



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE**

**DESENVOLVIMENTO DE VARIEDADE BRASILEIRA DE ALGODÃO  
GM ALTAMENTE RESISTENTE AO BICUDO DO ALGODOEIRO.**

Doutorando (a): Thuanne Pires Ribeiro  
Orientador (a): Maria Fátima Grossi de Sá

Fevereiro-2019  
Brasília- DF  
Universidade de Brasília

**THUANNE PIRES RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE VARIEDADE BRASILEIRA DE ALGODÃO  
GM ALTAMENTE RESISTENTE AO BICUDO DO ALGODOEIRO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em biotecnologia e biodiversidade da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia e biodiversidade.

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

**Brasília-DF  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Um sonho está sendo realizado, e posso garantir que da melhor maneira possível. Primeiramente agradeço a Deus que me deu força, sabedoria e dedicação ao longo deste trabalho, que me proporcionou tantas experiências proveitosas.

Aos meus pais Divaldo Divino Ribeiro e Heleodora Pires Ribeiro pelo exemplo de vida, pelos ensinamentos valiosos, ambos referência de caráter, humildade e amor incondicional. Agradeço pelo carinho, paciência e dedicação nas épocas de dificuldades e por sempre acreditarem em mim e à minha irmã Marina Pires Ribeiro pelo apoio, amizade e companheirismo. Vocês são o que tenho de mais valioso nessa vida. Agradeço por tê-los sempre comigo.

Em segundo lugar gostaria de agradecer a minha orientadora Maria Fátima Grossi de Sá, por ter confiado na minha capacidade mesmo sem me conhecer, ter me dado a oportunidade realizar esse trabalho, por ter me acolhido durante esses quatro anos, amadureci e cresci bastante nesses últimos anos e devo isso a ela, pelos ensinamentos que a mim foram transferidos, pelo exemplo e dedicação e amor à ciência.

Aos amigos Elínea, Dagna, Deisy, Ludovic, Reneida, Joel, Athus, Geovana, Daniel, Daniela, Ana Gabriela e Rayssa, agradeço por todo apoio, carinho, alegrias que me proporcionaram ao longo desses anos, obrigada pela convivência, paciência, amor e carinho que tiveram comigo.

Aos meus colegas/amigos/irmãos, Joaquin e Rafaella, por serem meu porto seguro, meus companheiros de vida, por serem a melhor parte de mim. Os momentos que divido com vocês vão ficar para sempre guardados em meu coração, aprendi muito com cada um de vocês. E podem ter a certeza que sem vocês nada disso seria possível e só por ter encontrado vocês, sinto que tudo valeu pena e que a alma nunca foi pequena.

Agradeço a amizade, o carinho, companheirismo dos meus amigos de sempre Pedro Augusto, Paola, Mariana, Renata, Lívia, Egberto, Macksuel, Eurípedes, Flávia, Thiago, Lúcio que viram minha caminhada deste o início e estiveram sempre do meu lado apesar da distância geográfica, em especial ao Fidel e ao Dilon por terem me proporcionado inesquecíveis momentos de descontração e infinitas caronas para ver a minha família.

A equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga e a todas as pessoas que por aqui passaram durante a fase do meu doutorado. E em especial a Isabela Tristan, Cristina Matar, Regina Amorin, Marcelo e ao Fabrício Arraes tenho um carinho e admiração muito grande por vocês, que me apoiaram totalmente na realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz no último ano e que me deram forças para chegar até aqui, Lívia, Hellen, Juliana, Alice, Karina, Maria Alice, Francis e Letícia. Vocês se tornaram muito especiais em tão pouco tempo. Foram minha família por um ano e só posso agradecer a Deus por ele ter colocado pessoas tão boas e especiais no meu caminho.

Ao Meu Co-orientador Leonardo Pepino, que acreditou em mim deste o início, que me apoiou incondicionalmente na realização desse trabalho, nos momentos em que pensei em desistir ele estava lá para me dar força, por ser o homem mais digno, íntegro e humilde que conheci ao longo dessa caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Enfim a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Obrigada! Amo Vocês!

## RESUMO

O algodão (*Gossypium hirsutum*) é a cultura de maior importância quando se trata da produção de fibras no mundo. Um dos principais desafios da produção de algodão é o ataque de insetos pragas, incluindo insetos da ordem Coleóptera como o *Anthonomus grandis*, o bicudo do algodoeiro. O ataque deste inseto é considerado a principal praga que ocorre em plantações de algodão no Continente Americano. Atualmente, esse controle envolve muitas aplicações de inseticidas químicos, o que aumenta o custo de produção e causa danos ambientais graves. Mesmo que a principal alternativa mundial aos inseticidas seja a adoção de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando genes de *Bacillus thuringiensis*, não existe nenhum evento comercial de algodão GM capaz de controlar o ataque do bicudo do algodoeiro. Com o objetivo de controlar de forma eficaz essa importante praga, por meio do uso de ferramentas biotecnológicas, plantas de algodão foram transformadas geneticamente com o gene *cry10Aa*, de *B. thuringiensis*. Através da transformação genética de plantas via biobalística o gene *cry10Aa*, regulado pelo promotor constitutivo *uceA1.7*, foi introduzido em uma cultivar de algodão brasileira (BRS-372). Eixos embrionários foram selecionados por meio da resistência ao herbicida Imazapyr conferida pelo gene *ahas*, gerando assim plantas transformadas. A integração estável do gene *cry10Aa*, assim como o número de cópias no genoma do algodão, foi confirmada nos diferentes eventos transgênicos de algodão por PCR e qPCR, respectivamente. A análise via qPCR revelou alto nível de transcrição do gene *cry10Aa* em eventos de algodão transgênico tanto em folhas como em botões florais. A expressão da proteína Cry10Aa nas plantas da geração T<sub>0</sub> foi avaliada por Western blot e a análise através do ensaio de ELISA comprovou a expressão da proteína, em ambos os tecidos, botões florais e folhas, variando de 3,0 a 15,0 µg.g<sup>-1</sup> de proteínas. A análise dos bioensaios, onde o inseto adulto se alimentava e se desenvolvia nos eventos transgênicos, demonstraram que o efeito entomotóxico foi diretamente proporcional ao nível de expressão da toxina, atingindo níveis de mortalidade de até 100%, quando comparadas com as plantas não transformadas. Além disso, foi observado que a estabilidade do transgene e o efeito entomotóxico do bicudo do algodoeiro foram mantidos nas seguintes gerações (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>), cujos os níveis de expressão da toxina Cry10Aa permaneceram elevados em ambos os tecidos (botão floral e folhas), variando de 4,05 a 19,57 µg.g<sup>-1</sup> de proteínas em de tecido fresco e a taxa de mortalidade do bicudo do algodoeiro permaneceu em torno de 100%. Todos os dados obtidos fornecem fortes evidências de que a expressão bem-sucedida do gene *cry10Aa* contribui para alto nível de resistência das plantas GM ao bicudo do algodoeiro. Testes adicionais foram realizados para determinar o local de inserção do gene no genoma do algodão, por meio dessa avaliação foi possível observar que o transgene foi inserido em partes do genoma que não causam alteração fenotípica a planta transgênica. Por meio de medições do nível de expressão de mRNA Cry10Aa em diferentes tecidos, foi mostrada a alta estabilidade do transgene Cry10Aa em plantas de algodão GM geração T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>. As plantas apresentaram também nível de tolerância ao estresse abiótico semelhante ao algodão não transgênico e a ausência de alteração fenotípica detectáveis no rendimento sugerem a equivalência agrônômica dessas plantas. Finalmente, quatro eventos de elite foram selecionados para futuros testes de campo. Desta forma, as plantas de algodão resistentes ao bicudo do algodoeiro geradas neste estudo representam um grande avanço para esse grave problema biótico que afeta a cultura do algodão e pode proporcionar uma melhoria e aumento substancial na produção de algodão em todo o mundo.

**Palavras-chave:** *Gossypium hirsutum*; planta geneticamente modificada; *Anthonomus grandis*; *cry10Aa*, *uceA1.7*.

## ABSTRACT

Cotton (*Gossypium hirsutum*) is the most important crop when it comes to fiber production in the world. One of the major challenges of cotton production is the attack of insect pests, including insects of the order of Coleoptera such as *Anthonomus grandis*. The attack of this insect is considered the main plague that occurs in cotton plantations in the American Continent. Currently this control involves many applications of chemical insecticides, which increases the cost of production and causes serious environmental damage. Although the main alternative insecticides worldwide are the adoption of genetically modified (GM) plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes, there is no commercial event of genetically modified (GM) cotton that can control the attack of the cotton boll weevil. To effectively control this important pest with genetic tools and biotechnology, cotton plants were genetically transformed with the gene *cry10Aa*, from *B. thuringiensis*. Through the genetic transformation of plants via biobalistics the gene *cry10Aa*, regulated by the constitutive promoter *uceA1.7* was introduced in a Brazilian cotton cultivar (BRS-372). The embryonic axes were selected through resistance to the herbicide Imazapyr conferred by the *ahas* gene, thus generating transformed plants. The stable integration of the *cry10Aa* gene as well as the number of copies in the cotton genome was confirmed in the different cotton transgenic events by PCR and qPCR respectively. Analysis via qPCR revealed high level of *cry10Aa* gene transcription in transgenic cotton events in both leaflets and floral buds. The expression of the Cry10Aa protein in the T<sub>0</sub> generation plants was evaluated by Western blot and the analysis by the ELISA assay showed the expression of the protein in both flower buds and leaves tissues varying from 3.0 to 15.0 µg.g<sup>-1</sup> protein. The analysis of the bioassays where the adult insect was fed and developed in the transgenic events demonstrated that the entomotoxic effect was directly proportional to the level of expression of the Cry10Aa toxin reaching levels up 100% of mortality if compared to the untransformed plants. In addition, it was observed that the stability of the transgene and the entomotoxic effect of the cotton boll weevil were maintained in the following generations (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub>), whose expression levels of the Cry10Aa toxin remained high in both tissues, ranging from 4, 05 to 19.57 µg.g<sup>-1</sup> of proteins in fresh tissue and the mortality rate of the cotton boll weevil remained around 100%. The data obtained provide strong evidence that the successful expression of the *cry10Aa* gene contributes to the high level of resistance of the genetically modified plants to the cotton boll weevil. Tests were carried out to determine the insertion site of the genome of the cotton genome, and this parameter was considered as a transgenic for genome change that did not cause phenotypic to transgenic change. Through measurements of the expression level of Cry10Aa mRNA in different tissues, a high stability of the Cry10Aa transgene was shown in GM cotton plants T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub>. The plants are also tolerant to stress when compared to non-transgenic cotton and without detectable phenotypic changes without yielding an agronomic equivalence of these plants. Finally, four elite events were selected for future field trials. In this way, cotton boll weevil resistant cotton plants generated in this study represent a major advance for this major biotic problem affecting cotton cultivation and it can provide a substantial improvement and increasing in cotton production worldwide.

**Keywords:** *Gossypium hirsutum*; genetically modified plant; *Anthonomus grandis*; *cry10Aa*, *uceA 1.7*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Determinação de modelos para elaboração do modelo Tridimensional da proteína Cry10Aa.....	38
<b>Figura 2:</b> Análise de promotores candidatos para design do cassete de expressão Cry10Aa para a transformação do algodão.....	40
<b>Figura 3:</b> Transformação de algodão via biobalística com a cassete de expressão Cry10Aa e seleção de amplificação por PCR de transformantes de algodão.....	41
<b>Figura 4:</b> Comparação fenotípica entre plantas de algodão Cry10Aa e plantas não transgênicas.....	42
<b>Figura 5:</b> Expressão relativa do transcrito <i>cry10Aa</i> medida por PCR quantitativo (qPCR) em plantas de algodão Cry10Aa T <sub>0</sub> GM.....	42
<b>Figura 6:</b> Imunodeteção da proteína Cry10Aa em algodoeiro Cry10Aa T <sub>0</sub> GM.....	44
<b>Figura 7:</b> Número de cópias do cassete de expressão Cry10Aa em plantas T <sub>0</sub> de algodão GM.....	45
<b>Figura 8:</b> Taxa de mortalidade de <i>Anthonomus grandis</i> adulto alimentado com folhas de algodoeiro Cry10Aa T <sub>0</sub> GM.....	46
<b>Figura 9:</b> Taxa de mortalidade de larvas <i>Anthonomus grandis</i> de algodoeiro Cry10Aa T <sub>0</sub> GM.....	47
<b>Figura 10:</b> Análise de plantas de algodão Cry10Aa GM na geração T <sub>1</sub> .....	48
<b>Figura 11:</b> Detecção de Cassete de Transformação em Eventos T <sub>2</sub> e T <sub>3</sub> via técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).....	50
<b>Figura 12:</b> Imunodeteção da proteína Cry10Aa em plantas de algodão T <sub>2</sub> e T <sub>3</sub> selecionadas por PCR.....	51
<b>Figura 13:</b> Comparação da expressão da proteína Cry10Aa ao longo de diferentes gerações.....	52
<b>Figura 14:</b> Comparação da taxa de mortalidade de insetos <i>A. grandis</i> originários de laboratório x campo, alimentados com algodoeiros que expressam alta quantidade da toxina Cry10Aa.....	53
<b>Figura 15:</b> Taxa de abortamento de botões florais em diferentes bioensaios com o inseto alvo ( <i>A. grandis</i> ).....	54
<b>Figura 16:</b> Comparação fenotípica entre <i>A. grandis</i> encontrados em plantas GM em relação a plantas NT .....	55
<b>Figura 17:</b> Comparação mortalidade de <i>A. grandis</i> em diferentes gerações.....	56
<b>Figura 18:</b> Nível de expressão do mRNA Cry10Aa em plantas GM em diferentes estágios de desenvolvimento ou tecidos.....	58
<b>Figura 19:</b> Desempenho agrônomico de eventos GM Cry10Aa.....	60
<b>Figura 20:</b> Capacidade produtiva de eventos Cry10Aa GM.....	61
<b>Figura 21:</b> Produtividade de fibra e sementes por botão floral.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Eventos de algodão geneticamente modificados aprovados no Brasil:.....	20
<b>Tabela 2:</b> Lista de primers usados.....	27
<b>Tabela 3:</b> Valores da LC <sub>50</sub> de protein Cry10Aa recombinante contra <i>Anthonomus grandis</i> <sup>1</sup> .....	39
<b>Tabela 4:</b> Quantificação do transcrito <i>cry10Aa</i> via qPCR.....	43
<b>Tabela 5:</b> Taxa de mortalidade (%) de adultos de <i>A. grandis</i> alimentados com tecidos de plantas de algodão T <sub>0</sub> geneticamente modificadas (GM) e NT.....	46
<b>Tabela 6:</b> Taxa de mortalidade (%) de adultos de <i>A. grandis</i> alimentados com tecidos de plantas de algodão T <sub>1</sub> geneticamente modificadas (GM) e NT.....	49
<b>Tabela 7:</b> Inserção do transgene no genoma de plantas de algodão GM .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – microgramas  
 $\mu\text{L}$  – microlitro =  $10^{-3}\text{L}$   
 $\mu\text{M}$  – micromolar =  $10^{-3}\text{M}$   
*A. grandis*–*Anthonomus grandis* Boheman (bicudo-do-algodoeiro)  
AHAS – Aceto-hidroxiácido sintase  
 $A_n$ – taxa fotossintética líquida  
ANOVA–software de análise de variância  
BAP–Benzylaminopurin  
BRS – cultivar brasileira de algodão  
BSA – Albumina soro bovina  
Bt- *Bacillus thuringiensis*  
*CaMV35S* – Promotor do RNA ribossômico 35S do vírus da couve-flor  
CBW–cotton boll weevil (Bicudo-do-algodoeiro)  
 $C_i$ – concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular  
CM – mortalidade corrigida  
Cry – Proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis*  
CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança  
CTR– Controle Positivo  
Cyt – Proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis*  
Da – Dalton  
DNA – ácido desoxiribonucleico  
DTT– Ditioneitol  
E– taxa de transpiração foliar  
EDTA–Ácido etilendiamino tetra-acético  
EUA– Estados Unidos da América  
g – gramas  
GM – Geneticamente Modificado  
 $G_s$ – condutância estomática  
ID Plantas- Identidade das Plantas  
IPTG–Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida  
KCL – Cloreto de Potássio  
L – litros  
LB – Luria Bertani  
 $\text{LC}_{50}$ –Dose da toxina letal para o inseto  
M – marcador de tamanho molecular  
M – molar  
mg – miligrama =  $10^{-3}\text{g}$   
MIP–Manejo de insetos-praga.  
mL – mililitros =  $10^{-3}\text{L}$   
mm – milímetro =  $10^{-3}\text{m}$   
MS–Murashige & Skoog  
ng – nanograma =  $10^{-9}\text{g}$   
nM – nanomolar =  $10^{-9}\text{M}$   
nm – nanometro =  $10^{-9}\text{m}$   
Nos–Nopalinesynthasepolyadenylationssignal  
NT – não transformada  
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius  
OGM- Organismo Geneticamente Modificado  
Pb – Pares de base  
PBS – Tampão Fosfato Salino  
PBS-T– Tampão Fosfato Salino+Tween20

PCR – reação em cadeia da polimerase  
psi – unidade de medida de pressão  
PVP-40 – Polivinilpirrolidona  
PVPP - Polivinilpolipirrolidona  
PVPP– Polyvinylpyrrolidone  
qPCR – PCR quantitative  
RNA-Ácido ribonucleico  
rpm – rotação por minuto  
spp. – espécies  
T<sub>0</sub> – geração inicial  
T<sub>1</sub> – primeira geração parental  
T<sub>2</sub> – segunda geração parental  
T<sub>3</sub> – terceira geração parental  
TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA  
TBS–Tris-Buffered Saline  
T-DNA – DNA de transferência  
T<sub>m</sub> – Temperature of Melting  
TMB– Tetra-methyl-benzidine Dihydrochloride  
U- Unidade de enzima  
*ubc1*– Ubiquitina  
*uceA1.7*– Promotor relacionado a ubiquitinação de algodão  
VIP–Vegetative Insecticidal Protein  
vir – virulência  
WT– wildtype non-GM plants (Planta não transformada NT)  
CaMV35S– promoter *Cauliflower mosaic virus*.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1. Visão geral da cotonicultura no Brasil.....	13
2.2. Aspectos agronômicos e morfológicos do algodão.....	14
2.3. Principais pragas que afetam a cultura do algodão no Brasil.....	15
2.4. O bicudo-do-algodoeiro ( <i>Anthonomus grandis</i> Boheman).....	17
2.5. A biotecnologia como ferramenta para o controle de insetos-praga.....	18
2.6. Algodão geneticamente modificado.....	19
2.7. $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry.....	21
2.8. Classificação taxonômica das proteínas de <i>B. thuringiensis</i> .....	22
2.9. A proteína Cry10Aa.....	23
2.10. Utilização do promotor <i>uceA</i> 1.7 para obtenção de plantas GM de algodão expressando a toxina Cry10Aa.....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. Objetivo Geral.....	25
3.2. Objetivos Específicos.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1. Análise da proteína Cry10Aa <i>in silico</i> e avaliação do promotor <i>uceA</i> 1.7 em <i>A. thaliana</i> .....	25
4.2. Expressão da toxina Cry10Aa em <i>Escherichia coli</i> .....	26
4.3. Determinação <i>in vitro</i> da LC <sub>50</sub> da toxina Cry10Aa com larvas (L2) de <i>Anthonomus</i> <i>grandis</i> .....	28
4.4. Desenho do cassete de DNA para transformação genética.....	28
4.5. Transformação genética de algodão via biobalística e seleção <i>in vitro</i> com o herbicida Imazapyr.....	28
4.6. Detecção de plantas geneticamente modificadas via PCR.....	29
4.7. Avaliação dos níveis de transcritos do gene de interesse.....	30
4.8. Imunodetecção de proteína Cry10Aa em plantas de algodão T <sub>0</sub> selecionadas via PCR. .....	31
4.9. Determinação do número de cópias do cassete de DNA (pBSK- <i>uceA</i> 1.7:: <i>cry10Aa</i> - <i>NOSt</i> ), em plantas de algodão T <sub>0</sub> , via PCR em tempo real e Southern blot.....	32

4.10. Identificação dos sítios de inserção do transgene.....	33
4.11. Nível de expressão do mRNA Cry10Aa em diferentes estágios de desenvolvimento ou tecidos.....	34
4.12. Avanço de geração: autofecundação dos botões florais.....	35
4.13. Bioensaios com <i>Anthonomus grandis</i> . ....	35
4.14. Desempenho agrônômico e potencial de rendimento das plantas GM CryAa.....	36
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1. Desenho do cassete de DNA para transformação de plantas de algodão via biobalística .....	37
5.2. Geração bem-sucedida de plantas de algodão Cry10Aa T <sub>0</sub> GM.....	40
<b>5.2.1. Obtenção do cassete de transformação genética e de plantas GM T<sub>0</sub>. .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.2. avaliação da expressão e do número de cópias do cassete de expressão do transgene cry10Aa: .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2.3. Plantas de algodão cry10Aa na geração T<sub>0</sub> são altamente resistentes ao bicudo do algodoeiro.....</b>	<b>45</b>
5.3. Análise das plantas de algodão GM T <sub>1</sub> mostra que a resistência ao ataque do bicudo-do- algodoeiro é transmitida para a próxima geração.....	48
5.4. Avaliação da mortalidade de insetos ( <i>A. grandis</i> ) originários de campo em plantas de algodão GM T <sub>2</sub> e T <sub>3</sub> . ....	49
5.5. Nível de expressão do mRNA Cry10Aa em plantas GM em diferentes estágios de desenvolvimento ou tecidos. ....	57
5.6. Identificação dos locais de inserção do transgene no genoma de plantas de algodão GM. ....	58
5.7. Desempenho agrônômico e potencial de rendimento das plantas GM CryAa.....	59
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL.

