthi et al. (2005) reportaram valores médios de 5,5 a 0,05 $\mu\text{g/g}$, dos 30 a 148 dias de cultivo. De acordo com esses autores, o nível crítico de expressão é 1.9 mg/g, abaixo do qual há elevado risco de sobrevivência das larvas. Neste trabalho, a variação da proteína Cry1Ac nas folhas ocorreu entre 4,5 a 2,0 $\mu\text{g/g}$, no período de 15 a 90 dias de cultivo, estando de acordo com o encontrado na literatura.

Apesar das variações que a concentração das proteínas Cry podem sofrer em função do manejo ou condições ambientais, o importante é que a quantidade produzida seja suficiente para assegurar o controle das pragas alvo, sem risco de prejuízo na produção da lavoura.

CONCLUSÃO

A expressão da proteína Cry1Ac é maior no início do desenvolvimento das folhas,

decaindo gradativamente aos 90 dias. As folhas situadas no terço superior apresentam maior concentração de proteínas, cujos valores são suficientes para proteger as plantas contra as lagartas alvo.

AGRADECIMENTOS

A FINEP e ao BNB pelo suporte financeiro e a Capes pela concessão das bolsas de Pós-Graduação.

REFERÊNCIAS

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 - Cenargen, Brasília, p.239-249, 1998.

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.

BENFEY, P. N.; REN, L.; CHUA, N-H. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. **EMBO Journal**, v. 8, n. 8, p. 2195-202,1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing 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.

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

JAMES C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: **ISAAA Brief**, n.46 Disponível em:< <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/>>.

Acesso em 10 de 2014

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* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). **Current Science**, v. 89, n. 2, p. 291-298, 2005.

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

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.

PERLAK, F. J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRIG, R. A.; ROBERTS, J. K. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today's reality. **The Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 489-501, 2001.

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, n. 6, 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. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 119-121, 2006.

TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; WHITEHOUSE, M. Transgenic cotton for sustainable pest management: a review. In: Lichtfouse, E. (Org.). **Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants: sustainable agriculture reviews**. Dordrecht: Springer, v. 1, p. 15-54, 2009.

WILKINSON, J.E.; TWELL, D.; LINDSEY, K. Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.2, p.265-275, 1997.

CAPITULO IV

Toxicidade e imunodeteccção de eventos de algodão-cryIIa resistentes ao bicudo do algodoeiro e a lagarta militar.

Manuscrito a ser submetido à Genetic and Molecular Research

Toxicidade e imunodeteccção de eventos de algodão-cry1Ia resistentes ao bicudo do algodoeiro e a lagarta militar

Rose Monnerat¹, Carliane Rebeca Coelho da Silva², Érica Soares Martins¹, Liziane Maria de Lima³, Péricles Albuquerque Melo Filho¹, Roseane Cavalcanti dos Santos³

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Rural, 70770-700, Brasília-DF, Brasil, CEP: 700990-700, E-mail: rose.monnerat@embrapa.br, ericamartins@imamt.com.br,

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil, E-mail: carliane.rebeca@gmail.com, pericles@depa.ufrpe.br, morgannapollynne@yahoo.com.br,

³Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143, Centenário, Campina Grande-PB, Brasil, CEP: 58428-095; Campina Grande-PB, Brasil, E-mail: liziane.lima@embrapa.br, roseane.santos@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 imunodeteccção via *ELISA*. Folhas jovens, coletadas em 48 eventos T0 a partir dos 45 dias 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 apresentaram taxa de mortalidade acima de 60%, destacando-se 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.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, controle de pragas, transformação, microinjeccção,

Abstract – Toxicity and the temporal expression of Cry1Ia 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, T0-49 BRS 293, BRS 293 T0-56, BRS 293 T0-57, BRS 293 and 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.

Key words: *Gossypium hirsutum*, insect control, transformation, microinjection

Introdução

O algodão é uma das principais matérias prima da indústria têxtil, que movimenta milhões de dólares anualmente com a fabricação de tecidos, fibras e fios. Trata-se de uma fibra natural, cultivada mundialmente e de grande valor no mercado das *commodities*. 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, 2013). A produtividade de fibras, atualmente superior a 3 t.ha⁻¹, é resultante da adoção de manejos altamente tecnificados, com maquinários eficientes para as práticas culturais e cultivares melhoradas, de larga adaptação ambiental e tolerância a vários patógenos.

O custo de produção, contudo, é um dos mais onerosos, especialmente devido aos gastos com insumos químicos para defesa de plantas contra insetos 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 em qualquer fase de desenvolvimento da cultura. Os níveis de danos são variados porque dependem da época de ocorrência e grau de infestação. A perspectiva de controle de pragas por meio de variedades resistentes por meio do melhoramento convencional é bastante limitada em função da complexidade dos fatores genéticos que condicionam a resistência. 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.

As cultivares GM atualmente disponíveis no mercado tem fornecido grande contribuição aos agricultores para redução dos custos no manejo, contudo, a abrangência é limitada apenas a lepidópteros (GREENPLATE, 1999; RAJASEKARAN et al., 2000; PANJEKAR et al., 2003; KRANTHI et al., 2005).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) vem desenvolvendo pesquisas neste segmento desde a década de 90, prospectando moléculas com propriedades inseticidas para posterior introdução em plantas de algodão, com maior enfoque para o bicudo do algodoeiro, uma das pragas mais danosas à lavoura (NAKASU et al., 2010; De DEUS et al., 2010; GROSSI DE 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 militar (*Spodoptera frugiperda*), com DL_{50} de 21 $\mu\text{g/mL}$ e 0,29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (MARTINS et al., 2008). A sequência deste gene foi editada pela equipe de Biotecnologia da Embrapa Algodão, baseando-se nos *codon usages* de *Gossypium hirsutum*, e posteriormente introduzida na cultivar BRS 293 por microinjeção via *ovary drip*. A construção foi constituída de um duplo promotor (CaMV 35S), a sequência codante (2.7 Kb) e o terminador *nos*.