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) está presente em todas as regiões brasileiras, sendo também considerada uma das culturas anuais de maior importância em diversos países (Corrêa *et al.*, 2015). Na indústria têxtil, por exemplo, a fibra de algodão é considerada a mais importante, agregando valor comercial, tanto do ponto de vista social como econômico, destacando-se como uma das principais *commodities* cultivadas no mundo (Abrapa, 2018). O cultivo do algodão é influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos. Com relação à influência biótica, os insetos-praga são responsáveis por grande parte das perdas na produção mundial (Conab, 2018).

Entre os insetos associados à cultura do algodão, o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro, ou simplesmente bicudo) é considerado a principal praga na América do Sul. O bicudo tem como origem a América Central sendo que o seu primeiro registro no Brasil foi em 1983 no estado de São Paulo, de onde se espalhou para as principais áreas produtoras de algodão no país (De lima *et al.*, 2013). A partir daí, tornou-se a principal praga da cultura do algodão no país devido a sua rápida disseminação e grande capacidade de adaptação a novos ambientes, reforçado por suas características biológicas e comportamentais favoráveis. Além disso, o bicudo pode ser considerado como uma praga de difícil controle devido a seu ciclo de vida, na fase larval, que ocorre dentro das estruturas reprodutivas do algodão, principalmente botões e maçãs florais. Assim, este inseto não é passível de controle eficaz por inseticidas ou métodos convencionais, podendo causar perdas de até 100% na produção (Gallo *et al.*, 2002).

A prática do controle químico, além de ser altamente onerosa e parcialmente eficaz, leva à contaminação dos lençóis freáticos e alimentos, intoxicação de insetos benéficos não-alvo além de selecionar populações de insetos-pragas resistentes aos inseticidas químicos. Assim, as estratégias de gestão de pragas ecológicas têm de ser adaptadas, a fim de minimizar os riscos da poluição ambiental, para a saúde humana e sustentabilidade agrícola (IMAmt, 2015). A rápida adoção de plantas geneticamente modificadas (GM) ao longo dos últimos 20 anos (1998-2018) apresenta inúmeras vantagens para o meio ambiente, resultando em economia com inseticidas e conseqüentemente aumento de renda per capita considerável (Conab, 2018).

Com o objetivo de obter cultivares de algodoeiro resistentes a pragas que atacam a cultura, foram desenvolvidas diversas plantas de algodão geneticamente modificadas. Dos 507 eventos de transgênicos comercialmente aprovados em todo o mundo, 62 (8,17%) são de algodão (ISAAA, 2018). Nos dias atuais, o algodão geneticamente modificado é a terceira cultura mais cultivada em todo o mundo. A maioria dos eventos transgênicos disponíveis

comercialmente é para resistência a inseto-praga da ordem dos Lepidópteros (Sohrab, 2016). Este fato reforça a necessidade da busca por novas moléculas com potencial inseticida para a geração de novos eventos de algodão GM. As culturas transgênicas mais cultivadas em todo o mundo expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). O *Bt* é uma bactéria de solo que foi introduzida na agricultura em 1960, sendo caracterizada por possuir atividade entomopatogênica devido à produção de proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry, demonstrando serem tóxicas para insetos, nematoides, ácaros e protozoários (Lajolo; Nutti, 2003; Crickmore *et al.*, 1998).

A adoção em larga escala da tecnologia de algodão *Bt* vem sendo implementada principalmente na China e Índia, os maiores produtores de algodão do mundo, reduzindo significativamente o uso de inseticidas químicos e trazendo grandes benefícios econômicos para os agricultores (CTNBio, 2018). Neste contexto, o desenvolvimento de plantas transgênicas de algodão mais resistentes à *A. grandis* é altamente desejado (IMAmt, 2015). Em 2016 surgiu o primeiro relato sobre produção de algodão *Bt* apresentando resistência ao ataque do bicudo em casa de vegetação. Esse estudo mostrou que plantas de algodão geneticamente modificadas que expressam o gene *cryIIa12* apresentaram controle de até 60% desses insetos (Oliveira, *et al.*, 2016).

Outros estudos mostraram o alto potencial no controle de insetos coleópteros com toxinas provenientes de *Bt* da estirpe *Bti*, onde foi identificada a proteína Cry10Aa, que apresentou alta toxicidade contra a broca do café (*Hyphotenemus hampei* Ferr), um Coleóptero da família Curculionidae, assim como o bicudo do algodoeiro (Martins *et al.*, 2010). O gene *cry10Aa* (GenBank número de acesso: M12662) foi expresso em cultura de células de insetos e sua toxicidade para *A. grandis* foi demonstrada, o que evidenciou um alto potencial deste gene em ser utilizado em plantas de algodão transgênicas para o controle total desta importante praga (Aguiar *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015).

Devido ao grande potencial biotecnológico apresentado pela toxina Cry10Aa no controle *in vitro* do *A. grandis*, o presente estudo tem como objetivo a transformação de uma cultivar de algodão brasileira (BRS 372) com o gene *cry10Aa*, combinado com o promotor constitutivo *uceA* 1.7 para obtenção de plantas de algodão GM que apresentem alta resistência ao ataque do *A. grandis* (Viana *et al.*, 2011; Artico *et al.*, 2013).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1. Visão geral da cotonicultura no Brasil.**

No ano de 2018 a agricultura e o agronegócio contribuíram com 23,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, com uma produção de grãos de 226,04 milhões de toneladas, o que representa uma produção 20% maior em relação à safra anterior e uma grande influência na economia (Sociedade Nacional de Agricultura, 2018). Estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) mostram que a produção de grãos deverá passar de 226,04 milhões de toneladas para 288,2 milhões de toneladas em 2028, o que indica um acréscimo de 62,16 milhões de toneladas à produção atual do Brasil, representando uma taxa de crescimento de 23,4%. Já a área plantada com lavouras deve passar de 61,7 para 84 milhões de hectares em dez anos (Conab, 2018). A expansão desta área é principalmente impulsionada pelo aumento esperado de 35% na área destinada para a produção de algodão (OECD-FAO, 2018).

O algodão é uma planta cultivada em cerca de 80 países, a exploração econômica dessa cultura, ocorre entre as latitudes 47°N e 32°S e altitudes de até 1.000 m, fato esse que torna o algodoeiro uma das culturas de maior dispersão no mundo e faz com que o seu plantio e colheita ocorram durante o ano todo (Abrapa, 2018). O Brasil é o terceiro maior exportador mundial de algodão, o primeiro em produtividade em sequeiro e o quinto maior produtor ao lado de China, Índia, EUA e Paquistão (Conab, 2018).

No mercado externo, a Indonésia, a Turquia e o Vietnã posicionaram-se como os principais compradores do algodão brasileiro, enquanto que no mercado interno, as vendas da pluma do algodão destinaram-se principalmente, à indústria têxtil (IBGE, 2018). A área plantada de algodão no Brasil em 2018 é estimada em 1,18 milhões de hectares, um ganho de 237 mil hectares em área plantada, quando comparado com a safra anterior (2016/2017). Esse incremento em área plantada de algodão deve ser sustentado basicamente pela exportação do produto, uma vez que as vendas externas têm previsão de aumento de 62,7% em dez anos, passando de 740 mil para 1.204 milhões de toneladas, o que corresponde a um crescimento anual de 4,5% (USDA, 2018; Conab, 2018).

A produção de algodão no País concentra-se, especialmente, nos estados de Mato Grosso e Bahia, que corresponderam, em 2018, por 89% da produção (Mapa, 2018). O estado do Mato Grosso tem a liderança com 3.213,9 milhões de toneladas, seguido pelo estado da Bahia (1.193), Goiás (135,3), Mato Grosso do Sul (135,0), sendo a região Centro-Oeste responsável por 78% da produção brasileira (Conab, 2018).

## 2.2. Aspectos agronômicos e morfológicos do algodão.

O algodoeiro pertence ao grupo das plantas dicotiledôneas, ao gênero *Gossypium* que é um dos mais cultivados no mundo e a família das Malváceas, que é uma das mais antigas plantas domesticadas pelo homem (Boren *et al.*, 2003). Atualmente, existem mais de 55 espécies do gênero *Gossypium*, das quais 17 são endêmicas da Austrália, seis do Havaí e uma do nordeste brasileiro. Mas, apenas quatro são cultivadas, isto é, domesticadas: *Gossypium barbadense* L., *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium hirsutum* L., esta última contribui com 90% da produção de algodão comercial no mundo, além de ser a mais utilizada para produção de fibra, principalmente no Brasil. As primeiras referências históricas do algodão vêm de muitos séculos antes de Cristo, mas a sua utilização na confecção de tecidos foi registrada somente a 2200 a.C. na China (Becerra, 2000). No Brasil, o algodão já vinha sendo cultivado pelos índios antes mesmo da chegada dos portugueses. A fibra do algodão era usada para confecção de redes, além disso, o caroço era esmagado e cozido, sendo utilizado na alimentação e de suas folhas era extraído um sumo que curava feridas (Corrêa *et al.*, 2015).

O algodoeiro é uma planta em que quase tudo é aproveitado, sendo que o produto mais rentável é a fibra, que é a principal matéria-prima da indústria têxtil e pode ter mais de 400 aplicações industriais, dentre as quais se destacam: confecção de fios para tecelagem (tecidos variados), algodão hidrófilo para enfermagem, confecção de feltro de cobertores, estofamentos e obtenção de celulose (Randel, 2002). Os restos de cultura – caule, folhas maçãs, capulhos – são utilizados na alimentação de animais em geral. O caroço (semente) é rico em óleo (18-25%) e contém 20-25% de proteína bruta. O óleo extraído da semente é processado e destinado à alimentação humana e fabricação de margarina e sabões. Atualmente, o óleo de algodão representa uma importante alternativa também para a produção de energia baseada no biodiesel. O bagaço (farelo ou torta), subproduto da extração do óleo, é destinado a alimentação animal (bovinos, aves, suínos) devido ao seu alto valor proteico (40-45% de proteína bruta) (James, 2006).

O algodão apresenta um ciclo de vida diversificado com espécies de ciclo precoce (cerca de 130 dias), médio (cerca de 140 dias) e tardio (acima de 170 dias), podendo apresentar variedades anuais, perenes e semiperenes. As sementes levam cerca de 5 dias para germinar e, da emergência da plântula até os primeiros botões florais, são cerca de 35 dias, (25 dias do aparecimento do botão à abertura da flor, aproximadamente 30 dias da flor aberta ao fruto com tamanho máximo e mais 85 dias do fruto com tamanho máximo a deiscência) (Amorim, 2001).

O algodão apresenta porte variável, sua raiz principal é cônica, do tipo pivotante com número abundante de raízes secundárias grossas e superficiais. A planta é dotada de ramos vegetativos (4 a 5 na parte de baixo) e ramos frutíferos (extra-axiais na parte superior) podendo atingir uma altura de cerca de dois metros (Loka e Oosterhuis, 2010). As folhas são do tipo coriáceas, pubescentes e trilobadas. As flores são, geralmente, amarelas com grandes brácteas denteadas, a planta apresenta fotoperíodo para floração. O algodoeiro é uma planta com sistema reprodutivo misto, podendo ocorrer simultaneamente a autofecundação e o cruzamento natural. A polinização é feita por insetos, uma vez que apresenta pólenes pesados e viscosos (Vidal-Neto e Freire, 2013).

Os frutos são cápsulas oblongas, deiscentes, conhecidos popularmente de “maçãs” quando verdes e “capulhos” quando maduros. As sementes apresentam teor de óleo variando entre 14 a 25%, e estão cobertas por longas fibras brancas que ficam expostas quando o fruto se abre. O número de fibras em uma única semente pode variar entre 7.000 e 15.000 e cada fibra pode variar de tamanho em função do cultivar e das condições climáticas. Para se ter sucesso na germinação do algodoeiro devem prevalecer condições térmicas e hídricas que permitam à semente emergir entre 5 e 10 dias, o que pode mudar completamente com o aumento significativo da temperatura, sendo 25-30 °C a faixa de temperatura considerada ideal. O ciclo de vida da planta é dividido em quatro fases: (V) fase vegetativa, (B) formação dos botões florais, (F) abertura de flores e a (C) abertura de capulhos (Becerra, 2000).

O desenvolvimento da planta vai depender, principalmente, das condições climáticas. O algodão desenvolve-se bem em lugares onde haja de 180 a 200 dias livres de geadas, com temperatura média acima de 20 °C, com dias predominantemente ensolarados, precipitação pluviométrica de 500 a 1.500 mm anuais e convenientemente distribuída. Em razão de sua extensão continental e de suas diferentes condições edafoclimáticas, o Brasil é o único país que possui duas áreas distintas de produção de algodão: a região Centro-Sul com uma colheita no 1º semestre do ano, e a região Norte-Nordeste, com colheita no 2º semestre. Um dos fatores que limitam a expansão do algodoeiro no País é a perda advinda do ataque de pragas. Na década de 1990, o plantio da cultura foi deslocado para o Centro-Oeste, adotando-se o sistema de monocultura no Cerrado, o que favoreceu o aparecimento de diferentes tipos de pragas, afetando diretamente a produtividade das lavouras de algodão no País (Beltrão; Azevedo 2008).

### **2.3. Principais pragas que afetam a cultura do algodão no Brasil.**

A cultura do algodão está associada ao ataque de uma ampla variedade de competidores, sejam eles insetos, microorganismos ou até mesmo outras espécies vegetais.

Nem todos estes competidores são classificados como pragas, uma vez que tal classificação está ligada ao dano econômico, ou seja, aos prejuízos causados devido ao ataque e ocorrência dessas pragas, causando assim prejuízos de igual valor ao custo de seu controle (Becerra, 2000). O nível de dano econômico pode ser variável em função do preço do produto agrícola, custo de controle, capacidade da praga em danificar a cultura e susceptibilidade da cultura à praga (Corrêa *et al.*, 2015).

Os organismos que freqüentemente ou sempre atingem o nível de controle podem ser classificados como pragas-chave. As pragas na cultura do algodão atacam todas as partes da planta, sendo atingidas das raízes até a parte aérea, o que ocorre devido ao fato do algodoeiro possuir glândulas denominadas *nectários*, que produzem uma secreção açucarada, fazendo com que a planta seja atrativa para uma ampla variedade de pragas que ocasionam perdas à produção, além de gerarem gastos adicionais (Santos, 2011). As pragas na cultura do algodão apresentam elevada capacidade reprodutiva, alta mobilidade e ampla dispersão, causando danos sejam na queda de produção ou afetando características importantes da semente e da fibra. Desta forma, a cultura é prejudicada desde os primeiros estádios até a sua colheita (Corrêa *et al.*, 2015). O complexo de pragas que atacam a cultura do algodão merece destaque, principalmente, devido à sua ampla diversidade. Estima-se que existam mais de 1.200 espécies de insetos que infestam o algodoeiro, entre os quais 20 a 60 são considerados insetos-praga. Essa variedade de pragas podem ser classificadas em dois grupos: pragas indiretas e pragas diretas (Almeida *et al.*, 1999).

As pragas indiretas são aquelas que atacam outras partes da planta que não aquela que será comercializada, como a broca-da-raiz (*Eutinobothrus brasiliensis*), broca-do-ponteiro (*Conotrachelus denieri*), percevejo castanho (*Horcias nobilellus*), ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*), ácaro rajado (*Tretanychus urticae*) (Gallo *et al.*, 2002; De Lima *et al.*, 2013).

As pragas diretas são aquelas que atacam diretamente a estrutura que será comercializada – o fruto, destacando-se o curuquerê (*Alabama argillacea*), a mosca branca (*Bemisia argentifolii*), a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), percevejo rajado (*Horcias nobilellus*), percevejo manchador (*Dysdercus ruficollis*), lagarta militar (*Spodoptera frugiperda*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*). Dependendo da severidade do ataque destas pragas diretas, perdas consideráveis à produção podem ser verificadas (Gallo *et al.*, 2002).

Dentre as pragas diretas que afetam a cultura do algodão, o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) é a praga de maior incidência e com maior potencial de dano, sendo considerada a praga-chave do algodão. Em regiões altamente infestadas por esta

praga e onde o controle adequado não é realizado, o inseto pode inviabilizar o cultivo do algodoeiro, causando prejuízos diretos à comercialização do algodão (De Lima *et al.*, 2013).

#### **2.4. O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman).**

O bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis* Boheman) é um inseto da ordem Coleóptera, a qual compreende cerca de 40% de todos os insetos descritos, pertencente à família Curculionidae (De Lima *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2005; Gallo *et al.*, 2002). O bicudo-do-algodoeiro é um besouro que mede, na fase adulta, de 4 a 9 mm, sendo que o rostro (bico alongado) compreende 50% desse tamanho. Na extremidade do bico, encontram-se as peças bucais e, lateralmente ao bico, estão inseridas as antenas, características comuns dos insetos da família Curculionidae (Busoli & Michelotto, 2005; Gravena, 2001). A coloração do inseto pode variar conforme sua idade e a alimentação, sendo que o adulto tem coloração que varia de pardo-acinzentado ao preto, com pelos levemente dourados (Leigh *et al.*, 1996).

De acordo com estudos da biogeografia de *A. grandis*, o inseto é originário do México, onde invadiu as culturas do Texas, e se expandiu para a região norte e sul dos Estados Unidos. Em 1949, o bicudo-do-algodoeiro foi encontrado na Venezuela e no ano seguinte detectado na Colômbia (IMAmt, 2015; Azambuja & Degrande, 2014; Habib & Fernandes, 1983). No Brasil, o inseto foi constatado pela primeira vez em 1983, na região de Campinas, São Paulo. Em seguida se estendeu pela região do Paraguai, em meados de 1991, e na Argentina em 1993, causando prejuízos diretos a comercialização do algodão (Ribeiro *et al.*, 2010). O inseto tornou-se uma praga-chave da cultura do algodão na América, devido a sua rápida disseminação, grandes danos causados nas áreas cotonicultoras, capacidade de adaptação a novos ambientes, reforçado por suas características biológicas e comportamentais favoráveis (Soria *et al.*, 2013).

O ataque do bicudo nas lavouras começa pelas bordas. Podem ocorrer 5 a 6 ciclos do bicudo durante um ciclo de cultivo do algodoeiro. Entre 50 a 90 dias após a emergência das plantas ocorre o período crítico de ataque do inseto, podendo se estender dos 30 aos 130 dias (Busoli & Michelotto, 2005). O bicudo alimenta-se das estruturas reprodutivas do algodão, tendo preferência por botões florais jovens, uma vez que as brácteas servem como proteção. Além dos danos provocados pela alimentação, os botões florais também são usados pelas fêmeas para oviposição (Ribeiro *et al.*, 2010). A postura dos ovos é realizada em função do tamanho da estrutura floral ocorrendo, principalmente, em botões florais de tamanho médio (entre 4 e 6 mm de diâmetro). As fêmeas fazem um pequeno orifício de oviposição no botão floral, onde deposita apenas um ovo, que é recoberto por ela com uma secreção amarela. Essa cera tem como função proteger o ovo no interior do botão, após a eclosão. A temperatura e a

umidade são fatores importantes para o desenvolvimento do ciclo do inseto, temperaturas mais altas, em torno de 30 °C, reduz o período de incubação do ovo e estágio pupal (Azambuja & Degrande, 2013). As larvas permanecem dentro do botão floral, usando a estrutura como fonte de alimento e hábitat de proteção até que o desenvolvimento seja concluído. Uma fêmea pode colocar até 300 ovos, sendo que diariamente são realizadas em torno de 6 posturas (Tomquelski & Martins, 2008). Partes das estruturas florais aonde a fêmea oviposita são abortadas e caem no solo vindo a apodrecer, enquanto que aquelas que ficam nas plantas têm a produção de fibras inviabilizada (Gallo *et al.*, 2002; Silvie *et al.*, 2013).

Atualmente no Brasil, é a principal praga da cultura do algodoeiro. Devido ao seu local de crescimento, existe grande dificuldade em controlar a praga com inseticidas químicos, sendo necessárias entre 10 e 15 aplicações para manter as populações do inseto sob controle, o que corresponde em até 42% do custo de produção (Conab, 2018). Além disso, essa praga é de difícil controle devido a seu ciclo de vida, uma vez que todo o seu desenvolvimento ocorre dentro dos botões e maçãs florais (Busoli & Michelotto, 2005). Grandes esforços têm sido empreendidos pelo setor produtivo do algodão no sentido de reduzir o impacto ocasionado pelo bicudo nas lavouras brasileiras. O uso da biotecnologia se apresenta como uma alternativa promissora, por meio da incorporação de genes inseticidas, para a obtenção de plantas de algodão geneticamente modificadas (GM) resistente a este inseto-praga (IMAmt, 2015).

## **2.5. A biotecnologia como ferramenta para o controle de insetos-praga.**

A biotecnologia é uma das ferramentas tecnológicas mais importantes da atualidade. Por meio da biotecnologia é possível selecionar características superiores, de forma mais precisa. Suas aplicações têm contribuído para a estruturação de novos sistemas econômicos e sociais, por meio da manipulação das estruturas menores que compõem os seres vivos, através da engenharia genética (Borém, 2001). A engenharia genética permite a obtenção de variedades de plantas tolerantes ou resistentes a estresses bióticos e abióticos por meio da técnica de transformação genética de plantas (Lajolo; Nutti, 2003).

A transformação genética de plantas consiste na transferência de um ou mais genes no organismo hospedeiro sem que haja fecundação ou cruzamento. Esses organismos transformados geneticamente recebem o nome de transgênicos (OGMs) e os genes inseridos são denominados de transgenes. A obtenção destes organismos envolve o isolamento ou a clonagem do(s) gene(s) de interesse, a introdução do(s) gene(s) em um vetor de transformação, a transformação da célula ou tecido da planta receptora e, finalmente, a seleção e a regeneração da planta juntamente com a fixação da característica desejada

(Andrade *et al.*, 2011). A transformação genética de plantas utiliza duas metodologias distintas para obtenção de OGM que são as técnicas indiretas e diretas (Sohrab, 2016).

Dentre as técnicas indiretas que fazem uso de vetores biológicos para mediar o processo de transformação, destaca-se o uso de bactérias do gênero *Agrobacterium*, especialmente a espécie *Agrobacterium tumefaciens*. A técnica de transformação com o uso do *A. tumefaciens* permite que uma sequência de interesse seja transferida para a célula, através de pequenos ferimentos, por meio dos quais o plasmídeo com o gene de interesse penetra no material vegetal a ser transformado. Já as técnicas diretas são utilizadas para transferir as sequências de interesse, sem a necessidade de um vetor biológico. Dentre estas, destaca-se a biobalística ou bombardeamento de partículas (Amugune, *et al.*; 2011). A técnica de biobalística consiste na introdução de material genético por meio de micropartículas de tungstênio ou ouro, previamente tratadas, envoltas pelo DNA (vetor de expressão) a ser introduzido na célula (Sohrab, 2016).

Este método tem demonstrado maior eficiência na obtenção de plantas transgênicas quando a transformação ocorre nos meristemas apicais e células embriogênicas. A transformação de tecidos meristemáticos utilizando biobalística apresenta a vantagem de evitar a ocorrência de variação somaclonal. Esta técnica vem sendo utilizada, sobretudo, para a obtenção de cultivares transformada com genes que codificam toxinas provenientes de Bt (Rivera *et al.*, 2012). Ambas as técnicas de transformação produzem organismos geneticamente modificados com diferentes graus de eficiência, sendo a técnica da biobalística escolhida para realização deste trabalho, uma vez que essa metodologia de transformação garante a integração e expressão estável de genes em diferentes gerações de plantas de algodão e por apresentar uma eficiência maior para a transformação de meristemas apicais (Amugune, *et al.*; 2011).

## **2.6. Algodão geneticamente modificado.**

Atualmente, os transgênicos estão presentes em 44 países, cobrindo os cinco continentes (Sohrab, 2016; ISAAA, 2018). Os primeiros experimentos a campo com plantas transgênicas foram conduzidos em 1986, nos Estados Unidos e as características genéticas introduzidas foram tolerância a herbicidas, resistência a insetos, qualidade do produto e resistência a vírus (ISAAA, 2018). No ano de 2017, o Brasil cultivou 50 milhões de hectares (ha) com culturas transgênicas, um crescimento de 5% em relação a 2016 ou o equivalente a dois milhões de hectares, posicionando-se no “ranking” mundial como o segundo maior produtor (Conab, 2018). Entre as culturas transgênicas cultivadas no País destaca-se o

algodoeiro, cuja adoção saiu de 66% em 2016 para 80% em 2017, com uma estimativa de aumento de 4,3% para a safra de 2018 em relação à anterior (ISAAA, 2018, Conab, 2018).

Com o avanço da biotecnologia na agropecuária, várias plantas GM com resistência a insetos-praga estão presentes no mercado, inclusive espécies de algodão (Monnerat, 2012). No Brasil, apenas 17 eventos de algodão estão regulamentados e autorizados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para plantio (ISAAA, 2018). Como pode ser observado na Tabela 1.

A primeira liberação comercial de plantas *Bt* no Brasil foi do algodão expressando a toxina Cry1Ab, em 2005. Dos 507 eventos transgênicos comercialmente aprovados em todo o mundo, 62 (8.17%) são de algodão (ISAAA, 2018; CTNBio, 2018). Porém, os eventos de algodão GM disponíveis atualmente são eficientes apenas no controle de insetos da ordem Lepidoptera. Mas nenhum com resistência ao *A. grandis*, que é considerado a praga mais prejudicial à cultura. Portanto, há uma forte demanda no Brasil em desenvolver eventos de algodão GM resistentes ao bicudo (IMAmt, 2015).

**Tabela 1:** Eventos de algodão geneticamente modificados aprovados no Brasil:

Evento	Gene Inserido	Função	Empresa
WideStrike™	cry1Ac+cry1F+pat (syn)	Resistência a insetos lepidópteros, Resistência ao herbicida glufosinato de amônio.	DowAgroSciences LLC
GlyTol™	2mepsps	Tolerância ao herbicida glifosato.	Bayer CropScience
GlyTol™Liberty Link™	bar + 2mepsps	Tolerância ao herbicida glifosato.	Bayer CropScience
Glytol™ x Twinlink™	cry1Ab+cry2Ae +bar+ 2mepsps	Resistência a insetos lepidópteros, Tolerância ao herbicida glifosato.	Bayer CropScience
Fibermax™Liberty Link™	bar	Resistência ao herbicida Glufosinato de amônio.	Bayer CropScience
Roundup Ready™	cp4epsps(aroA:CP4)+ nptII_ + aad_	Tolerância ao herbicida glifosato.	Monsanto Company
Bollgard II™	Cry1Ac + nptII_ + aad_ + uidA_ + cry2Ab2+epsps	Resistência a insetos lepidópteros, Tolerância ao herbicida glifosato.	Monsanto Company
Bollgard™, Ingard™	cry1Ac + nptII_ + aad_	Resistência a insetos lepidópteros.	Monsanto Company
Roundup Ready™ Bollgard™	cp4 epsps (aroA:CP4) + cry1Ac + nptII_ + aad_	Resistência a insetos lepidópteros, Tolerância ao herbicida glifosato.	Monsanto Company
Roundup Ready™ Flex™	cp4 epsps (aroA:CP4)	Tolerância ao herbicida glifosato.	Monsanto Company
Roundup Ready™ Flex™ Bollgard II™	cp4 epsps (aroA:CP4) + cry1Ac + uidA_ + cry2Ab2+ nptII_ + aad_	Resistência a insetos lepidópteros, Tolerância ao herbicida glifosato.	Monsanto Company
TwinLink™	cry1Ab + cry2Ae + bar	Resistência a insetos lepidópteros, Tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.	Bayer CropScience
Glytol™ x Twinlink™ x	2mepsps+ cry1Ab+	Resistência a insetos lepidópteros,	Bayer CropScience

VIPCOT™ Cotton	cry2Ae+bar+ vip3A(a)+ aph4 (hpt)	Tolerância ao herbicida glifosato	
Bollgard® III x Roundup Ready™ Flex™	cp4 epsps (aroA:CP4)+vip3A(a)+ cry1Ac+aph4 (hpt)+ cry2Ab2+ nptII + aad + uidA	Resistência a insetos lepidópteros, Tolerância ao herbicida glifosato.	Monsanto Company
MON88701	mmo+bar	Resistência ao herbicida dicamba e glufosinato de amônio.	Monsanto Company
81910	aad-12+pat	Resistência ao herbicida d4b e glufosinato de amônio.	Dow AgroSciences
281-24-236x3006-210- 23xCot102	cry1Ac+cryF+vip3A (a)	Resistência a insetos lepidópteros	Dow AgroSciences

Adaptado: ISAAA, 2018.

Em 2016 surgiu o primeiro relato sobre produção de algodão *Bt* apresentando resistência ao ataque do bicudo sob condições de casa de vegetação. Esse estudo mostrou que plantas de algodão expressando o gene *cryIIa12* apresentaram um controle de até 60% desses *A. grandis*, não sendo uma resistência suficiente para o controle do Bicudo do algodoeiro em campo. Este fato reforça a necessidade da busca por novas moléculas com potencial atividade inseticida para a geração de novos eventos de algodão GM. Neste sentido, cresce a busca por novas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry, provenientes de *thuringiensis* (*Bt*) com potencial para o controle de coleópteros (Oliveira, *et al.*, 2016).

## 2.7. $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry.

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria da família Bacillaceae, pertencente ao grupo do *Bacillus cereus*, Gram-positiva, esporulante, cosmopolita, presente em amostras de solo, filoplano, e trato digestivo de Arthropoda e outros invertebrados superiores e apresenta como característica principal a capacidade de formar esporos quando expostas a condições de estresse (Crickmore *et al.*, 1998). Essa espécie de bactéria foi isolada pela primeira vez em 1901, no Japão, onde foi detectada no bicho-da-seda (*Bombyx mori*), num estudo onde foi observado que a morte do bicho-da-seda estava associada aos esporos desta bactéria (Valicente; Barreto, 2003). O *Bt* se difere das demais espécies do seu grupo por produzir, durante a segunda fase da esporulação, inclusões cristalinas contendo proteínas de ação entomotóxica. A descrição da espécie foi realizada dez anos depois, pelo cientista alemão Ernst Berliner, ao verificar que a bactéria era causadora da morte de *Ephesiakuehniella*, uma espécie de mariposa. Berliner nomeou a bactéria como *B. thuringiensis* (Roh *et al.*, 2007).

Na esporulação de *B. thuringiensis* ocorre um acúmulo de proteínas em formas de cristais protéicos na superfície do esporo. Estas proteínas são divididas em três grupos:  $\alpha$  e  $\beta$ -exotoxinas,  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt) e as proteínas VIP “Vegetative Insecticidal

Protein” e possuem toxicidade específica a diferentes ordens de insetos-pragas (Navon, 2013). Dessa forma, as proteínas são utilizadas no controle desses insetos na agricultura, com a inserção do gene no DNA das plantas hospedeiras (Gowda *et al.*, 2016). As proteínas Cry são tóxicas para a ordem Lepidóptera, Coleóptera, Díptera e alguns nematoides, tendo seu mecanismo de ação no intestino médio dos insetos (Donovan *et al.*, 1992). O mecanismo de ação das proteínas Cry envolve os seguintes passos: ingestão da toxina, processamento das toxinas, ligação das toxinas ao receptor, inserção da membrana, agregação, formação do poro, citólise e morte do inseto (James, 2015; Pathak *et al.*, 2015).

Desde então, as  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry começaram a serem usadas com muito sucesso para o controle de insetos-praga da agricultura e vetores de doenças, devido, principalmente, à sua especificidade, que reflete diretamente na sua segurança para a saúde humana e dos organismos não alvo. Sendo inofensivas aos animais vertebrados e às plantas, além de serem biodegradáveis quando expostas ao ambiente (Oliveira, 2008). Além das lavouras GM que contém o gene *cry* demandarem menor uso de pesticidas, que são poluentes ao meio ambiente, a tecnologia tem como vantagem o fato de a proteína ser expressa em tecidos específicos da planta. Em razão disso, estas toxinas são uma alternativa bastante eficaz no controle de diversos insetos (Maagd, 2015; Shah *et al.*, 2016).

## **2.8. Classificação taxonômica das proteínas de *B. thuringiensis*.**

Hofte e Whiteley (1989) propuseram ao término da década de 80 uma classificação para as toxinas de *B. thuringiensis*, baseada na combinação de suas seqüências de aminoácidos e espectro inseticida. Dessa forma, foram agrupadas 30 toxinas em 14 classes diferentes. As quatro principais classes continham toxinas com atividade contra Lepidoptera (I), Lepidoptera e Diptera (II), Coleoptera (III) e Diptera (IV).

No entanto, esse esquema apresentou problemas após tentar relacionar toxinas que apresentavam seqüências de aminoácidos similares a diferentes atividades inseticidas. Na década de 90 Crickmore *et al.* (1998) propôs uma nova classificação que continua sendo utilizada até hoje e baseia-se unicamente nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Esta mudança possibilitou uma alta relação entre as toxinas e tornou desnecessária a realização de bioensaios com cada proteína contra um grande número de insetos.

Aclassificação apresenta quatro estágios hierárquicos em decorrência do local que as seqüências ocupam em uma árvore filogenética (Crickmore *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001). Na primeira etapa da classificação as seqüências recebem um número e quando a similaridade genética é inferior a 45%, esse número de difere (Cry1, Cry2... Cry73). Na etapa

seguinte, quando a similaridade é de até 78%, as seqüências recebem um letra maiúscula (Cry1A, Cry1B, Cry1C... Cry1N) que representa a classe a qual pertencem. Na terceira etapa, quando a similaridade é superior a 95%, as seqüências recebem uma minúscula (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac... Cry1Ai) referente a sua subclasse. Na última etapa são atribuídos números de identificação (Cry1Aa1, Cry1Aa2... Cry1Aa24) de acordo com a ordem em que essas seqüências são depositadas no banco de dados. Há um banco de dados on-line com a classificação e nomenclatura das proteínas Cry, mantido pelo pesquisador Neil Crickmore (Crickmore *et al.*, 2014). As  $\delta$ -endotoxinas compreendem duas famílias multigênicas, Cry e Cyt, atualmente há mais de 630 seqüências de genes que codificam essas toxinas. As proteínas Cry estão classificadas em 73 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de existirem 3 grupos de proteínas Cyt (Crickmore *et al.*, 2014; De Maagd *et al.*, 2001).

## 2.9. A proteína Cry10Aa.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) possui uma coleção de 2,5 mil cepas de *B. thuringiensis*, da qual foram selecionadas estirpes altamente tóxicas aos insetos da ordem Diptera (Monnerat *et al.*, 2005), Lepidoptera (Monnerat *et al.*, 2007) e Coleoptera (Martins *et al.*, 2007). Outros estudos mostraram o alto potencial no controle de insetos coleópteros com toxinas provenientes de *Bt* da estirpe *Bti*, onde foi identificada a proteína Cry10Aa, que apresentou alta toxicidade contra a broca do café (*Hyphotenemus hampei* Ferr), um coleóptero da família Curculionidae, assim como o bicudo do algodoeiro (Aguiar *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). O gene *cry10Aa* (GenBank número de acesso: M12662) foi expresso em cultura de células de insetos e sua toxicidade para *A. grandis* foi demonstrada, apresentando uma mortalidade 100% das larvas neonatas de *A. grandis*, evidenciando assim um alto potencial deste gene em ser utilizado em plantas de algodão transgênicas para o controle total desta importante praga (Monnerat *et al.*, 2005; Grossi-de-Sá *et al.*, 2007; Aguiar, 2007; Martins *et al.*, 2010).

Devido ao grande potencial biotecnológico apresentado pela toxina Cry10Aa no controle *in vitro* de *A. grandis*, o presente estudo tem como objetivo a transformação de um cultivar de algodão brasileiro (BRS 372) com o gene *Cry10Aa*. Para a obtenção de plantas transgênicas com níveis adequados de proteínas, a escolha de promotores (seqüências regulatórias) que direcionem altos níveis de expressão em tecido específicos é extremamente importante (Artico *et al.*, 2013).