O objetivo desse trabalho foi estimar a toxicidade de eventos transgenes T0, contra lagarta militar e bicudo do algodoeiro e ainda a expressão dos transgenes por meio de ELISA. Adicionalmente foi procedido ensaios de imunodeteção em larvas de bicudo, utilizando-se anticorpo marcado com biotina para detecção da proteína no trato intestinal do inseto.

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 sequência editada do gene. Deste total, 43 eventos confirmaram uma banda esperada de 360 pb, sendo estes utilizados para os trabalhos com bioensaios de toxicidade e imunodeteção.

Ensaio de toxicidade contra *Spodoptera frugiperda*

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB. Folhas frescas, situadas no terço superior de cada planta 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 uma larva de segundo instar da lagarta militar. 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. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com 5 repetições. 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 DAS-ELISA

Proteínas totais de folhas situadas no terço inferior das plantas, aos 65 dias, foram extraídas seguindo protocolo de Aragão, (1998). A concentração proteica no extrato bruto foi determinada usando o método de Bradford (1976). Para o ensaio de DAS-ELISA, utilizou-se microplaca (96 poços) sensibilizada com 100 µL/poço de anticorpo primário da proteína Cry1Ia (1:1000) diluído em PBS 1x e incubado a 37°C por 4 h. Após este período, a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween20 e bloqueada com 250 µL de PBS-BSA 3%, por 4 h a 37°C. A seguir, adicionou-se em cada poço 100 µL de extrato protéico de folha, incubando-se a placa a 4°C/12 horas. Após lavagens das placas, acrescentou-se 100 µL/poço de IgG anti-cry marcado com biotina (1:100) e diluído em PBS 1x. A placa foi incubada a 4°C/2 h e após lavagem, foi adicionado 100 µL/poço de Anti-biotina marcada com fosfatase alcalina (Sigma-Aldriche) e incubada a 4 °C/2 h.

Como última etapa, foi adicionado 100µl/poço do substrato PNPP (Sigma) na concentração de 1 µg/ml diluído em tampão dietanolamina (Merck) 10%. A reação foi interrompida após 20 minutos, com adição de 100 µl/poço de NaOH 3N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo Plate), a 405 nm.

Os tratamentos utilizados foram: BRS 293 (controle negativo), Bollgard I (controle positivo), e os 43 eventos T0 pre-selecionados via PCR. Os ensaios tiveram 5 repetições. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ensaio de imunodeteção em células epiteliais do intestino médio de bicudo do algodoeiro

Larvas neonatas do bicudo foram alimentadas com dieta artificial contendo 50 mg/mL de botões florais liofilizados, coletados das plantas T0 de algodoeiro, seguindo metodologia descrita em Monnerat et al., (1999). Em cada placa (15 mm x 20 mm) contendo dieta solida, deixou-se 5 larvas. As placas foram incubadas em câmara de incubação com fotofase de 14/10h e 27°C. Para os ensaios de imunodeteção, as larvas foram dissecadas para coleta do intestino médio os quais foram fixados em tampão cacodilato de sódio a 0,1% (p/v), pH 7,3 a 4°C, contendo 2,5% de glutaraldeído (v / v), 5% sacarose, 5 mM de CaCl₂ e 5% , durante 16 h. Após a fixação, os tecidos foram lavados 4 vezes em tampão fosfato (PBS 1X) por 20

minutos, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%), durante 20 min, e embebidos em parafina (Thorpe, 1999; Fournier e Escaig-Haye, 1999). A infiltração foi realizada com sucessivas trocas de parafina a cada 16 h (2 xilol: 1 de parafina, xileno 1: 1 de parafina, xileno 1: 2 e parafina pura [2 x]). Após a última troca, as amostras foram embebidas para posteriores cortes (10 mM) usando micrótomo automático.

A marcação das amostras para microscopia de luz foi realizado por secções deparafinização em banhos seriados de xileno/etanol, seguido de bloqueio em Tp PBS contendo 1% BSA (p/v) durante 1 h a 25°C e posterior incubação a 25°C/1h em uma solução contendo CryIIa-biotinilado (30 nM). As secções foram lavadas três x em PBS durante 30 segundos para remover a proteína não marcada, e, em seguida, incubadas em Tp PBS contendo avidin-conjugated horseradish peroxidase, durante 1 h a 25°C. Finalmente, os cortes foram lavados 3 x com água ultra-pura por 30s e tratados com tetramethylbenzidine, seguindo as instruções do fabricante, para análise das lâminas ao microscópio óptico (Leica).

Resultados e Discussão

Quarenta e três eventos T0 derivados da BRS 293 foram analisados em ensaios de toxicidade e de expressão da proteína via ELISA. A análise de variância para os dados obtidos nos ensaios de toxicidade contra *S. frugiperda* encontra-se na Tabela 1. Verificou-se diferença estatística altamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$). A média das taxas de mortalidade encontra-se na Figura 1. Entre os 43 eventos testados, apenas quatro, T0-34, T0-49, T0-56 e T0-57, apresentaram taxa de mortalidade acima de 60%, com destaque para a BRS T0-34, com média de 89%.

Tabela 1. Análise de variância para toxicidade da proteína CryIIa 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				

** Sgnificativo a 1%

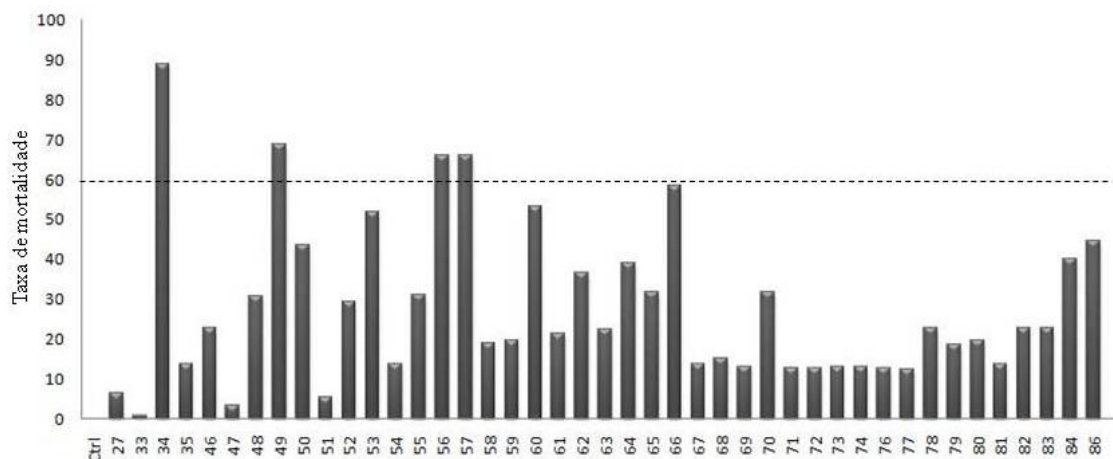


Figura 1. Taxa de mortalidade de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas completamente expandidas, situadas no terço superior das plantas T0 de algodão, aos 45 dias. Médias corrigidas em função do controle (5%). Ctrl: planta não transformada (BRS 293).

No ensaio de ELISA, verificou-se que apenas T0-34 apresentou concentração da proteína CryIIa acima de 1,6 µg/g de tecido fresco, com média de 1,8 µg/g (Figura 2).

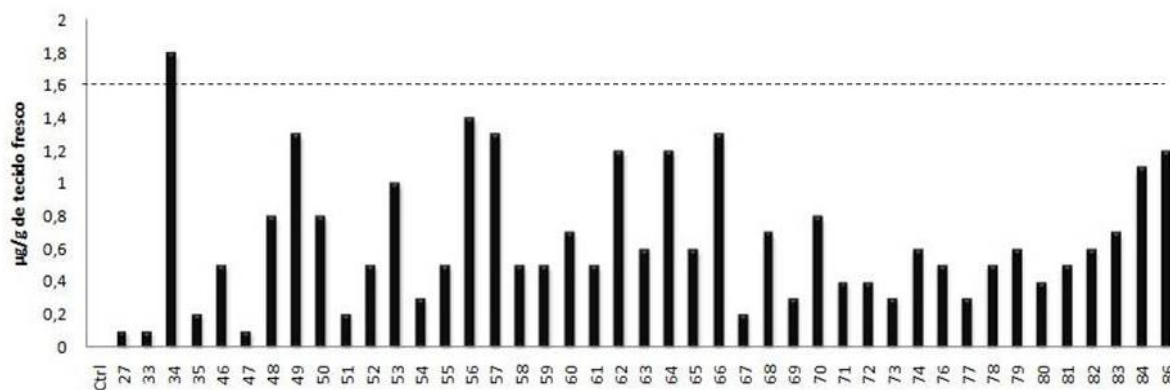


Figura 2. Concentração da proteína CryIIa em folhas situadas no terço inferior das plantas T0, aos 65 dias. Médias corrigidas em função do controle (0,6 µg/g). Ctrl: Ctrl: planta não transformada (BRS 293).

Como o evento T0-34 foi o que se destacou nos ensaios de toxicidade e de expressão, ele foi utilizado para o ensaio de imunodeteção da proteína cryIIa no intestino médio de larvas de bicudo. As larvas foram alimentadas com botões florais liofilizados e adicionados a dieta artificial. Conforme pode ser visualizado na Figura 3, houve ligação da proteína CryIIa presente nos botões florais da planta T0-34 com o anticorpo anti-CryIIa biotilado, utilizado na reação. Nenhuma marcação foi observada nas células epiteliais a partir de controles

negativos (Figura 3A e B).