## 2.10. Utilização do promotor *uceA 1.7* para obtenção de plantas GM de algodão expressando a toxina Cry10Aa.

Um dos promotores mais utilizados em biotecnologia de plantas é o 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), que confere uma alta taxa de expressão na maioria das células quando transferido para plantas. Devido aos estudos dos elementos modulares desse promotor, este teve sua região regulatória duplicada e fundida a uma sequência *enhancer* do vírus mosaico da alfafa, gerando um promotor de plantas recombinante bastante eficiente na indução da expressão de seqüências codificadoras a ele associadas (Benfey *et al.*, 1990). Porém, este promotor é patenteado, sendo necessária a sua negociação a fim de se obter o licenciamento para o a sua utilização em plantas transgênicas que almejam o mercado. Assim, visando buscar novas seqüências promotoras para serem utilizadas em programas de melhoramento de plantas, recentemente foram isolados e caracterizados promotores que estão relacionados ao processo de ubiquitinação das plantas (Grossi-de-Sá, 2012).

A ubiquitinação desempenha papel importante na regulação de diversas atividades realizadas pela planta, além de está ligado as interações proteína-proteína, localização de proteínas subcelular, regulação transcricional (através da ubiquitinação de histonas), regulação translacional (Muratani *et al.*, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2007). Promotores de genes relacionados à ubiquitinação isolados de arábida, girassol, tabaco, milho e várias outras culturas podem conduzir a expressão de gene repórter em células ou plantas transformadas (Genschik *et al.*, 1994; Bachmair *et al.*, 2001; Nalivaeva *et al.*, 2001).

Estudos anteriores relataram que o padrão de expressão da conjugação de ubiquitina é regulada diferencialmente através de diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento. Neste mesmo estudo, foi relatada a identificação do Gene GhGDRP85 [GenBank: EU373075], um membro da família E2 que apresenta um alto nível de acumulação de transcritos em vários tecidos de algodão (Viana *et al.*, 2011). A região reguladora GhDRDR85, do gene chamado *uceA 1.7* [GenBank: JN887312]. Os estudos do promotor *uceA 1.7* mostraram expressão constitutiva do gene repórter GUS ( $\beta$ -glucuronidase) em todos os tecidos avaliados da planta de *Arabidopsis thaliana* transformada, revelando altos níveis de expressão, principalmente no botão floral, quando comparado ao promotor 35Sd (*Cauliflower mosaic virus*, um dos promotores mais utilizados em biotecnologia de plantas. Portanto a identificação deste promotor é uma importante ferramenta biotecnológica para a geração de variedades de plantas geneticamente modificadas que expressem genes *Bt* (Artico *et al.*, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral.

Este trabalho tem como objetivo a geração de plantas de algodão geneticamente modificadas resistentes ao ataque do bicudo-do-algodoeiro. Para isso um cultivar brasileiro (BRS-372) de algodão será transformada geneticamente através da técnica de biobalística, utilizando um vetor que contenha o gene *cry10Aa*, como gene de interesse, regulado pelo promotor *uceA 1.7*, obtendo-se assim uma cultivar GM de algodão que possua alta expressão da proteína Cry10Aa e alta taxa de mortalidade de *A. grandis*. Mostrando-se assim que a proteína Cry10A possui uma alta performance para o controle do bicudo-do-algodoeiro, mesmo ao longo de diferentes gerações e em diferentes tecidos da planta.

#### 3.2 Objetivos Específicos.

1. Construção de um vetor de transformação genética de plantas de algodão com o gene *cry10Aa* controlado pelo promotor *uceA 1.7*;
2. Realizar a transformação genética do meristema de embriões de algodão, por meio da técnica de biobalística;
3. Obtenção de plantas GM de algodão, selecionadas com resistência o herbicida Imazapyr conferida pelo gene *ahas*;
4. Caracterização molecular de plantas GM (PCR, ELISA, RT-qPCR, Western blot, Southern blot e qPCR para analisar o número de cópias do transgene);
5. Plantio e análise das gerações seguintes (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>)
6. Bioensaios com o inseto-alvo (caracterizar/ estimar a taxa de mortalidade de *A. grandis*).

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Análise da proteína Cry10Aa *in silico* e avaliação do promotor *uceA1.7* em *A. thaliana*

A seqüência Cry10Aa (número de acesso AAA22614.1) (Thorne *et al.*, 1986; Aguiar *et al.*, 2012) e a estrutura da  $\delta$ -endotoxina Cry1Ac (PDB ID: 4W8J) foram utilizadas para gerar o modelo *in silico* da proteína Cry10Aa. Para escolha do melhor modelo as seqüências de proteínas Cry1Ac ou Cry2Aa foram utilizadas como modelos candidatos. Assim essas seqüências foram alinhadas com o auxílio do software MUSCLE (Edgar, 2004) e a relação filogenética entre elas foi obtida por meio do software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), utilizando o método estatístico Neighbor-joining e o método filogenético Bootstrap com 1000 repetições. A elucidação da estrutura tridimensional foi realizada utilizando-se a homologia por modelagem com o software Modeller 9v8 (Sali, 1995) e Swiss-Model (Biasini *et al.*,

2014). A estrutura secundária Cry10Aa foi elucidada com o software PDBsum (Laskowski, 2007).

Para avaliação do promotor *uceA* 1.7, o RNA total foi extraído de vários tecidos, de plantas transgênicas de *A. thaliana* que expressavam o gene tais como: inflorescências, botões florais, flor aberta, fruto, caule, folhas e raízes. Para amplificação do gene, os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 µg de RNA total usando primers Oligo (dT24V) e Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA). As reações em cadeia da polimerase foram realizadas no sistema de detecção de PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando SYBRGreen para monitorizar a síntese de cDNA. As eficiências de PCR e o limite do ciclo de quantificação ideal ou valores de Cq foram estimados usando o Real time PCR Miner online (Zhao e Fernald, 2005). Os valores de Cq foram convertidos no software qBase v1.3.5 (Hellemans *et al.* 2007) em quantidades relativas normalizadas, corrigidas pela eficiência de qPCR, usando a fórmula  $Q = E\Delta Cq$  onde E é a eficiência da amplificação gênica e  $\Delta Cq$  é a amostra com menor expressão no conjunto de dados menos o valor Cq da amostra em questão. Para cada construção, três linhas transgênicas independentes foram escolhidas para análise de qPCR usando três réplicas técnicas.

#### **4.2. Expressão da toxina Cry10Aa em *Escherichia coli*.**

O gene *cry10Aa* utilizado nas construções de DNA, para transformação genética de plantas de algodão, foi baseado na sequência original da estirpe de *B. thuringiensis* S1804 depositada no GenBank (número de acesso M12662) (Thorne *et al.*, 1986; Aguiar *et al.*, 2012). O gene *cry10Aa* foi amplificado por PCR utilizando aTaq Polymerase Proofreading High Fidelity (Invitrogen®) e os primers CRY10-BamHI-F e CRY10-NotI-R (Tabela 2). O fragmento amplificado (2072 pb) foi isolado a partir de gel de agarose a 1% (w/v) (Sigma®) e purificado utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen®). O gene *cry10Aa* foi sub-clonado no vetor de clonagem pCR2.1 TOPO TA Cloning (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante e, posteriormente, sequenciado com os mesmos primers de clonagem. O gene *cry10Aa* também foi sub-clonado no vetor de expressão pET21a (5443pb - Invitrogen®), gerando o vetor pET21a-*cry10Aa* (7501pb) que foi utilizado para expressar o gene em *Escherichia coli* BL21(DE3). As colônias positivas foram selecionados após crescimento em meio LB [1.0% (w/v) de peptona de caseína, 0,5% (w/v) de extrato de levedura, 1,0% (w/v) de NaCl, pH 6,7] com adição de ampicilina a 100 µg.mL<sup>-1</sup>. A expressão do gene foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM durante 24h e avaliado por SDS/PAGE 12%, de acordo com Laemmli (1970). A proteína heteróloga fusionada com cauda 6-His-Tag e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

**Tabela 2.** Lista de primers usados.

Nome do Primer	Sequencia (5'-3')	T <sub>M</sub> (°C) <sup>1</sup>	Tamanho do gene (bp)	Experimentos
CRY10- <i>Bam</i> HI-F	ggatcc ATG CTT GGC GCG TTT GCT GCT CCA GTG <sup>2</sup>	58	2072	Gene <i>cry10Aa</i> : Clonagem do plasmídeo em bactéria para expressão heteróloga.
CRY10- <i>Not</i> I-R	gcggccgc TTA <u>ATG ATG ATG</u> <u>ATG ATG ATG</u> GCG CAC AAA GAG GTC GTT CAC AAT C <sup>3</sup>			
AHASF	GTC ACT GGG TTA ATA TCT CTC GAA TCT TGC A	57	479	Detecção do cassette de transformação em plantas de algodão transgênicas. Determinação do número de cópias no genoma de plantas de algodão GM.
AHASR	CCT ACT TCC AAT GTC TGA TTA GTG CTT CTG G			
CRY10F	AGT TCA GAA ACA ATA GTC GG	57	410	Detecção do cassette de transformação em plantas. Determinação dos níveis do transcrito em plantas de algodão GM (RT-qPCR). Síntese da sonda para o Southern blot.
CRY10R	GCT GGA AGG G TG GGA ATC C			
GhUBQ14F	CAA CGC TCC ATC TTG TCC TT	57	75	Determinação dos níveis do transcrito em plantas de algodão GM (RT-qPCR).
GhUBQ14R	TGA TCG TCT TTC CCG TAA GC			
GhPP2A1F	GAT CCT TGT GGA GGA GTG GA	57	100	Determinação dos níveis do transcrito em plantas de algodão GM (RT-qPCR).
GhPP2A1R	GCG AAA CAG TTC GAC GAG AT			
GUSF	TGA TAG CGC GTG ACA AAA A	60	92	Comparação entre os genes promotores <i>CaMV35S</i> e <i>uceA 1.7</i> (RT-qPCR).
GUSR	CGA AAT ATT CCC GTG CAC TT			
AtHELFF	CCA TTC TAC TTT TTG GC GGC T	60	61	Comparação entre os genes promotores <i>CaMV35S</i> e <i>uceA 1.7</i> (RT-qPCR).
AtHELFR	TCA ATG GTA ACT GAT CCA CTCTGATG			
AtPP2AF	TAA CGT GGC CAA AAT GAT GC	60	65	Comparação entre os genes promotores <i>CaMV35S</i> e <i>uceA 1.7</i> (RT-qPCR).
AtPP2AR	GTT CTC CAC AACCGCTTGGT			
GhUBC1F	TGG CAT TAT ATT GTC ATT GTT ACT ATC C	55	121	Determinação do número de cópias no genoma, em plantas de algodão GM
GhUBC1R	ACC ATG TTA TCT TAT TCT AAG ACA AGC TC			

<sup>1</sup> Temperatura de anelamento usada nos experimentos.<sup>2</sup> Sequência (ggatcc) – sítio da enzima de restrição *Bam*HI.

<sup>3</sup>Sequência (gcggccgc) - sítio da enzima de restrição *NotI*. A sequência sublinhada representa a adição de 6-His Tag.

### **4.3. Determinação *in vitro* da LC<sub>50</sub> da toxina Cry10Aa com larvas (L2) de *Anthonomus grandis*.**

Com o objetivo de determinar a dose letal (LC<sub>50</sub>), foram testadas cinco doses da proteína Cry10Aa purificada em dieta artificial para *A. grandis* (0,4, 0,8, 1,6, 6,4 e 12,8 µg.mL<sup>-1</sup>) de acordo com a metodologia descrita por Aguiar *et al.* (2012). Cada dose da proteína purificada foi adicionada em 5 mL de dieta artificial e colocada em placas de cultura de células com seis poços (TPP, Techno Plastic Products AG, Suíça). Cinco orifícios foram criados em cada poço onde foi inoculado um único ovo de *A. grandis*. O ensaio biológico foi mantido em incubadora apropriada com o fotoperíodo de 14 h 27 °C. A mortalidade foi mensurada sete dias após a inoculação dos ovos na dieta e a LC<sub>50</sub> obtida por Probit analysis.

### **4.4. Desenho do cassete de DNA para transformação genética.**

O cassete de expressão *uceA::cry10Aa-NOS<sub>t</sub>-ahas* (9024 pb), para transformação genética das plantas de algodão foi sintetizado quimicamente pela empresa Epoch Life Science Inc. (Missouri City, Texas) e sub-clonado no vetor pBluescriptSK(-) (pBSK-), gerando o vetor pBSK-*uceA1.7::cry10Aa-NOS<sub>t</sub>* (11910 pb). O vetor resultante foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, para a transformação de algodão. O cassete de transformação genética é constituído pelo promotor e terminador do gene *ahas*, sequência codificadora do gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*, com o gene de seleção para plantas transformadas *in vitro*. O gene *ahas* presente no cassete de transformação possui uma mutação na posição 653, resultando em uma substituição de uma serina por uma asparagina, o que confere tolerância ao herbicida Imazapyr, um grupo químico das imidazolinonas (Aragão *et al.*, 2000). O gene *cry10Aa* é regulado pelo promotor relacionado a ubiquitinação de algodão (*uceA 1.7*) (Artico *et al.*, 2013; Grossi-de-Sá *et al.*, 2012; Viana *et al.*, 2011) e pelo terminador *nos* (*nopaline synthase polyadenylation signal*).

### **4.5. Transformação genética de algodão via biobalística e seleção *in vitro* com o herbicida Imazapyr.**

Sementes de *G. hirsutum* variedade BRS372 foram colhidas manualmente e deslintadas com ácido sulfúrico (3 mL.g<sup>-1</sup> semente) por agitação vigorosa durante 1 min. Para remover o ácido, as sementes foram imediatamente transferidas para 5L de água destilada, sendo lavadas três vezes com água destilada e depositadas sobre papel filtro para secar.

O método de biobalística foi utilizado para transformar a variedade BRS372 de algodão, como descrito por Rech (2008). Eixos embrionários foram retirados das sementes e posicionados com a região apical voltada para cima em placas de cultura com 5cm, contendo

meio de bombardeamento [0,5% Meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% (w/v) de sacarose, 1% (w/v) de vitaminas e 0,8% (w/v) Fitagel pH 5.7]. O bombardeamento foi realizado com 5 $\mu$ g de DNA e, em seguida, os eixos embrionários ficaram durante 48 h no escuro. Após esse período, os eixos foram transferidos para um recipiente de acrílico (6 x 6 x 10 cm-Magenta) contendo meio de indução de brotações e agente de seleção *in vitro* [0,5% meio MS, 3% (w/v) de glucose, 300 mg.mL<sup>-1</sup> benzylaminopurin (BAP), 300 mM Imazapyr, 1% (w/v) de vitaminas de MS, 0,1% (w/v) de carvão ativado e 0,6% de ágar (v/w) (Sigma<sup>®</sup>), pH 5,7]. As magentas foram mantidas uma sala de cultura aclimatizada a 25°C e com um fotoperíodo (50 mol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) de 16 h de luz. Após 30 dias, as plantas com raízes necrosadas e que não se desenvolveram, foram removidas.

As plântulas que apresentavam de 2-6 cm de comprimento foram transferidas para vasos de plástico contendo uma mistura de solo autoclavado e vermiculita (1:1) e foram cobertas com sacos plásticos para manter a umidade adequada. Após 2 semanas, as plantas que sobreviveram em condições de estufa, apresentando mais de 10cm de comprimento foram transferidas para vasos contendo solo adubado para obtenção de sementes e caracterização molecular. Em paralelo plantas de algodão variedade BRS 372 desenvolvidas *in vitro*, e da mesma idade das plantas transgênicas foram transferidas para vermiculita e após uma semana para o solo, sendo utilizadas como controle negativo (não transformada ou plantas NT), para análise molecular comparativa.

#### **4.6. Detecção de plantas geneticamente modificadas via PCR.**

O DNA genômico foi extraído, a partir de folhas novas de plantas de algodão selecionadas pela tolerância ao Imazapyr *in vitro*, utilizando o Kit DNeasy Plant Maxi (Qiagen<sup>®</sup>), de acordo com as instruções do fabricante. A fim de confirmar a presença de genes *ahas* e *cry10Aa*, foi utilizado o mix de PCR Extract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma<sup>®</sup>) com 50ng de DNA genômico de plantas selecionadas *in vitro*, os com os primers (10 mM) listados na Tabela 2 (CRY10F, CRY10R, AHASF e AHASR). As condições de PCR foram as seguintes: *cry10Aa*– 1 ciclo de 95°C durante 5 min, 40 ciclos de 94 °C durante 45 s, 57 °C durante 45 s e 72 °C durante 1 min e 1 ciclo final de 72 °C por 10 min; *ahas* – 1 ciclo de 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, 57 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min e 1 ciclo final de 72 °C por 10 min. O DNA genômico de plantas NT foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi utilizado o DNA do vetor binário pBSK-*uceA1.7::cry10Aa-NOSt*. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) segundo Sambrook e Russel (2001).

#### 4.7. Avaliação dos níveis de transcritos do gene de interesse.

Para extração do RNA total das plantas de algodão T<sub>0</sub> selecionadas via PCR, foi utilizado um disco foliar de folhas jovens (1 cm diâmetro). O RNA foi extraído utilizando o reagente Concert (Invitrogen<sup>®</sup>) suplementado com 0,1% de PVPP, seguindo as instruções do fabricante. Para extração do RNA de botão floral foram utilizados 100mg de botão floral macerados em nitrogênio líquido, utilizando o kit Invisorb<sup>®</sup> Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular), também seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras de RNA foram quantificadas com o fluorímetro Qubit<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>).

Para a amplificação do gene *Cry10Aa*, os cDNAs foram sintetizados a partir de 2.0 µg de RNA total de folha e botão floral de plantas de algodão tratados com 1 µL de DNase Ambion<sup>®</sup> RNase-free<sup>™</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) para digerir qualquer traço de DNA genômico contaminante. O cDNA foi sintetizado utilizando o oligo-dT NVD<sub>30</sub> e 1U da enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Invitrogen<sup>®</sup>), seguindo instruções do fabricante. Todas as extrações de RNA foram realizadas em triplicadas biológicas.

As sequências dos primers do gene exógeno (*cry10Aa* - CRY10F e CRY10R) e genes endógenos [*Ghubq14* - GhUBQ14F e GhUBQ14R; *Ghpp2a1*- GhPP2A1F e GhPP2A1R] foram desenhados utilizando o software Primer3 (Tabela 2). As quantificações por PCR em tempo real foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O mix utilizado para reação foi composto por SYBR<sup>®</sup> Green e ROXPlus Master (LGC Biotechnology), 200 mM de cada primer e 2.0 µL do cDNA (50ng), totalizando um volume final foi de 10 µL para cada reação. Todas as reações foram realizadas em triplicadas biológicas e técnicas. As condições dos ciclos de PCR foram: 95 °C durante 15 min para ativar a hot-start Taq DNA polymerase, 40 ciclos a 95 °C durante 15 s (passo de desnaturação), 57 °C durante 45 s (etapa de anelamento dos primers) e 72 °C durante 30 s (etapa de alongamento). Finalmente, a curva de desnaturação foi criada após a amplificação para verificar a presença de produtos não específicos ou dímeros de primers. Os dados brutos de fluorescência para todas as corridas foram importados para o software de PCR em tempo real, Miner (Zhao e Fernald, 2005), a fim de determinar o valor de Ct e a eficiência da PCR. A análise da expressão foi concluída utilizando software qBASEPlus (Hellemans et al., 2007) e a eficiência da PCR foi corrigida pela fórmula  $Q = E^{\Delta Ct}$ , em que E é a eficiência da amplificação do gene e  $\Delta Ct$  é a amostra com a menor expressão no conjunto de dados, menos o valor Ct da amostra em questão. A análise estatística foi realizada com o software REST (Qiagen<sup>®</sup>). Após a normalização com base em genes endógenos, todos os valores dados no gráfico são relativos à menor expressão, cujo valor foi fixado em 1 (µm).