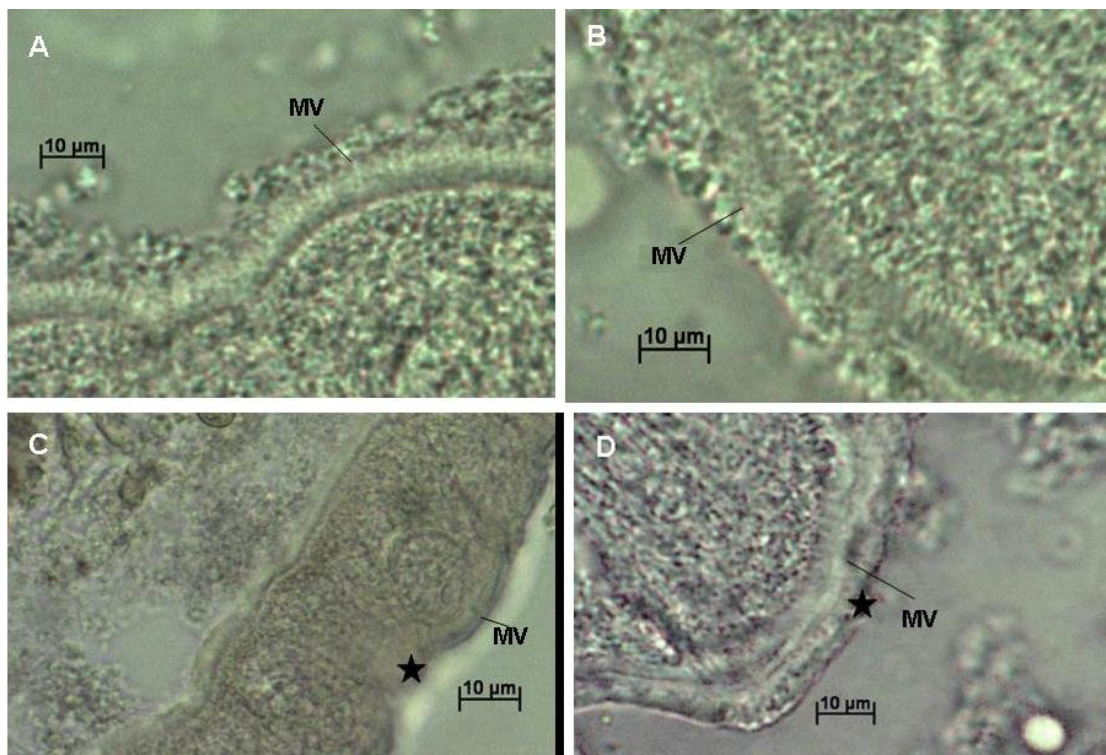


Figura 3. Secções do intestino de *A. grandis* exposto a dieta com adição de botão floral da planta T0-34 visualizadas em microscopia de luz. Reação de conjugação com anti-corpo anti Cry1Ia biotilado, revelado com avidina conjugada a fosfatase alcalina e com NBT/BCIP. A- Controle 1: intestino de larvas alimentadas apenas com dieta artificial (100x); B- Controle 2: intestino de larvas alimentadas com dieta artificial acrescida de botão floral liofilizado (50 mg/mL) de BRS293 (100x); C (40x) e D (100x)- Intestino de larvas alimentadas com dieta artificial acrescida de 50 mg/mL de botão floral liofilizado de planta T0-34; As setas indicam as microvilosidades (MV).

Com base nos resultados de alimentação conduzidos neste estudo, onde se verificou alta taxa de mortalidade para a lagarta militar, constata-se que a concentração da proteína expressa na planta T0-34 é suficiente para provocar toxicidade nesse lepidoptero e ainda ao bicudo do algodoeiro, pelos resultados visualizados na imunodeteção, onde foi possível confirmar a ligação de Cry1Ia aos receptores intestinais das larvas do inseto. Esses resultados corroboram com os achados de Martins et al. (2008), que demonstraram efeitos deletérios no intestino médio de *A. grandis* após a ingestão da proteína Cry1Ia. Sabe-se que quando a proteína Cry é ingerida pelos insetos, ela é ativada no lúmen intestinal por meio da ação das proteases, liberando um péptido tóxico capaz de se ligar a receptores específicos que formam

poros iônicos na membrana das células epiteliais, induzindo morte celular e morte no inseto suscetível (Greenplate, 1999; Soberón et al, 2010).

O evento T0-34 é um transgene altamente promissor porque demonstra habilidade para controlar duas pragas danosas a lavoura algodoeira. Convém investir esforços nos ensaios agronomicos desse material de modo a avaliar se a introdução do gene *cryIIa* promoveu algum efeito pleiotropico. O avanço das pesquisas com esse evento pode contribuir na identificação de linhagens de elites para posterior uso no controle de pragas ou como genitor nos trabalhos de melhoramento genético do algodão.

Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro concedido pela FINEP e pelo Banco do Nordeste do Brasil e a CAPES pela concessão das bolsas.

Referências

Abbott, WS (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*, v. 18, p. 265-267.

Aragão FJL, Ribeiro SG (1998). 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.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, p.248-254.

De Deus Barbosa AEA, Fragoso RR, Lima e Souza DS, Freire É, et al. (2009) . Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. *Plant Sci*, p. 492-497.

Fournier JG and Escaig-Haye F (1999). In situ molecular hybridization techniques for ultra-thin sections. In: Hajibagheri MA, editor. *Electron microscopy methods and protocols*. Methods in molecular biology. Totawa, NJ: Humana Press, p. 167–182.

Franco OL, Santos RC, Batista JAN, Mendes ACM, et al. (2003). Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus*

grandis. *Phytochem*, v. 63, p. 343-349.

Franco OL, Dias SS, Melo FR, Oliveira Neto OB, et al. (2004). Effects of Soybean Kunits trypsin Inhibitors on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochem*, v. 65, n. 1, p. 81-89.

Freire EC (2007). Algodão no cerrado do Brasil. Brasília, D.F.: ABRAPA, 918 p.

Gomes AD, Dias SC, Bloch JRC, Melo FR, et al. (2005). Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds.. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochem Mol Biol*, v. 140, n. 2, p. 313-319.

Greenplate J (1999). Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. *J Econ Entomol*, v. 92, p. 1377–1383.

Grossi-De-Sa MF, Quezado M, Silva, MS, Dias SC et al. (2007). Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Toxicol*, v. 40, p. 773-782.

IBGE, 2014. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/>
Acesso em 26 de julho de 2014

Kranthi KR, Naidu S, Dhawad CS, Tatwawadi A, Mate K, et al. (2005). 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.

Martins ÉS, Aguiar RWDS, Martins NF, Melatti VM, Falcão R, et al. (2008) Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J Appl Microbiol*, v.104, p.1363–1371.

Monnerat RG, Dias SR, Grossi-De-Sa MFG (1999). Dieta artificial para criação do bicudo do algodoeiro em laboratório. *Rev Bras Entomol*, São Paulo, v.5, p.36-40.

Nakasu EY, Firmino AAP, Dias SC, Rocha TL, Ramos HB, et al. (2010). Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J Invertebr Pathol*, v. 104, p. 227-230.

Panjekar PK, Patankar A, Gupta V, Bhatnagar R, Bentur J, Kumar PA (2003). Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Current Sci*, v.84, p.321-329.

Rajasekaran K, Hudspeth RL, Cary JW, Anderson DM (2000). 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.

Ramiro ZA e Faria AM (2006). Levantamento de insetos predadores nos cultivares de algodão Bollgard DP90 e convencional Delta Pine Acala 90. *Arq Inst Biol*, v.73, p.119-121.

Silva SB, Silvawerneck JO, Falcão R, Oliveira Neto OB, Grossi-De-Sa MF, et al. (2004). Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. *J App Entomol*, v. 128, p. 102-107.

Soberón M, Pardo L, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Gómez I, Porta H, Bravo A. Pore formation by Cry toxins. *Adv Exp Med Biol*, v.677, p.127-42, 2010.

Thorpe, J.R. The application of LR Gold resin for immunogold labeling. In HAJIBAGHERI, M.A. ed. *Electron Microscopy Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology Series*. v. 117, p.99–110, 1999.

ANEXOS

PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page: The title page should include: The name(s) of the author(s); A concise and informative title; The affiliation(s) and address(es) of the author(s); The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract: Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords: Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT FORMATTING:

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect

of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed

at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors

and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer

publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Edanz English editing for scientists

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

OFFPRINTS

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition: Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" before the References when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to

imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here: The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in

color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Atenção: As normas da Revista Ciência Agronômica podem sofrer alterações, portanto não deixe de consultá-las antes de fazer a submissão de um artigo. Elas são válidas para todos os trabalhos submetidos neste periódico. Um modelo de artigo pode ser visto em “MODELO ARTIGO” no endereço <http://www.ccarevista.ufc.br>.

1. Política Editorial

A Revista Ciência Agronômica destina-se à publicação de **artigos científicos, artigos técnicos e notas científicas que sejam originais e que não foram publicados (as) ou submetidos (as) a outro periódico, inerentes às áreas de Ciências Agrárias e Recursos Naturais**. A RCA também aceita e incentiva submissões de artigos redigidos em Inglês e em Espanhol. Em caso de autores não nativos destas línguas, **o artigo deverá ser editado por uma empresa prestadora deste serviço** e o comprovante enviado para a sede da RCA no ato da submissão através da nossa página no campo “Transferir Documentos Suplementares”. Os trabalhos submetidos à RCA serão **avaliados preliminarmente pelo Comitê Editorial** e só então serão enviados para pelo menos dois (2) revisores da área e publicados, somente, se aprovados por eles e pelo Comitê Editorial. A publicação dos artigos será baseada na originalidade, qualidade e mérito científico, **cabendo ao Comitê Editorial a decisão final do aceite**. O sigilo de identidade dos autores e revisores será mantido durante todo o processo. A administração da revista tomará o cuidado para que os revisores de cada artigo sejam, obrigatoriamente, de instituições distintas daquela de origem dos autores. **O artigo que apresentar mais de cinco autores não terá a sua submissão aceita pela Revista Ciência Agronômica, salvo algumas condições especiais (ver Autores)**. Não serão permitidas mudanças nos nomes de autores a posteriori.

2. Custo de publicação

O custo é de **R\$ 35,00 (trinta e cinco reais) por página editorada** no formato final. No ato da submissão é requerido um depósito de **R\$ 80,00 (oitenta reais) não reembolsáveis**, valor este que será deduzido no custo final do artigo editorado e aceito para publicação. Se o trabalho for rejeitado na avaliação prévia do Comitê Editorial, a taxa paga não poderá ser reutilizada para outras submissões dos autores. O comprovante de depósito ou transferência deve ser enviado ao e-mail da RCA (ccarev@ufc.br). No caso do trabalho conter impressão colorida deverá ser pago um **adicional de R\$ 80,00 (oitenta reais) por página**. Os depósitos ou transferências deverão ser efetuados em nome de:

REVCIENTAGRON ALEK

Banco do Brasil: Agência bancária: **4439-3** - Conta poupança: **13.215-2 Var 51**

As opiniões emitidas nos trabalhos são de exclusiva responsabilidade de seus autores. A Revista Ciência Agronômica reserva-se o direito de adaptar os originais visando manter a uniformidade da publicação. A RCA não mais fornece separatas ou exemplares aos autores. A distribuição na forma impressa da RCA é de responsabilidade da Biblioteca de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Ceará sendo realizada por meio de permuta com bibliotecas brasileiras e do exterior. Na submissão online é requerido:

1. A concordância com a declaração de responsabilidade de direitos autorais;
2. Que o autor que fizer a submissão do trabalho **cadastre todos os autores no sistema**;

3. Identificação do autor de correspondência com endereço completo.

3. Formatação do Artigo

DIGITAÇÃO: no máximo 20 páginas digitadas em espaço duplo (exceto Tabelas), fonte Times New Roman, normal, tamanho 12, recuo do parágrafo por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. As linhas devem ser numeradas de forma contínua.

ESTRUTURA: o trabalho deverá obedecer à seguinte ordem: título, título em inglês, resumo, palavras-chave, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

TÍTULO: deve ser escrito com apenas a inicial maiúscula, em negrito e centralizado na página com no **máximo 15 palavras**. Como chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a **natureza do trabalho** (se extraído de tese/dissertação, se pesquisa financiada,...) e referências às instituições colaboradoras. Os subtítulos: Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências devem ser escritos em caixa alta, em negrito e centralizados.

AUTORES: na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé deverão ser omitidos. Somente na versão final o artigo deverá conter o nome de todos os autores com identificação em nota de rodapé, inclusive a do título. Os nomes completos (sem abreviaturas) deverão vir abaixo do título, somente com a primeira letra maiúscula, um após outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, deve-se indicar, de cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, estado e país), endereço eletrônico e endereço completo do autor correspondente. O autor de correspondência deve ser identificado por um "*". **Só serão aceitos artigos com mais de cinco autores, quando, comprovadamente, a pesquisa tenha sido desenvolvida em regiões distintas (diferentes).**

RESUMO e ABSTRACT: devem começar com estas palavras, na margem esquerda, em caixa alta e em negrito, contendo no máximo **250 palavras**.