#### 4.8. Imunodeteção de proteína Cry10Aa em plantas de algodão T<sub>0</sub> selecionadas via PCR.

O anticorpo policlonal (pabCry10Aa) foi produzido pela empresa GenScript<sup>®</sup>, inoculando o peptídeo sintético VSSDSKIVKGPHT em coelhos. O peptídeo foi escolhido com base na sequência de aminoácidos da toxina Cry10Aa e em estudos imunogênicos *in silico*.

Para as análises qualitativas via Western blot, folhas novas (3 g) e botões florais (0,6 mg) foram macerados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Para as folhas foram adicionados 15 mL de tampão de extração de proteínas [TBS (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5) suplementado com 0.5% (w/v) de ácido ascórbico, 10 mM de metabissulfito de sódio, 0,5 % (v/v) de Triton X-100; 1 mM PSMF]. Já para os botões florais foi adicionado 1 mL de tampão de extração [TBS (0.5 M Tris-OH, 1.5 M NaCl, pH 7.5) suplementado com 0.5 % (w/v) de ácido ascórbico, 10 mM de metabissulfito de sódio, 0,5 % (v/v) de Triton X-100; 1 mM PSMF]. As amostras foram submetidas à leve agitação durante 2 h a 4 °C e em seguida foram centrifugadas duas vezes a 8.000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado e o pH ajustado para 7,5. A quantificação do extrato bruto das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma curva padrão a partir de albumina de soro bovino (BSA). As amostras contendo 500 ng de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) 10,0%, de acordo com Laemmli (1970). Após a eletroforese, as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond<sup>®</sup> GE), utilizando Transblot semi-seco (Bio-Rad) (Towbin et al., 1979). A membrana foi bloqueada durante a noite com 3,0 % (w/v) de gelatina em tampão TBS suplementado com 0,05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma<sup>®</sup>) e 0,5% (w/v) de PVA (álcool polivinílico) (Sigma<sup>®</sup>), à temperatura ambiente. No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com TBS-Tween-20 e uma lavagem somente com TBS. A membrana foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente em 2,0% (w/v) de gelatina diluída em TBS contendo o anticorpo primário pabCry10Aa (1:1000). Após a lavagem tríplice da membrana com TBS-Tween20 e uma lavagem somente com TBS a membrana foi incubada com o anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG (AP- Bio-Rad) conjugado com fosfatase alcalina (1:3000) durante 1 h, à temperatura ambiente. Para detecção do sinal foi usado o kit de revelação conjugado à fosfatase alcalina (Bio Rad<sup>®</sup>), de acordo com as instruções do fabricante.

Para as análises quantitativas via teste de ELISA, 1 disco de folha nova (0,6 mg) e botões de florais pequenos (0,6 mg) foram macerados separadamente em nitrogênio líquido e adicionado 1 mL de tampão extração [0,7 M de sacarose, 0,5 M Tris HCl, 50 mM de EDTA,

0,1M KCl, 0,5 % (v/v) de Triton X-100, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, pH 8,0] suplementado com 0,05 % (w/v) de PVPP (polyvinylpyrrolidone), antes da utilização. Os extratos totais foram incubados com agitação moderada durante 45 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação a 9000 RPM (Eppendorf Centrífuga S418R), durante 30 min, a 4 °C. A quantificação de proteína total foi obtida pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Os poços de placas de microtitulação foram revestidas com 125 ng de extrato de proteína total, e as proteínas extraídas de plantas NT foram utilizadas como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 h a fim de propiciar a aderência das proteínas na parede dos poços. Em seguida foram bloqueadas por incubação em 3% de BSA dissolvido em PBS (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 17 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 M NaCl, 27 mM KCl, pH: 7.4) e 0,05% de Tween 20, durante a noite, a 37 °C.

Para detecção da proteína foi adicionado o anticorpo pabCry10Aa (1: 1000 em 2,0 % BSA/PBS) durante 2 h, a 37 °C. Depois de lavagens (PBS + 0,05 % Tween-20), as cavidades foram incubadas com o anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG (HRP-Bio Rad) conjugado com peroxidase alcalina (1:3000 em 1,0 % BSA/PBS-T) durante 2 h a 37 °C. Após as lavagens com PBS+0,05 % de Tween®, a detecção foi realizada por adição de Tetra-methyl-benzidine Dihydrochloride (TMB) dissolvido em 10 mL de tampão ácido cítrico (fosfato de 0,2 M sódio dibásico, ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0), suplementado com 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 M), antes do uso. A reação foi parada utilizando 3 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e o ensaio foi realizado em triplicadas biológicas e técnicas, cuja absorbância foi medida a 450 nm. Para obter a curva padrão foi utilizada a toxina Cry10Aa produzida em bactérias (0-300 ng). Todos os dados foram analisados estatisticamente pelo software análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste *t* de Student com 0,05% de probabilidade.

#### **4.9. Determinação do número de cópias do cassete de DNA (pBSK-*uceA1.7::cry10Aa-NOST*), em plantas de algodão $T_0$ , via PCR em tempo real e Southern blot.**

O número de cópias do cassete de transformação presentes no genoma do algodão foi determinado, de acordo com Yang *et al.*, 2012, em eventos  $T_0$  de algodão caracterizados por qPCR  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ . O DNA genômico da planta controle (NT) e das plantas de algodão transformadas foi extraído a partir de 100 mg de folhas frescas utilizando o kit DNeasy Planta Maxi (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada tanto por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm quanto em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. Em cada experimento foram usados 20 ng do DNA vegetal. A quantificação relativa do gene *ahas* em relação ao gene endógeno *ubc1* foi usada para calcular o número de cópias do transgene utilizando os primers AHASF, AHASR, GhUBC1F e GhUBC1R (Tabela 2).

Primeiramente, a quantidade absoluta dos dois genes foi determinada em relação a curvas padrão. Duas curvas padrão foram obtidas através da representação gráfica dos valores de Ct em relação a diluições em série do plasmídeo pBSK-ahas-ubc1 ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ ). O número de cópias do plasmídeo foi calculada com os valores de Ct com base nas curvas de normalização. O número relativo de cópia do gene-alvo foi obtido pela relação entre a quantidade absoluta de gene alvo pela do gene endógeno na mesma amostra.

Para o Southern Blot genômico (Sambrook & Russell, 2001) o DNA (20 ng) foi digerido com *XbaI* (corte único no cassete de expressão), submetido a electroforese em gel de agarose a 0,8 %, seguido de transferência de membrana de nylon. O DNA foi sondado com digoxigenina e o gene *cry10Aa* de 410-pb (amplificado com primers CRY10F e CRY10R; Tabela 02). A amplificação da sonda do gene *cry10Aa* foi detectada com anticorpo anti-digoxigenina conjugada com fosfatase alcalina (AP) e revelada por meio de kit de substrato conjugado AP (BIO-RAD®).

#### **4.10. Identificação dos sítios de inserção do transgene.**

Os locais de inserção do transgene foram identificados utilizando Universal Genoma Walker™ 2.0 Kit (Clontech Laboratories, Inc.) PCR, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi isolado a partir de folhas jovens dos eventos GM T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> utilizando o kit DNeasyPlant Mini Kit (Qiagen, Alemanha). A concentração de DNA foi estimada utilizando espectrofotômetro (NanoDrop 2000, ThermoScientific, Massachusetts, EUA) e a integridade foi avaliada em eletroforese, em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Aproximadamente 2,5µg de DNA genômico altamente puro foram digeridos com as enzimas de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* ou *StuI* overnight ou durante 16 horas. Em seguida, as amostras de DNA digerido foram purificadas utilizando NucleoSpin Gel e kit de limpeza de PCR (Macherey-Nagel) e depois ligadas ao adaptador fornecido pelo kit Genome Walker utilizando T4 DNA ligase a 16 °C durante a noite para produzir seis bibliotecas GenomeWalker. Três primers reversos específicos de gene (GSP1, GSP2 e GSP3) foram projetados a partir da extremidade 5' do T-DNA de Cry10Aa (visando a borda esquerda do T-DNA e o início da sequência promotora AHAS) para amplificar o fragmento com dois iniciadores adaptadores (AP1 e AP2) por PCR. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando Advantage 2 PCR Kit (Clontech Laboratories, Inc.), os produtos de PCR purificados foram ligados ao vector pGEMTeasy (Promega), multiplicado em *E. coli* DH5a. O DNA plasmidial de clones positivos foi purificado utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN) e sequenciado utilizando iniciadores universais T7 e SP6 pelo método de Sanger (Geumcheon-gu, Seul, Coreia do Sul). As análises dos cromatogramas foram realizadas

usando o software Geneious R10 (Kearse *et al.*, 2012). Contigs foram usados para realizar pesquisa de alinhamento local realizada com a ferramenta BLASTn (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990) usando como referência o genoma de *Gossypium hirsutum* v1.1 (Zhang *et al.*, 2015) disponível no Phytozome v Banco de dados .12.1 (Goodstein *et al.*, 2012).

#### **4.11. Nível de expressão do mRNA Cry10Aa em diferentes estágios de desenvolvimento ou tecidos.**

O nível de expressão do mRNA Cry10Aa foi avaliado em três diferentes estágios de desenvolvimento da planta na geração T<sub>3</sub>. Para essa avaliação foram utilizados botões florais de 3, 6 e 10 mm de diâmetro do evento 4.15.3, e botões florais de 6 mm com ou sem ovo - ovipositado por *A. grandis* (5-7 dias após a oviposição do ovo). Quatro repetições biológicas compostas por três a quatro plantas cada foram usadas (uma folha jovem e inteira ou dois a três botões florais por planta foram utilizados). As amostras foram colhidas individualmente, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. O isolamento total de RNA foi realizado utilizando o Kit de RNA da ConformPlant (Invitrogen) suplementado com PVP-40, ou utilizando o InviTrap Spin Plant Mini Kit de RNA (Stratec Molecular GMBH) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada utilizando espectrofotômetro (NanoDrop 2000, ThermoScientific, Massachusetts, EUA) e a integridade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose a 1% corada com brometo de etídio. Amostras de RNA foram tratadas com RNase 1µl livre de DNase I (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 2 µg de RNA tratado com DNase foram utilizados como modelo para a síntese de cDNA usando o iniciador Oligo- (dT) 20 e SuperScript III RT (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi quantificado por espectrofotometria e diluído com água livre de nuclease para 200 ng/µl. Os ensaios RT-qPCR foram realizados no Sistema de PCR em Tempo Real Rápido Applied Biosystems 7500 (AppliedBiosystems, EUA) usando 400 ng de cDNA, 0,2 µM de cada primer específico para o gene e GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Todas as amostras foram realizadas em reações técnicas triplicadas. As eficiências dos primers e a amplificação específica do alvo foram confirmadas por um pico único e distinto na análise da curva de fusão. A expressão relativa (fold-change) de mRNA de Cry10Aa e mRNA de UceA1.7 endógeno (Gohir.A11G023700) foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e a taxa de expressão normalizada; (Rao *et al.*, 2013)] com GhUBQ14 e GhPP2A1 como genes de referência endógenos (Artico *et al.*, 2010).

#### **4.12. Avanço de geração: autofecundação dos botões florais.**

Após seleção de plantas de algodão T<sub>0</sub> com resultados promissores em caracterização molecular e bioensaios, todos os botões florais que emergiram nestas plantas foram selados para evitar a fertilização cruzada.

Então, 15 sementes de cada planta T<sub>0</sub> selecionada foram plantadas e aclimatadas em casa de vegetação originando assim a geração T<sub>1</sub> e em seguida as plantas foram analisadas molecularmente utilizando-se estratégias de caracterização similar às plantas T<sub>0</sub>. Onze eventos T<sub>1</sub> com alta mortalidade e alta expressão da proteína Cry10Aa foram selecionados e os botões florais foram selados e obtidas, assim, sementes para plantio da próxima geração.

Dez sementes de cada linhagem T<sub>1</sub> foram plantadas obtendo assim a geração T<sub>2</sub>. Para a análise molecular das linhagens T<sub>2</sub>, 10 sementes representando plantas com maior expressão da proteína Cry10Aa e maior mortalidade em bioensaios com o inseto alvo foram selecionadas e plantadas para obtenção da geração T<sub>3</sub>. As plantas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> geradas foram aclimatadas em casa de vegetação para futura caracterização molecular similar as plantas T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>.

#### **4.13. Bioensaios com *Anthonomus grandis*.**

Botões florais e folhas de plantas de algodão transgênicas da geração T<sub>0</sub> e NT foram submetidos a bioensaios com *A. grandis*. Os insetos foram originados da plataforma de criação de insetos da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, mantidos uma dieta de criação padrão de 27±2 °C, 70 ± 10% de umidade relativa e fotoperíodo de 14h de luz (Monnerat, 2000).

Primeiramente, botões florais (em torno de 6 mm de diâmetro) foram perfurados (logo acima do receptáculo floral) com o auxílio de uma broca. Em seguida, foi inoculado 1 ovo de *A. grandis* por orifício o qual foi selado com vaselina para evitar a desidratação do ovo. Após 20 dias, foi medida a taxa de mortalidade das larvas. O experimento foi realizado em triplicada biológica e cada unidade experimental foi constituída por dez botões florais por planta.

No segundo ensaio biológico, insetos adultos foram alimentados com folhas destacadas de plantas transgênicas T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> e NT. Um inseto adulto foi colocado em cada placa de Petri contendo uma folha e incubados em sala aclimatizada com fotoperíodo de 14 h de luz, a 27 ± 2 °C. A análise de mortalidade foi observada a cada 24 h. Após 15 dias, foi calculada a taxa de mortalidade final dos insetos. O bioensaio foi realizado em triplicata e cada unidade experimental consistiu de 10 folhas por planta.

Para análise das gerações T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, fêmeas fertilizadas de *A. grandis* criadas em condições de campo foram utilizadas em bioensaios com botões florais para avaliação do

ataque do inseto em campo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com fotoperíodo de 14 h de luz, a  $27 \pm 2$  °C. Os botões florais foram protegidos com telas próprias para bioensaio.

Em cada botão foi colocado uma fêmea adulta e fertilizadas, as fêmeas foram mantidas por 48 h. Em seguida foi observado a oviposição nas estruturas florais e os insetos foram retirados. Após 25 dias foi avaliada a mortalidade, a emergência de insetos adultos e o abortamento de botões florais. O bioensaio foi realizado em triplicata experimental e cada ensaio foi realizado em dez botões florais por planta, totalizando 30 botões florais por planta.

Todos os bioensaios foram analisados estatisticamente pelo software ANOVA e as médias comparadas pelo teste *t* de Student com 0,05% de probabilidade. A correção de mortalidade (CM) foi estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (Schneider- Orelli, 1947),  $M (\%) = (TC) / 100 - C) \times 100$ , em que T (%) é a mortalidade no tratamento e C (%) é a mortalidade no controle.

#### **4.14. Desempenho agrônômico e potencial de rendimento das plantas GM CryAa**

**Análise ecofisiológica:** sementes Cry10Aa GM foram germinadas em papel Germitest® e as plântulas foram transplantadas e cultivadas em sacos de solo contendo 6 kg de latossolo misturado com adubo orgânico e suplementados periodicamente com Osmocote Classic® 14-14-14 (ICL Brasil Ltda). Dezesesseis plantas da geração T<sub>3</sub> das plantas da linhagem T<sub>2</sub> 9.4.3, 82.14.6, 14.13.4, 8.11.7, 5.1.8, 4.15.3 e NT foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente em condições de capacidade de campo. Em seguida, foram aplicados os tratamentos de déficit hídrico ( $\Psi_w$  -0,85 a -0,95 MPa) e capacidade de campo ( $\Psi_w$  -0,03 MPa). A umidade do solo foi sistematicamente monitorada utilizando-se um psicrômetro WP4C PotentiaMeter (Decagon WP4, Pullman, WA, EUA) e os níveis de água no solo foram ajustados a cada 10 horas. A análise ecofisiológica foi realizada 4 dias após todo o conjunto de plantas alcançar o nível desejável de déficit hídrico. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições para os dois tratamentos e uma planta por repetição. As medições de troca gasosa foram realizadas utilizando um sistema analisador de gás por infravermelhos convencional portátil com uma câmara de folhas automática de 6,25 cm<sup>2</sup> (LCpro-SD; ADC BioScientificLtd., Hoddesdon, Herts, UK). A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) foi fixada em 1400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , usando uma fonte de luz LED vermelho-azul embutida na folha. Os parâmetros de taxa fotossintética líquida ( $A_n$ ), concentração de CO<sub>2</sub> intercelular ( $C_i$ ), taxa de transpiração foliar (E) e condutância estomática ( $G_s$ ) foram medidos. Todas as medidas foram realizadas em folhas jovens e totalmente expandidas no topo das plantas. Os dados foram analisados

estatisticamente por ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Produção de capulhos, sementes e fibras por planta:** Plantas de vários eventos (12 eventos segregantes e 6 eventos independentes) mantidos em capacidade de campo ou submetidos a déficit hídrico foram avaliados para número de botões por planta aos 30 e 40 dias (eventos segregantes ou independentes, respectivamente) após o início da floração. Além disso, peso de fibra (sem sementes), número de sementes por capulho de algodão e peso de 10 sementes foi determinado a partir de 2 capulhos de algodão por planta ( $n = 8$  a 9 plantas por evento). Para isso, após o ensaio de déficit hídrico, as plantas foram novamente irrigadas, periodicamente fertilizadas com adubo Osmocote, em três a cinco capulhos de algodão por planta. Todos os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Desenho do cassete de DNA para transformação de plantas de algodão via biobalística

A avaliação *in silico* do modelo tridimensional *Cry10Aa* (Figura 1) e a reavaliação *in vitro* da sua toxicidade (Tabela 3) são análises importantes para projetar um cassete de DNA para posterior transformação. Além disso, a escolha de um promotor é crucial para a produção de toxinas em níveis desejáveis (Figura 2).

Foi realizado o estudo de alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos para escolher o melhor modelo, ou *Cry1Ac* ou *Cry2Aa* (PDB ID: 1I5P), as sequências de proteínas dos modelos candidatos foram alinhadas usando o software MUSCLE (Edgar, 2004). Os valores de cobertura de alinhamento de *Cry10Aa* com *Cry1Ac* e *Cry2Aa* foram 0,86 (22-678) e 0,38 (27-321), respectivamente. Os valores de identidade foram 26,42% e 17,31%, respectivamente (Figura 1a).



similaridade estrutural com o respectivo domínio em Cry2Aa, enquanto os domínios II e III possuem maior similaridade com as regiões cognatas da proteína Cry1Ac. Através do estudo de relação filogenética entre as toxinas Cry1Ac, Cry2Aa e Cry10Aa, é possível confirmar que a toxina Cry10Aa possui menor distância filogenética com a proteína Cry1Ac (Figura 1d).

Foi realizado o bioensaio *in vitro* em diente artificial com a proteína Cry10Aa purificada, para avaliação da toxicidade de Cry10Aa contra larvas de *A. grandis*. A toxina apresenta uma LC<sub>50</sub> de 6,35 µg mL<sup>-1</sup> contra o bicudo do algodoeiro, o que indica uma atividade similar da proteína Cry10Aa para o mesmo inseto encontrada por Aguiar *et al.* (2012) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores da LC<sub>50</sub> de proteína Cry10Aa recombinante contra *Anthonomus grandis*<sup>1</sup>

Amostra	N	LC <sub>50</sub> (FL) µg mL <sup>-1</sup>	Referência
Cry10Aa protein <sup>2</sup>	10	6.35 (5.61 – 7.09)	Presente trabalho
Cry10Aa protein	25	7.12 (5.27 – 9.80)	Aguiar et al., 2012
IPS82 <i>Bt</i> strain	25	740 (610 – 910)	Aguiar et al., 2012
S1804 <i>Bt</i> strain	25	300 (250 – 360)	Aguiar et al., 2012

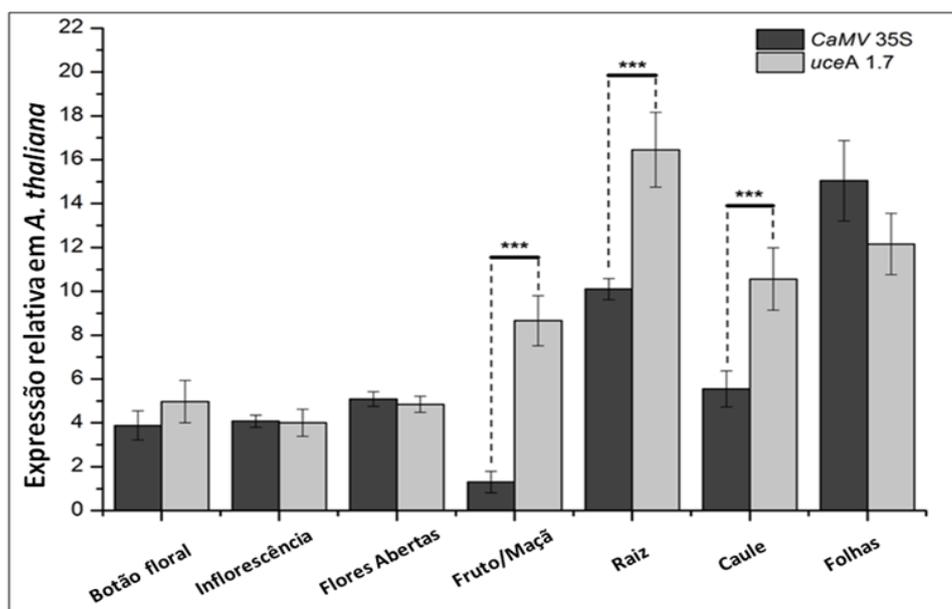
<sup>1</sup> Bioensaio *in vitro* da toxicidade de Cry10Aa contra larvas de *A. grandis*.

<sup>2</sup> Expressão heteróloga da toxina Cry10Aa recombinante em *Escherichia coli*.

**Bt:** *Bacillus thuringiensis*; **LC:** concentração letal; **N:** Número de insetos usados.

O promotor constitutivo da enzima de conjugação a ubiquitina de algodão (*uceA* 1.7), foi escolhido como promotor do gene de interesse, em vez do promotor *CaMV35S*, que é comumente utilizado nos cassetes de transformação para obtenção de plantas GM. Para justificar essa escolha foi realizada a análise comparativa dos promotores candidatos. Para isso, os níveis de mRNA de *uidA* (isto é, gene codificador de GUS) em plantas de T<sub>3</sub> GM *A. thaliana* dirigidas por *CaMV35S* ou *uceA* 1.7 foram medidos em vários tecidos (botões florais, inflorescências, flores abertas, fruto/maçã, raízes, caules e folhas) através de qPCR.

Embora os níveis de mRNA do *uidA* impulsionados pelo promotor de algodão *uceA* 1.7 fossem similares àqueles impulsionados pelo promotor *CaMV35S* em todos os estágios de flor, o promotor *uceA* 1.7 apresentou níveis mais altos de transcritos de *uidA* do que o promotor *CaMV35S* em frutos (sete vezes) e tecidos vegetativos, como as raízes e o caule (duas vezes mais- Figura 2). Estes resultados sugerem também que o promotor *uceA* 1.7 é provavelmente mais forte e mais específico que o *CaMV35S* em botão floral (uma vez a mais), que é o principal alvo de ataque do *A. grandis*. Como o objetivo deste estudo é a proteção do algodão contra o ataque de *A. grandis*, a expressão de Cry10Aa dirigida pelo promotor de *uceA* 1.7 é, provavelmente, mais apropriada do que aquela dirigida pelo promotor *CaMV35S* em algodão GM. Portanto, o promotor de algodão *uceA* 1.7, em vez de *CaMV35S*, foi usado para projetar a cassette de transformação Cry10Aa.



**Figura 2. Análise de promotores candidatos para design do cassete de expressão Cry10Aa para a transformação do algodão.** Os resultados sugerem que o promotor de *uceA 1.7* é provavelmente mais forte e mais específico que o *CaMV35S* em frutos de algodão, que são os principais alvos do *A. grandis*. Sendo assim, o promotor de algodão *uceA 1.7* foi usado para designar o cassete de transformação Cry10Aa. Os asteriscos representam o nível de significância estatística entre a expressão de *uidA* dirigida pelo promotor *CaMV35S* ou *uceA 1.7* (teste de Studentt): (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p < 0,001$ . Após normalização baseada na expressão de genes endógenos de plantas, os valores foram plotados em relação ao valor de expressão mais baixo (excluindo as plantas não transformadas NT) definido como nível de expressão 1 (um).

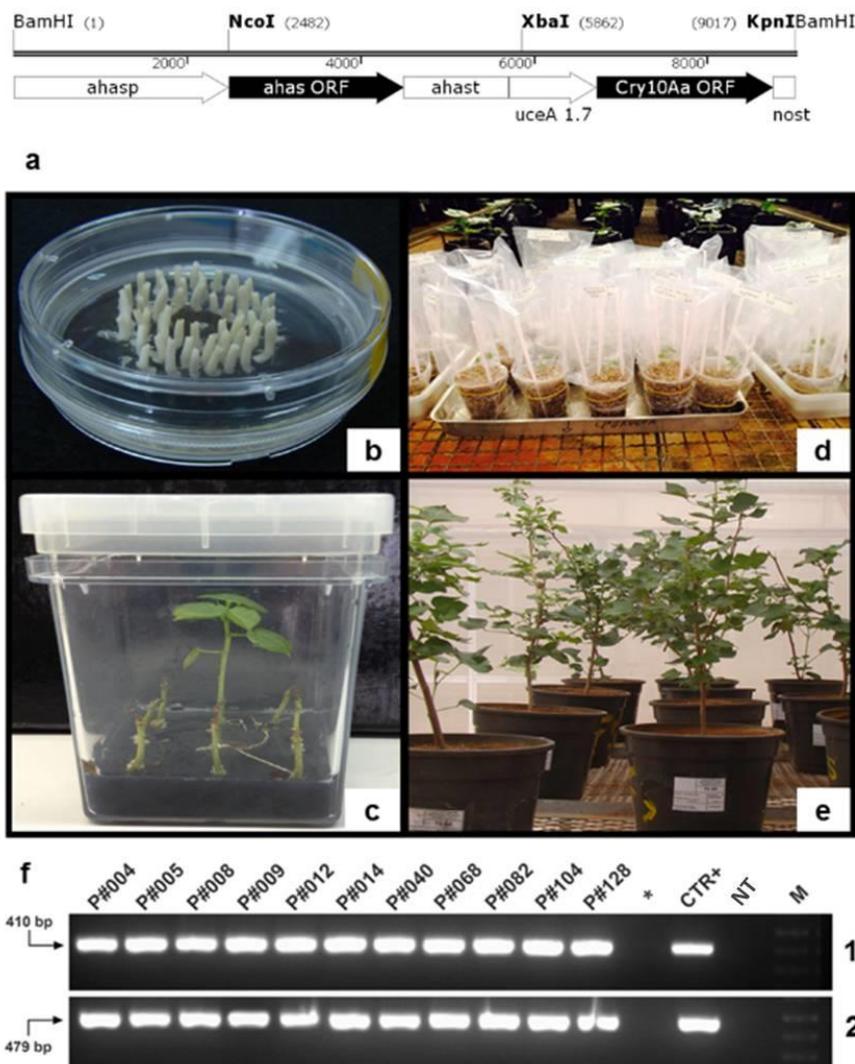
## 5.2. Geração bem-sucedida de plantas de algodão Cry10Aa T<sub>0</sub> GM

### 5.2.1. Obtenção do cassete de transformação genética e de plantas GM T<sub>0</sub>.

O cassete de transformação genética foi desenvolvido no vetor pBSK e é constituído pelo promotor e terminador do gene *ahas*, sequência codificadora do gene *ahas* de *Arabidopsis thaliana*, como gene de seleção para plantas transformadas *in vitro*. O gene *ahas* (ORF) possui uma mutação na posição 653, resultando em uma substituição de uma serina por uma asparagina, o que confere tolerância ao herbicida imazapyr, um grupo químico das imidazolinonas (Aragão *et al.*, 2000). O gene *cry10Aa* é regulado pelo promotor relacionado a ubiquitinação de algodão (*uceA 1.7*) (Grossi-de-Sá *et al.*, 2012) e continha o terminador *nos* (*nopaline synthase polyadenylation signal*), resultando assim no cassete pBSK-*uceA1.7::cry10Aa-NOST* (Figura 3a).

Foram bombardeados 5479 eixos embrionários de algodão (Figura 3b), dos quais 151 plântulas de algodão (Figura 3c) foram selecionadas por apresentarem resistência ao Imazapyr conferido pelo gene *ahas*. Após a aclimação em casa de vegetação (Figura 3d, e), a análise de PCR confirmou a inserção do cassete de expressão no genoma de 30 plantas de algodão (Figura 3 e, f). A amplificação por PCR dos fragmentos de 410pb e 479pb indicaram a inserção dos genes *cry10Aa* e *ahas*, respectivamente (Figura 3f-1, f-2), no genoma das plantas

de algodão. Como esperado, nenhuma amplificação foi detectada em plantas não transformadas (NT).



**Figura 03. Transformação de algodão via biobalística com a cassete de expressão *Cry10Aa* e seleção de amplificação por PCR de transformantes de algodão.** (a) Diagrama esquemático do cassete de expressão *Cry10Aa* (*uceA1.7::cry10Aa-nost-ahas*) usado para transformação de embrião de algodão via biobalística; (b) Eixos embrionários de algodão preparados para o bombardeamento do meristema apical com a cassete de transformação com o gene *cry10Aa*; (c) Seleção *in vitro* de algodão geneticamente modificado em meio contendo o agente de seleção Imazapyr. O marcador de seleção *ahas*, presente no cassete de expressão confere resistência a herbicidas imidazolinona, como o Imazapyr; (d) Aclimação de plantas de algodão T<sub>0</sub> GM em casa de vegetação, utilizando o substrato vermiculita; (e) Aclimação de plantas de algodoeiro *Cry10Aa* T<sub>0</sub> GM em casa de vegetação, utilizando solo como substrato (plantas de 1 ano de idade); (f) detecção de plantas T<sub>0</sub> de algodão GM via PCR. O DNA genômico foi extraído das folhas de plantas selecionadas para amplificar (1) o gene *cry10Aa* (amplicon de 410 pb) e (2) o gene *ahas* (amplicon de 479 pb), ambos presentes na cassete de expressão *Cry10Aa* usado para a transformação do algodão. (\*) asterisco representa um poço vazio; *CTR +*: controle positivo; *M*: marcador molecular de 1,0 kb (INVITROGEN® Cat. #10787018); *NT*: plantas não transformadas.

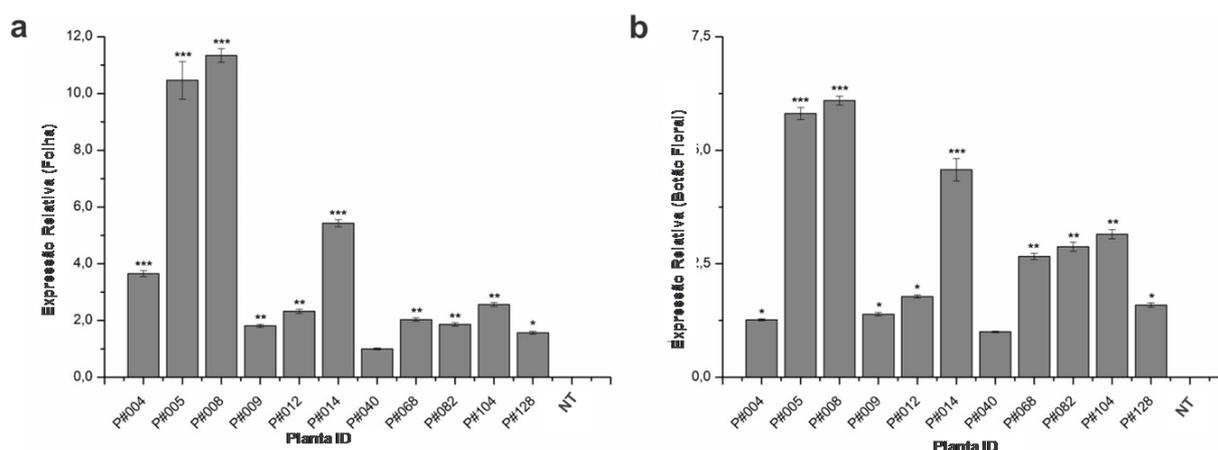
Este resultado indica uma média de eficiência de transformação de aproximadamente 0,5%. Todas as plantas T<sub>0</sub> eram férteis e exibiam crescimento e fenótipos normais em comparação com as de plantas de algodão NT (Figura 4).



**Figura 4. Comparação fenotípica entre plantas de algodão *Cry10Aa* e plantas não transgênicas.** As fotos comparam os fenótipos macroscópicos do algodão *Cry10Aa* P#008 com o tipo selvagem (NT - BRS 372) aos quatro meses de idade. Em (a) é mostrada a visão de toda a parte aérea de plantas transgênicas e NT. Em (b) e (c), as estruturas florais de NT e P # 008 são respectivamente comparadas, enquanto em (d) e (e) as folhas das mesmas plantas são comparadas. Tanto as plantas NT quanto as transgênicas têm um ciclo de vida médio-tardio e todas as estruturas vegetativas (aéreas) e reprodutivas são morfologicamente similares. Esta comparação se estende aos outros eventos de transformação de T<sub>0</sub> (P # 004, P # 005, P # 009, P # 012, P # 014, P # 040, P # 068, P # 082, P # 104 e P # 128).

### 5.2.2. Avaliação da expressão e do número de cópias do cassete de expressão do transgene *cry10Aa*:

Entre as 30 plantas de algodão T<sub>0</sub> GM com PCR positivo, apenas 11 plantas apresentaram um significativo nível de expressão do transgene *cry10Aa*, medido por qPCR (transcrito *cry10Aa*) e ELISA (proteína *Cry10Aa*), que foram confirmados por análise Western blot de ambos tecidos foliares e florais (Figuras 5, 6).



**Figure 5. Expressão relativa do transcrito *cry10Aa* medida por PCR quantitativo (qPCR) em plantas de algodão *Cry10Aa* T<sub>0</sub> GM.** Expressão relativa do transcrito *cry10Aa* nas folhas (a) e botões florais (b) de onze plantas de algodão T<sub>0</sub> selecionadas. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (teste *t* de Student): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p \leq 0,001$ . Após normalização baseada na expressão de genes endógenos de plantas, os valores foram plotados em relação ao menor valor de expressão (excluindo as plantas NT).—P#040 definido como nível de expressão 1 (um). NT: planta não transformada.

O resultado da qPCR revelou que o transcrito do transgene *cry10Aa* foi expresso nas 11

plantas em folhas (Figura 5a; Tabela 4) e botões florais (Figura 5b; Tabela 4). Os níveis de expressão do transcrito *cry10Aa* em ambos os tecidos variaram entre plantas GM, embora um padrão foi observado: uma expressão relativa alta nas folhas era invariavelmente acompanhada de uma expressão relativa alta em botões florais dentro da mesma planta GM. O mesmo padrão também foi observado para níveis de expressão relativa (Figura 5). Notavelmente, o evento de algodão P#008 apresentou o maior nível de expressão do transcrito *cry10Aa* nas folhas e botões florais, enquanto o evento P#040 apresentou os menores níveis em ambos os tecidos entre todas as 11 plantas transformadoras (Figura 5).

**Tabela 4.** Quantificação do transcrito *cry10Aa* via qPCR.

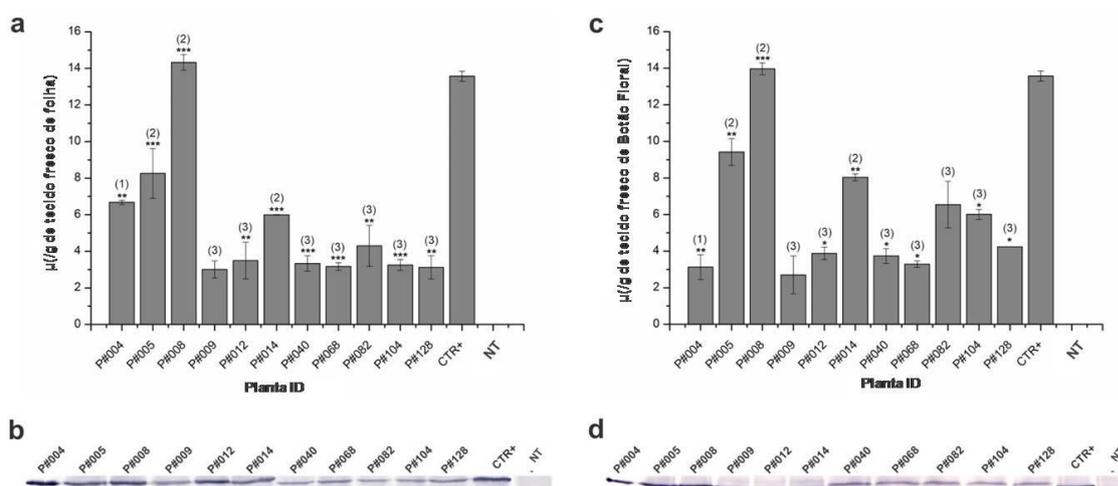
Planta ID	Gene alvo e gene endógeno (C <sub>i</sub> ) <sup>1</sup>					
	<i>cry10Aa</i> <sup>2</sup>		<i>Ghubq14</i> <sup>3</sup>		<i>Ghpp2a1</i> <sup>3</sup>	
	Folha	Botão Floral	Folha	Botão Floral	Folha	Botão Floral
<b>P#004</b>	25.40 ± 0.09	27.55 ± 0.05	20.84 ± 0.05	20.85 ± 0.05	24.29 ± 0.05	24.20 ± 0.02
<b>P#005</b>	25.08 ± 0.20	26.54 ± 0.06	22.20 ± 0.06	21.90 ± 0.04	25.32 ± 0.06	24.51 ± 0.40
<b>P#008</b>	24.96 ± 0.05	26.48 ± 0.03	21.90 ± 0.04	22.20 ± 0.03	25.60 ± 0.08	24.73 ± 0.63
<b>P#009</b>	26.43 ± 0.08	27.43 ± 0.08	21.24 ± 0.05	21.19 ± 0.04	23.92 ± 0.07	24.97 ± 0.69
<b>P#012</b>	26.45 ± 0.09	27.45 ± 0.03	21.74 ± 0.08	21.69 ± 0.04	24.18 ± 0.06	25.18 ± 0.65
<b>P#014</b>	25.97 ± 0.06	26.84 ± 0.17	22.14 ± 0.05	22.11 ± 0.05	25.26 ± 0.06	25.38 ± 0.50
<b>P#040</b>	27.56 ± 0.07	27.84 ± 0.02	20.80 ± 0.14	20.99 ± 0.07	24.90 ± 0.04	25.60 ± 0.08
<b>P#068</b>	27.45 ± 0.07	27.68 ± 0.04	22.74 ± 0.14	22.70 ± 0.12	24.79 ± 0.04	25.56 ± 0.15
<b>P#082</b>	27.07 ± 0.08	27.07 ± 0.08	21.71 ± 0.14	21.75 ± 0.15	24.81 ± 0.05	25.50 ± 0.15
<b>P#104</b>	26.81 ± 0.02	27.13 ± 0.06	22.00 ± 0.12	22.20 ± 0.11	24.93 ± 0.12	25.43 ± 0.13
<b>P#128</b>	26.58 ± 0.09	27.51 ± 0.06	20.99 ± 0.07	20.80 ± 0.14	24.03 ± 0.04	25.39 ± 0.11
<b>A. E. (%)<sup>4</sup></b>	81.74 ± 3.57	82.20 ± 4.12	83.98 ± 3.67	84.89 ± 2.79	85.93 ± 4.49	86.75 ± 5.35

<sup>1</sup>Média aritmética e erro padrão correspondente a todos os replicados técnicos e biológicos. <sup>2</sup> Gene do alvo. <sup>3</sup> Genes endógenos. <sup>4</sup>Aplicação da eficiência (*cry10Aa* primers: CRY10F e CRY10R; *Ghubq14* primers: UBQ14F e UBQ14R; *Ghpp2a1* primers: PP2A1F e PP2A1R - ver Tabela 2).