PALAVRAS-CHAVE e KEY WORDS: devem conter entre três e cinco termos para indexação. Os termos usados não devem constar no título. Cada **palavra-chave e key word** deve iniciar com letra maiúscula e ser seguida de ponto.

INTRODUÇÃO: deve ser compacta e objetiva contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa. As citações presentes na introdução devem ser empregadas para fundamentar a discussão dos resultados, criando, assim, uma contextualização entre o estudo da arte e a discussão dos resultados. Não deve conter mais de **550 palavras**.

CITAÇÃO DE AUTORES NO TEXTO: a NBR 10520/2002 estabelece as condições exigidas para a apresentação de citações em documentos técnico-científicos e acadêmicos. Nas citações, quando o sobrenome do autor, a instituição responsável ou título estiver incluído na sentença, este se apresenta em letras maiúsculas/minúsculas, e quando estiverem entre parênteses, em letras maiúsculas.

Ex: Santos (2002) ou (SANTOS, 2002); com dois autores ou três autores, usar Pereira e Freitas (2002) ou (PEREIRA; FREITAS, 2002) e Cruz, Perota e Mendes (2000) ou (CRUZ; PEROTA; MENDES, 2000); com mais de três autores, usar Xavier et al. (1997) ou (XAVIER

et al., 1997).

VÁRIOS AUTORES CITADOS SIMULTANEAMENTE: havendo citações indiretas de diversos documentos de vários autores mencionados simultaneamente e que expressam a mesma idéia, separam-se os autores por ponto e vírgula, **em ordem alfabética**, independente do ano de publicação.

Ex: (FONSECA, 2007; PAIVA, 2005; SILVA, 2006).

SIGLAS: quando aparecem pela primeira vez no texto, deve-se colocar o nome por extenso, seguido da sigla entre parênteses.

Ex: De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) [...].

TABELAS: devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Usar espaço simples. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho.

FIGURAS: gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte superior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. As figuras devem apresentar 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. A Revista Ciência Agronômica reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após a sua primeira citação.**

Obs.: As figuras devem ser também enviadas em arquivos separados e com RESOLUÇÃO de no mínimo 500 dpi através do campo “Transferir Documentos Suplementares”.

EQUAÇÕES: devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. O padrão de tamanho deverá ser:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

ESTATÍSTICA:

1. Caso tenha realizado análise de variância, apresentar o "F" e a sua significância;
2. Dados quantitativos devem ser tratados pela técnica de análise de regressão;
3. Apresentar a significância dos parâmetros da equação de regressão;
4. Dependendo do estudo (ex: função de produção), analisar os sinais associados aos parâmetros.
5. É requerido, no mínimo, quatro pontos para se efetuar o ajuste das equações de regressão.
6. Os coeficientes do modelo de regressão devem apresentar o seguinte formato:
 $y = a + bx + cx^2 + \dots$;
7. O Grau de Liberdade do resíduo deve ser superior a 12. **AGRADECIMENTOS:** logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos direcionados a pessoas ou instituições, em estilo sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais os faz.

AGRADECIMENTOS: logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos direcionados a pessoas ou instituições, em estilo sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais os faz.

REFERÊNCIAS: são elaboradas conforme a ABNT NBR 6023/2002. Inicia-se com a palavra REFERÊNCIAS (escrita em caixa alta, em negrito e centralizada). Devem ser digitadas em fonte tamanho 12, espaço duplo, justificadas e separadas uma da outra por um espaço simples em branco. **UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.** Com relação aos periódicos, é dispensada a informação do local de publicação, porém os títulos não devem ser abreviados. Recomenda-se um total de 20 a 30 referências.

Alguns exemplos:

- Livro

NEWMANN, A. L.; SNAPP, R. R. **Beef cattle**. 7. ed. New York: John Willey, 1977. 883 p.

- Capítulo de livro

MALAVOLTA, E.; DANTAS, J. P. Nutrição e adubação do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargil, 1987. cap. 13, p. 539-593.

- Monografia/Dissertação/Tese

EDVAN, R. L. **Ação do óleo essencial de alecrim pimenta na germinação do matapasto**. 2006. 18 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SILVA, M. N. da. **População de plantas e adubação de nitrogenada em algodoeiro herbáceo irrigado**. 2001. 52 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

- Artigo de revista

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M.; BOTREL, M. A. Resposta de *Cratylia argentea* à aplicação em um solo ácido. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 14-18, 1997.
ANDRADE, E. M. et al. Mapa de vulnerabilidade da bacia do Acaraú, Ceará, à qualidade das águas de irrigação, pelo emprego do GIS. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 3, p. 280-287, 2006.

- Resumo de trabalho de congresso

SOUZA, F. X.; MEDEIROS FILHO, S.; FREITAS, J. B. S. Germinação de sementes de cajazeira (*Spondias mombin* L.) com pré-embebição em água e hipoclorito de sódio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 11., 1999, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: ABRATES, 1999. p. 158.

- Trabalho publicado em anais de congresso

BRAYNER, A. R. A.; MEDEIROS, C. B. Incorporação do tempo em SGBD orientado a objetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCO DE DADOS, 9., 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 1994. p. 16-29.

- Trabalho de congresso em formatos eletrônicos

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na

educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônico...** Recife: UFPE, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais/educ/ce04.htm>>. Acesso em: 21 jan. 1997.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.