Os quatro principais eventos GM em termos do nível de expressão do transcrito *cry10Aa* foram P#004, P#005, P#008 e P#014. Entre eles, o nível de expressão da proteína Cry10Aa variou de 3,5 a 11,0 vezes nas folhas (Figura 5a) e de 4,2 a 5,6 vezes em botões florais (Figura 5b). A análise por ELISA e Western blot utilizando extratos proteicos totais de folhas e botões florais indicaram diferentes níveis de produção da proteína Cry10Aa entre as 11 plantas GM de algodão (Figura 6).

O ELISA revelou que as plantas GM podem expressar altos níveis da toxina Cry10Aa em ambos os tecidos: folhas e botões florais, variando de 3,1 a 14  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  tecido fresco em folhas (Figura 6a) e 3,1-13,9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  tecido fresco em botão floral (Figura 6c).

Na análise de Western blot o extrato total de ambos os tecidos mostrou a presença da proteína Cry10Aa com aproximadamente 77 kDa (Figura 6b, d), sendo que o mesmo padrão não foi observado nos extratos de plantas não transformadas.

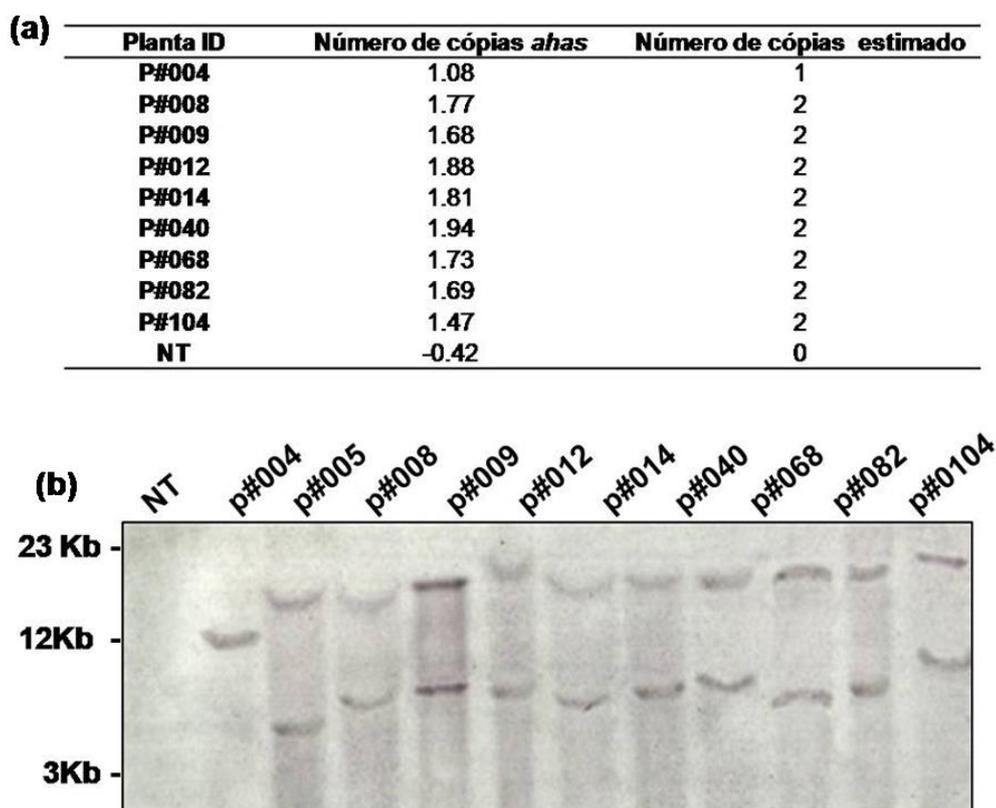


**Figura 6. Imunodeteção da proteína Cry10Aa em algodoeiro Cry10Aa T<sub>0</sub> GM.** (a e c) Quantificação por ELISA indireto e (b e d) Western blot imunodeteção da expressão da proteína Cry10Aa nas folhas (a e b) e botões florais (c e d) de plantas de algodoeiro Cry10Aa T<sub>0</sub> GM. O anticorpo primário usado em todos os experimentos foi o anti-Cry10Aa policlonal (ver Material e Métodos para detalhes). O peso molecular de Cry10Aa observado no Western foi de 77.7 kDa. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (teste *t* de Student): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p \leq 0,001$ . Valores de expressão de cada amostra foram comparados com o controle, que foi o que apresentou menor nível de expressão (excluindo plantas não transformadas). Plantas de algodão GM foram agrupadas de acordo com o número de cópias do transgene *cry10Aa* no genoma e o nível de expressão da proteína: (1) alto nível de expressão de Cry10Aa com uma cópia do transgene; (2) elevado nível de expressão de Cry10Aa com duas cópias de transgene; (3) nível de expressão do intermediário Cry10Aa com duas cópias de transgene. A classificação foi feita de acordo com o teste estatístico da Turkey. **CTR +**: controle positivo da proteína recombinante Cry10Aa purificada de *Escherichia coli*; **NT**: plantas não transformadas.

A determinação do número de cópias do cassete de expressão do transgene *cry10Aa* no genoma de plantas T<sub>0</sub> foi baseada no qPCR<sup>2-ΔΔCT</sup>. As curvas de amplificação para os genes *ahas* e *ubc1* demonstraram boa reprodutibilidade da determinação do número de cópias por qPCR, quando comparado com a análise por Southern blot. Baseado na concentração inicial do modelo (LogC<sub>0</sub>) e valores de Ct, as seguintes equações de curva padrão para *ahas* e *ubc1* foram obtidas:  $Y_{AHAS} = -3,158X + 22,29$  e  $Y_{UBC1} = -4,2X + 27,76$ , respectivamente.

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram de 0,997 e 0,998 para *ahas* e *ubc1*, respectivamente, indicando boa reprodutibilidade da relação linear. Usando estas equações, o número de cópias do cassete de expressão do transgene *cry10Aa* foi calculado para as 11 plantas de algodão GM T<sub>0</sub> (Figura 7a) e encontrado ser dois para 10 de todas as plantas GM analisadas (Figura 7a).

A determinação do número de cópias do transgene em plantas de algodão GM T<sub>0</sub> foi corroborada pela análise clássica através da técnica de Southern Blot, que demonstrou que todos os transformantes de algodão T<sub>0</sub> apresentaram duas cópias do transgene *cry10Aa*, com exceção do evento P#004, que apresentou apenas uma única cópia (Figura 7b).

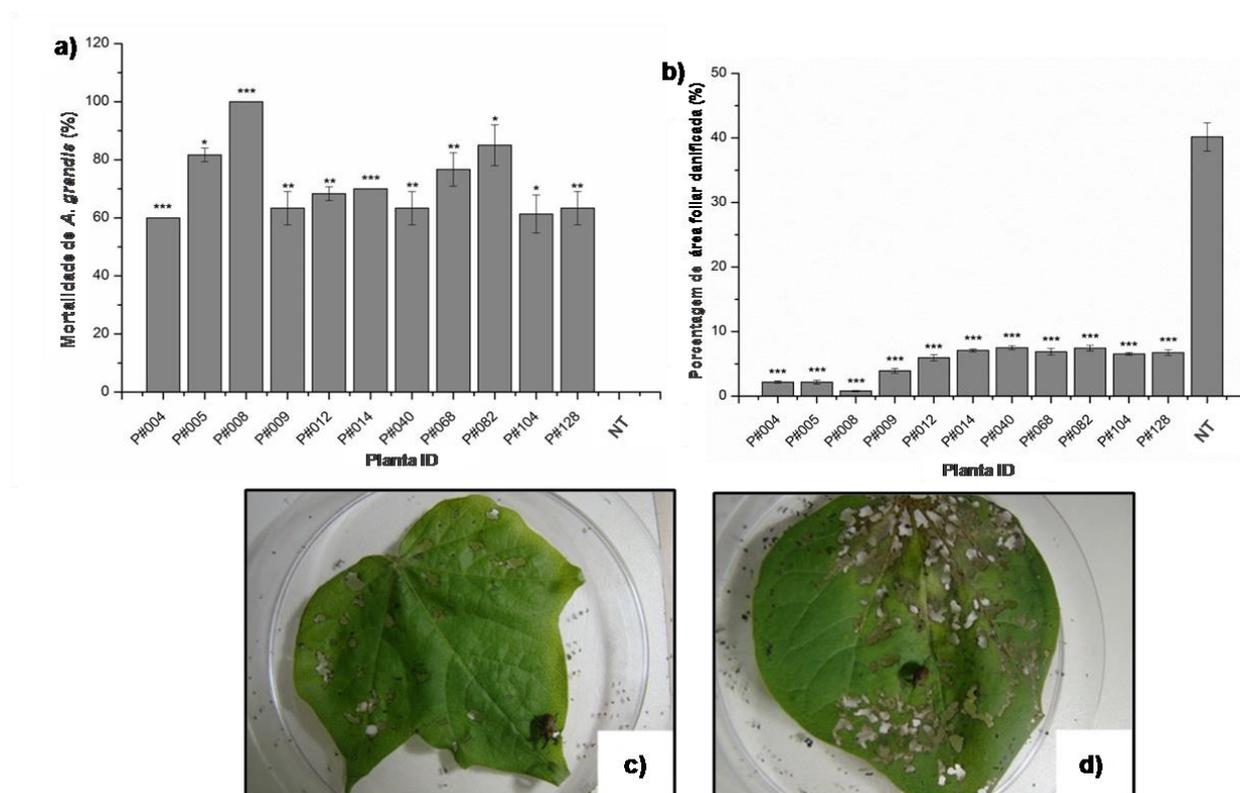


**Figura 7. Número de cópias do cassete de expressão Cry10Aa em plantas T<sub>0</sub> de algodão GM.**

(a) PCR quantitativo (qPCR) baseado em qPCR  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , calculado a partir da presença do gene *ahas*; (b) análise Southern blot. O DNA genômico de onze plantas de algodão Cry10Aa T<sub>0</sub> GM foram digeridas com *Xba*I, submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8 % por uma transferência de membrana de nylon. As bandas foram sondadas com o digoxigeninamarcada e com uma sonda do gene Cry10Aa de 410 pb (amplificado com primers CRY10F e CRY10R; Tabela 2) e detectado com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina. NT: planta não transformada.

### 5.2.3. Plantas de algodão cry10Aa na geração T<sub>0</sub> são altamente resistentes ao bicudo do algodoeiro.

Bioensaios em plantas de algodão utilizando-se larvas e insetos adultos alimentandos de folhas (Figuras 8) ou botões florais (Figura 9) de plantas T<sub>0</sub> de algodão Cry10Aa-GM, foram realizadas para avaliar a resistência das plantas GM ao bicudo do algodoeiro. A taxa de mortalidade de insetos adultos foi medida durante 15 dias de bioensaio com alimentação de folhas e variou de 60% até 100% nas plantas GM em comparação com as plantas NT (Figura 8).



**Figura 8. Taxa de mortalidade de *Anthonomus grandis* adulto alimentado com folhas de algodoeiro Cry10Aa T<sub>0</sub> GM.** (a) Taxa de mortalidade corrigida (CM) de *A. grandis* alimentado com folhas de onze plantas T<sub>0</sub> de algodão Cry10Aa GM. (b) O gráfico mostra a porcentagem de área foliar danificada por *A. grandis* em folhas de onze plantas de algodão. A taxa (área foliar danificada /área foliar total) foi obtida usando o software ImageJ (Schneider et al., 2012). (c) folhas de plantas de algodão Cry10Aa GM e (d) folhas de plantas NT (\*) Asteriscos representam o nível de significância estatística (teste *t* de Student): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p \leq 0,001$ . NT: planta não transformada.

Tendência semelhante foi observada em bioensaios utilizando as larvas do inseto para alimentação por botão floral, cujas taxas variaram entre 60 a 100% de mortalidade (Figura 9). Estes dados demonstram claramente que a proteína Cry10Aa é tóxica tanto para as larvas de bicudo, como para os insetos adultos. A mortalidade corrigida (CM) foi perfeitamente correlacionada aos efeitos do gene *cry10Aa* na sobrevivência de adultos no bioensaio de alimentação foliar, assim como na emergência de adultos e morte de larvas no bioensaio com alimentação por botão floral (Tabela 5).

**Tabela 5.** Taxa de mortalidade (%) de adultos de *A. grandis* alimentados com tecidos de plantas de algodão T<sub>0</sub> geneticamente modificadas (GM) e NT.

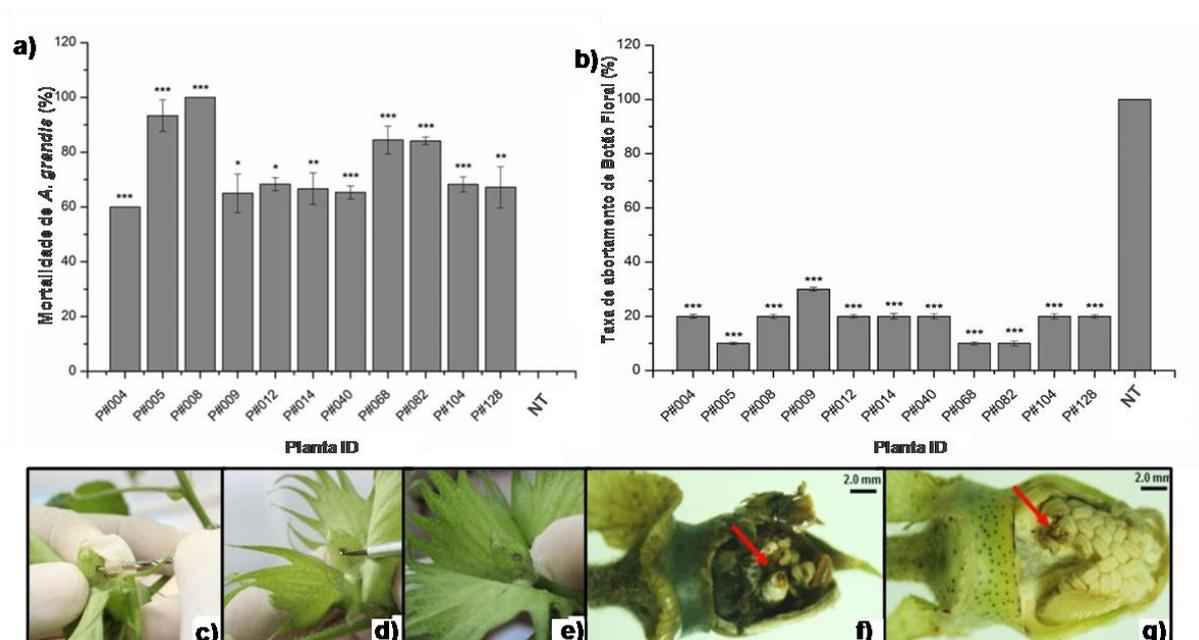
Planta ID	N <sup>1</sup>	Botão floral	CM <sup>2</sup> (%)	Folhas (%)	CM <sup>2</sup> (%)
<b>P#004</b>	30	50.75 (± 0.00)	60.00	50.13 (± 0.00)	60.00
<b>P#005</b>	30	78.52 (± 10.72)	87.78	83.46 (± 5.77)	93.33
<b>P#008</b>	30	90.75 (± 0.00)	100.00	90.13 (± 0.00)	100.00
<b>P#009</b>	30	54.08 (± 5.77)	63.33	63.46 (± 15.28)	73.33
<b>P#012</b>	30	49.08 (± 11.79)	58.33	52.35 (± 10.72)	62.22
<b>P#014</b>	30	65.19 (± 7.70)	74.44	56.79 (± 5.77)	66.67
<b>P#040</b>	30	54.08 (± 5.77)	63.33	55.407 (± 2.41)	65.28
<b>P#068</b>	30	67.41 (± 5.77)	76.67	74.57 (± 5.09)	84.44

<b>P#082</b>	30	70.75 ( $\pm$ 10.00)	80.00	74.25 ( $\pm$ 1.37)	84.13
<b>P#0104</b>	30	44.08 ( $\pm$ 11.55)	53.33	58.38 ( $\pm$ 2.75)	68.25
<b>P#0128</b>	30	54.08 ( $\pm$ 5.77)	63.33	57.35 ( $\pm$ 7.52)	67.22
<b>NT</b>	30	9.25 ( $\pm$ 1.12)	-	9.87 ( $\pm$ 1.45)	-

<sup>1</sup>Número de bioensaios.

<sup>2</sup>Mortalidade Correlacionada (CM) estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (Schneider-Orelli, 1947), CM (%) = (TC) / (100-C) x 100, onde T (%) é a mortalidade no tratamento e C (%) é a mortalidade no controle.