UNIDADES e SÍMBOLOS: As unidades e símbolos do Sistema Internacional adotados pela Revista Ciência Agronômica.

Grandezas básicas	Unidades	Símbolos	Exemplos
Comprimento	metro	m	
Massa	quilograma	kg	
Tempo	segundo	s	
Corrente elétrica	amper	A	
Temperatura termodinâmica	Kelvin	K	
Quantidade de substância	mol	mol	
Unidades derivadas			
Velocidade	---	m s ⁻¹	343 m s ⁻¹
Aceleração	---	m s ⁻²	9,8 m s ⁻²
Volume	metro cúbico, litro	m ³ , L*	1 m ³ , 1 000 L*
Frequência	Hertz	Hz	10 Hz
Massa específica	---	kg m ⁻³	1.000 kg m ⁻³
Força	newton	N	15 N
Pressão	pascal	Pa	1,013.10 ⁵ Pa
Energia	joule	J	4 J
Potência	watt	W	500 W
Calor específico	---	J (kg °C) ⁻¹	4186 J (kg °C) ⁻¹
Calor latente	---	J kg ⁻¹	2,26. 10 ⁶ J kg ⁻¹
Carga elétrica	coulomb	C	1 C
Potencial elétrico	volt	V	25 V
Resistência elétrica	ohm	Ω	29 Ω
Intensidade de energia	Watts/metros quadrado	W m ⁻²	1.372 W m ⁻²
Concentração	mol/metro cúbico	mol m ⁻³	500 mol m ⁻³
Condutância elétrica	siemens	S	300 S
Condutividade elétrica	desiemens/metro	dS m ⁻¹	5 dS m ⁻¹
Temperatura	grau Celsius	°C	25 °C
Ângulo	grau	°	30°
Porcentagem	---	%	45%

Números mencionados em seqüência devem ser separados por ponto e vírgula (;). Ex: 2,5; 4,8; 25,3.

4. Lista de verificação - Revista Ciência Agronômica

Visando a maior agilidade no processo de submissão de seu artigo, o Comitê Editorial da Revista Ciência Agronômica, elaborou uma lista de verificação para que o autor possa conferir toda a formatação do manuscrito de sua autoria, ANTES de submetê-lo para

publicação. A lista foi elaborada de acordo com as normas da Revista Ciência Agronômica. Respostas NEGATIVAS significam que seu artigo ainda deve ser adaptado às normas da revista e a submissão de tais artigos implicará na sua devolução e retardo na tramitação. Respostas POSITIVAS significam que seu artigo está em concordância com as normas, implicando em maior rapidez na tramitação.

A. Referente ao trabalho

1. O trabalho é original?
2. O trabalho representa uma contribuição científica para a área de Ciências Agrárias?
3. O trabalho está sendo enviado com exclusividade para a Revista Ciência Agronômica?

B. Referente à formatação

4. O trabalho pronto para ser submetido online está omitindo os nomes dos autores na versão Word?
5. O trabalho contém no máximo 20 páginas, está no formato A4, digitado em espaço duplo, incluindo as referências; fonte Times New Roman tamanho 12, incluindo títulos e subtítulos?
6. As margens foram colocadas a 2,5 cm, a numeração de páginas foi colocada na margem superior, à direita e as linhas foram numeradas de forma contínua?
7. O recuo do parágrafo de 1 cm foi definido na formatação do parágrafo? Lembre-se que a revista não aceita recuo de parágrafo usando a tecla “TAB” ou a “barra de espaço”.
8. A estrutura do trabalho está de acordo com as normas, ou seja, segue a seguinte ordem: título, título em inglês, autores, resumo, palavras-chave, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências?
9. O título contém no máximo 15 palavras?
10. O resumo e o abstract apresentam no máximo 250 palavras?
11. As palavras-chave (key words) contém entre três e cinco termos, iniciam com letra maiúscula e são seguidas de ponto?
12. A introdução contém citações atuais que apresentam relação com o assunto abordado na pesquisa e apresenta no máximo 550 palavras?
13. As citações apresentadas na introdução foram empregadas para fundamentar a discussão dos resultados?
14. As citações estão de acordo com as normas da revista?
15. As tabelas e figuras estão formatadas de acordo com as normas da revista e estão inseridas logo em seguida à sua primeira citação? Lembre-se, não é permitido usar “enter” nas células que compõem a(s) tabela(s).
16. As tabelas estão no formato retrato?
17. As figuras apresentam boa qualidade visual?
18. As unidades e símbolos utilizados no seu trabalho se encontram dentro das normas do Sistema Internacional adotado pela Revista Ciência Agronômica?
19. Os números estão separados por ponto e vírgula? As unidades estão separadas do número por um espaço? Lembre-se, não existe espaço entre o número e o símbolo de %.
20. O seu trabalho apresenta entre 20 e 30 referências sendo 60% destas publicadas com menos de 10 anos em periódicos indexados?
21. Todas as referências estão citadas ao longo do texto?
22. Todas as referências citadas ao longo do texto estão corretamente descritas, conforme as normas da revista, e aparecem listadas?

C. Observações:

1. Lembre-se que SE as normas da revista não forem seguidas rigorosamente, seu trabalho

não irá tramitar. Portanto, é melhor retardar o envio por mais alguns dias e conferir todas as normas. A consulta de um trabalho já publicado na sua área pode lhe ajudar a sanar algumas dúvidas e pode servir como um modelo (acesse aos periódicos no site <http://www.ccarevista.ufc.br/busca>).

2. Caso suas respostas sejam todas AFIRMATIVAS seu trabalho será enviado com maior segurança. Caso tenha ainda respostas NEGATIVAS, seu trabalho irá retornar retardando o processo de tramitação.

Lembre-se: A partir da segunda devolução, por irregularidade normativa, principalmente em se tratando das referências, o mesmo terá a submissão cancelada e não haverá devolução da taxa de submissão. Portanto é muito importante que os autores verifiquem cuidadosamente as normas requeridas pela Revista Ciência Agrônômica.

3. Procure SEMPRE acompanhar a situação de seu trabalho pela página da revista (<http://ccarevista.ufc.br>) no sistema online de gerenciamento de artigos.

4. Esta lista de verificação não substitui a revisão técnica da revista, a qual todos os artigos enviados serão submetidos.

GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH (GMR)

Instructions for Authors

Genetics and Molecular Research (GMR) publishes Book Review, Brief Note, Case Report, Comment, Correction, Errata, Homage, *In Memoriam*, Letter to the Editor, Methodology, Mini-Review, Obituary, Opinion, Point of View, Research Note, Retraction, Review, Review Article, Short Communication, and Thesis Abstract, with regard to genetics, evolution, molecular biology, and bioinformatics. Review articles are normally received by invitation only. If you would like for us to consider a review article, please consult the editor first; send a proposed title, a brief outline and a list of papers relevant to the review published by the author(s). GMR is an exclusively online journal.

The journal is maintained by the not-for-profit scientific foundation Ribeirão Preto Foundation for Scientific Research (FUNPEC-RP) and the articles are open access. **The fee per accepted submission is R\$ 1.615.00 for Brazilian authors and US\$960.00 for authors from other countries. The US dollar amount reflects the approximate current foreign exchange rate and is subject to change.** This fee covers part of the expenses for final language and technical revision, for page setup, and for publishing online.

Payment of the publishing fee should be made by the authors only after receiving a letter of acceptance. After payment is received by our office, the manuscript will be processed further for publication.

Payment, both from within or outside Brazil, should be made by bank transfer (Banco do Brasil or City Bank).

Instructions for payment (Brazil).

Instructions for payment (Outside Brazil).

Please contact the editorial office [gmr@geneticsmr.com] if you have any questions. All GMR articles must meet the highest standards of scientific quality, both in terms of originality and significance, and the research findings reported should make substantial advances. As it is a journal serving a wide and varied scientific community, article abstracts, introductions and conclusions should be comprehensible to the non-specialist, stressing any wider implications of the study. However, the papers should not compromise on the scientific rigor and detail demanded by an international research journal. The broad readership that GMR attracts gives authors an opportunity to convey to a large audience, as well as to specialists, the importance of their research. The journal is currently indexed in over 64 services; see [<http://www.geneticsmr.com>].

Contributions should be sent either by e-mail as attachments to [gmr@geneticsmr.com] or by regular mail (in files on a CD or DVD) to: Prof. Dr. Francisco A. Moura Duarte, Editor. Rua: Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista, 14025-220 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been previously

published and will not be simultaneously published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. The use of registered names, trademarks, etc., in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

All papers should be prepared in U.S. English. An initial evaluation of the language will be made upon receipt of each manuscript. Those that are considered inadequate for initial review will be returned or sent out for correction, at the discretion of the author. The manuscript will be considered officially received when the corrected version is ready to be sent to the referees.

Before final acceptance, a submission letter with the title of the article and names and signatures of all the authors should be posted to the above address or faxed to the journal at 55(16) 3621-1991. Galley proofs will be sent in “pdf” form via e-mail for final revision. All authors are co-responsible for their submissions and they should make every effort to check the paper before this final step to avoid costly reformatting and possible introduction of new errors.

GMR articles have no rigid length restrictions. They should contain sufficient technical detail for an expert reader to understand and assess the methods and results. There is no page limit for GMR articles, but authors should still be concise, for two main reasons. First, our electronic refereeing system relies on e-mail, and very large files occasionally cause problems. Second, lengthy manuscripts can be cumbersome to read and study. Referees tend to dislike them, and they take longer to process. In addition, readers of electronic journals often print articles to read them. Remember that a 10,000-word article takes up around 11 pages. How many pages would you be willing to read on-screen or print out?

Editorial policies: GMR is a refereed journal. Only original manuscripts will be considered for publication. Manuscripts will be reviewed by at least two independent reviewers before a decision is made on publication. The whole process is conducted electronically to speed progress and final publication. Papers will be published (placed online), once were fully processed. Papers accepted in their final form from January 1 to March 31 constitute the first issue of each volume, and so on. There are four issues per year.

Manuscripts (in U.S. English), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted to the Editor at [gmr@geneticsmr.com] in electronic format as .doc files saved in Microsoft Word 97 for Windows, or later version. Do not use formatting such as Word’s “Heading” or “Style Sheets”. Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check references for accuracy. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text. Figure and table files (see below) should be separate.

Submission information

Authors are required to provide the following information with their electronic submissions: Author submitting the article; article title; authors (full list); article type and session; status of article (e.g., new, revised, etc.); postal address; e-mail address; phone number; fax number; names and types of the files sent.

Brazilian authors should not translate their institutional addresses. These should remain in the original (Portuguese) language.

Revised versions: Authors submitting a revised version of an article, must remember to include a list of changes, and replies to the referees (or technical editor). All the files, not just those revised, for the final draft of paper should be sent.

Acknowledgment of electronic submissions: Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has been checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Review: Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

A review article should contain: an abstract of 250 words or less, no more than six key words, a running title and no more than 60 references. It should be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results (please report numerical data (means \pm SE) for significant results), and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

Key words: A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

Text

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, foot-notes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. The placing of graphics in the paper should be indicated in the text and should include the captions for the figures. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

References: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to “unpublished results” and “submitted papers” should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). **No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.**

References, under the heading “References”, should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author’s last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

Reference style: The list of references at the end of the paper should follow the format requested by GMR. The link below can be accessed to see how the references should appear.

[Examples of reference style](#)

[General information of GMR style](#)