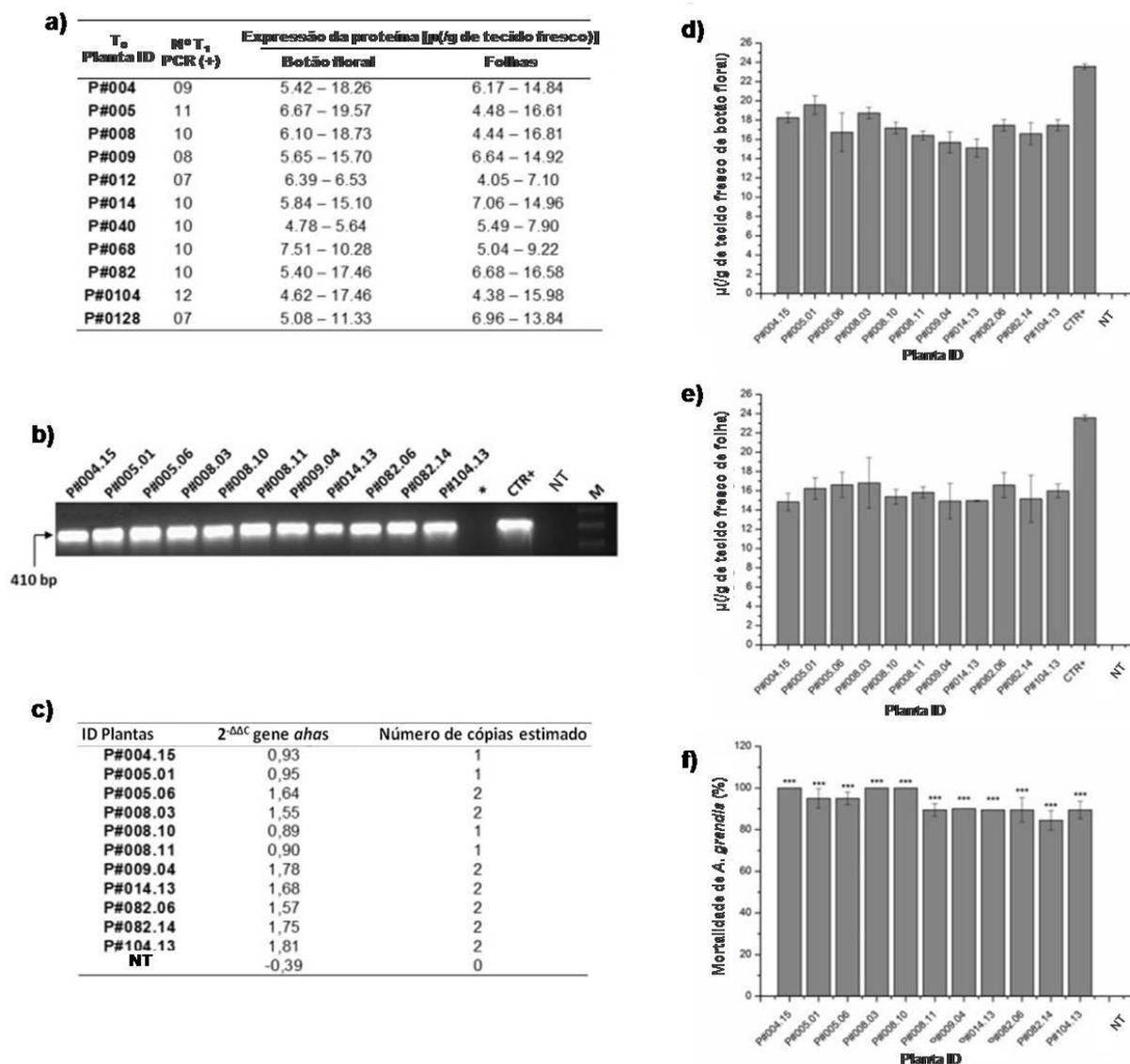
O bioensaio utilizando larvas de *A. grandis* mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas entre plantas GM e plantas NT, com destaque para o evento GM P#008, que mostrou a maior taxa de mortalidade de *A. grandis* (100%) em ambos os tecidos. Curiosamente, o fenótipo de resistência observado foi correlacionado com os mais altos níveis de expressão da toxina Cry10Aa nas folhas e botões florais para a mesma planta (P#008), que foi de aproximadamente 14,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido fresco (Figura 6a, c). Análises posteriores mostraram que tanto a área foliar danificada e as taxas de abortamento de botão floral causadas pelo ataque do bicudo foram significativamente menores quando comparadas com plantas não transformadas.



**Figura 9. Taxa de mortalidade de larvas *Anthonomus grandis* em algodoeiro Cry10Aa T<sub>0</sub> GM.** (a) Taxa de mortalidade corrigida (CM) de *A. grandis* alimentado por botões de florais de algodão de onze plantas de algodão T<sub>0</sub> Cry10Aa GM. (b) O gráfico mostra a porcentagem de abortamento de botões de florais em onze plantas de algodão GM que expressam as toxinas Cry10Aa e NT (controle) avaliadas durante os bioensaios (c) Um botão de cada planta T<sub>0</sub> e planta WT foi perfurado (d), e um ovo de *A. grandis* foi inoculado (e) e selado com vaselina (f). Danos nos botões de flores coletados após a inoculação de ovos de WT e plantas transgênicas (f e g respectivamente). As setas em vermelho indicam larvas nos botões florais. (\*) Asteriscos representam o nível de significância estatística (teste *t* de Student): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p \leq 0,001$ . NT: planta não transformada.

### 5.3. Análise das plantas de algodão GM T<sub>1</sub> mostra que a resistência ao ataque do bicudo-do-algodoeiro é transmitida para a próxima geração.

Para avaliar a estabilidade do transgene Cry10Aa em subseqüentes gerações, foram semeadas 15 sementes T<sub>1</sub> de cada um dos onze eventos T<sub>0</sub> e, após a germinação, as plantas foram selecionadas por PCR. O número de plantas GM-T<sub>1</sub> PCR positivas avaliadas variou de 7 a 12, o que indica um processo de segregação transgênica e estabilização do genótipo, as plantas PCR positivas seguiram para futuras análises biomoleculares (Figura 10a).



**Figura 10. Análise de plantas de algodão Cry10Aa GM na geração T<sub>1</sub>.** (a) Resumo dos experimentos com plantas de algodão Cry10Aa T<sub>1</sub> GM. Quinze plantas T<sub>1</sub> foram analisadas para cada planta T<sub>0</sub>, e o número de plantas positivas para PCR de T<sub>1</sub> variou de 7-12. A expressão da proteína Cry10Aa para cada planta T<sub>1</sub> foi avaliada por ELISA tanto para botões florais como para folhas, variando de 4,05 a 19,57  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido fresco. Entre as plantas T<sub>1</sub> PCR-positivas selecionaram-se para análise adicional apenas aquelas com expressão da proteína Cry10Aa superior ou igual ao dobro de LC<sub>50</sub>; (b) detecção de plantas de algodão Cry10Aa T<sub>1</sub> GM através de PCR. O DNA genômico foi extraído das folhas de plantas selecionadas para amplificar o gene *cry10Aa* (fragmento de 410 pb) nas mesmas condições que estão na Figura 1f. (\*) Asterisco representa um poço vazio; CTR +: controle positivo; M: marcador molecular 1,0 kb (INVITROGEN Cat. # 10787018); (c) número de cópias do cassete *cry10Aa* em algodoeiro GM T<sub>1</sub> por PCR quantitativo (qPCR) método qPCR<sup>2-ΔΔC</sup>; (d e e) quantificação da expressão proteica nos botões florais e folhas T<sub>1</sub>, respectivamente, por meio da técnica de ELISA indireto; (f) taxa de mortalidade de adultos de *Anthonomus grandis* alimentados com folhas de

algodoeiro GM T<sub>1</sub>. Em todas as figuras, NT significa planta não transformada.

O nível de expressão da proteína Cry10Aa em todas as plantas GM T<sub>1</sub> analisadas variou de 4,62 a 19,570 µg.g<sup>-1</sup> de tecido fresco em botões florais e 4,05-16,81 µg.g<sup>-1</sup> de tecido fresco em folhas (Figura 10a), o que demonstra um discreto aumento nos níveis de expressão da toxina quando comparado com as plantas GM T<sub>0</sub> (Figura 6). Entre as 165 plantas GM T<sub>1</sub> analisadas, 11 foram selecionadas para bioensaios com *A. grandis* (Figura 10b). Os critérios de seleção foram baseados no número reduzido de cópias do cassete de transformação no genoma da planta (Figura 10c) e um nível de expressão de toxina em ambos os tecidos botões florais (Figura 10d) e nas folhas (Figura 10e) maior ou igual ao dobro da LC<sub>50</sub> calculado anteriormente no presente trabalho (Tabela 3).

Em relação aos bioensaios com *A. grandis* (Figura 10f; Tabela 6), três das onze plantas selecionadas da geração T<sub>1</sub> (P#004.15, P#008.03 e P#008.10) apresentaram resistência completa ao ataque do inseto (100% de taxa de mortalidade do bicudo), enquanto que as demais (P#005.01, P#005.06, P#008.11, P#009.04, P#014.13, P#082.06, P#082.14 e P#104.13) apresentaram níveis entre 80 e 95% de taxa de mortalidade do bicudo do algodoeiro, demonstrando a herança da característica para a próxima geração.

**Tabela 6:** Taxa de mortalidade (%) de adultos de *A. grandis* alimentados com folhas de plantas de algodão T<sub>1</sub> geneticamente modificadas (GM) e NT.

Planta ID	N <sup>1</sup>	Mortalidade (%)	CM <sup>2</sup> (%)
<b>P#004.15</b>	30	100.00 (± 0.00)	100.00
<b>P#005.01</b>	30	95.00 (± 3.53)	95.00
<b>P#005.06</b>	30	95.00 (± 3.53)	95.00
<b>P#008.03</b>	30	100.00 (± 0.00)	100.00
<b>P#008.10</b>	30	100.00 (± 0.00)	100.00
<b>P#008.11</b>	30	90.00 (± 0.00)	89.44
<b>P#009.04</b>	30	90.00 (± 7.07)	90.00
<b>P#014.13</b>	30	90.00 (± 0.00)	89.44
<b>P#082.06</b>	30	90.00 (± 0.00)	89.44
<b>P#082.14</b>	30	85.00 (± 3.53)	89.44
<b>P#104.13</b>	30	90.00 (± 0.00)	89.44
NT	30	5.00 (± 3.53)	-

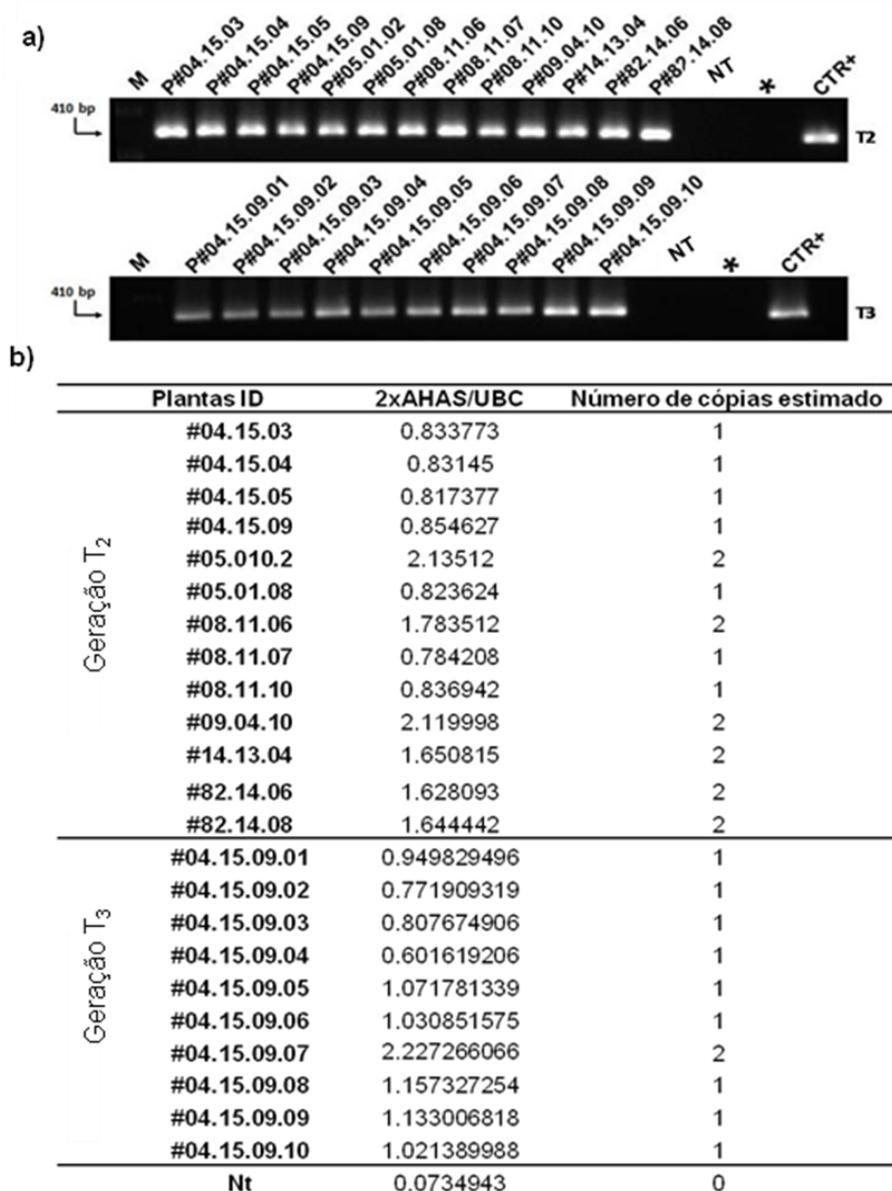
<sup>1</sup>Número de bioensaios.

<sup>2</sup>Mortalidade Correlacionada (CM) estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (Schneider-Orelli, 1947),  $CM (\%) = (TC) / (100-C) \times 100$ , onde T (%) é a mortalidade no tratamento e C (%) é a mortalidade no controle.

#### 5.4. Avaliação da mortalidade de insetos (*A. grandis*) originários de campo em plantas de algodão GM T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>.

Para cada uma das 11 plantas GM selecionadas na geração T<sub>1</sub> com alta expressão da toxina Cry10Aa em botão floral e com mortalidade acima de 80% em bioensaios com o inseto alvo, foram plantadas 10 plantas T<sub>2</sub> totalizando 110 plantas. As 110 plantas foram analisadas

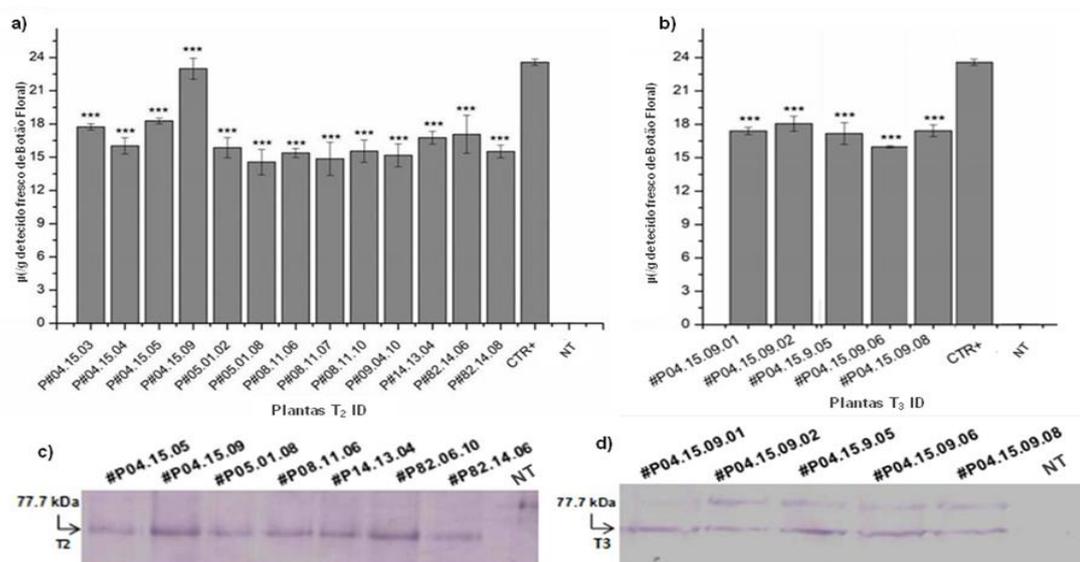
molecularmente via PCR para o gene *cry10Aa* e via ELISA. A planta T<sub>2</sub> P#04.15.09 foi selecionada para plantio da geração T<sub>3</sub>, uma vez que, foi a planta que apresentou maior expressão da proteína Cry10Aa em botão floral (20,09 µg.g<sup>-1</sup> de tecido fresco). Os botões dessa planta foram selados e 10 plantas para obtenção da geração T<sub>3</sub>, que foram avaliadas em bioensaio junto com as plantas da geração T<sub>2</sub>. O número de plantas positivas para PCR T<sub>2</sub> variou de 8-10, já na geração T<sub>3</sub>, todas as plantas foram PCR positiva para o gene Cry10Aa (Figura 11a).



**Figura 11. Detecção de Cassete de Transformação em Eventos T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> via técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).** (a) O DNA genômico foi extraído das folhas das plantas selecionadas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> para amplificação dos fragmentos *cry10Aa* (410 bp), a fim de confirmar a presença do cassete de transformação. (b) Tabela com o número de cópias da cassete de DNA em plantas transgênicas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> estimado pela técnica do PCR quantitativo (qPCR) baseado no método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , uma vez que o transgene marcado por qPCR está presente na cassete de expressão Cry10Aa; Legenda - **CTR +**: controle positivo (10,0 ng de vector pBSK-uaA 1,7 :: *cry10Aa*-nost); **NT**: plantas do tipo selvagem (não transformadas); **M**: Marcador molecular 1,0 kb.

O número de cópias do cassete de expressão foi calculado através do teste qPCR com base no Método  $2^{-\Delta\Delta C}$ , para as todas as plantas PCR positiva da geração T<sub>2</sub>, esse número variou de 1 a 2 cópias (Figura 11b) entre os diferentes eventos de transformação, assim como nas gerações anteriores (T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>). Mostrando que o transgene em algumas linhagens ainda está segregando, por meio desse resultado é possível confirmar também a passagem do gene para as gerações seguintes. Já as plantas da geração T<sub>3</sub> apresentaram todas uma cópia para o gene *cry10Aa*, mostrando assim a integração bem-sucedida do cassete de expressão no genoma das plantas e que possivelmente as plantas dessa linhagem estejam em homozigose.

A expressão da proteína Cry10Aa em botões florais para cada planta T<sub>2</sub> PCR-positiva foi quantificada via ELISA, variando de 3,75 a 20,09  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido fresco (Figura 12a). Sendo que a planta T<sub>2</sub> P#04.15.09 foi a planta com maior expressão da proteína Cry10Aa (20,09  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido fresco), sendo essa planta selecionada para plantio da geração T<sub>3</sub> como foi descrito anteriormente. A expressão da proteína Cry10Aa em botões florais, para geração T<sub>3</sub> de 10,12 a 20,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (Figura 12b) de tecido fresco. A técnica do Western blot foi utilizada para confirmação da presença da proteína Cry10Aa no tamanho de 77.7 kDa (Figura 12c-d), nesta avaliação e nas avaliações seguintes foram utilizadas apenas as plantas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> que apresentavam a expressão de proteína Cry10Aa acima de 14  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido fresco (dobro da Lc<sub>50</sub>). Em todas as plantas analisadas foi observada a expressão da proteína Cry10Aa em botões florais, não sendo observada na planta NT.

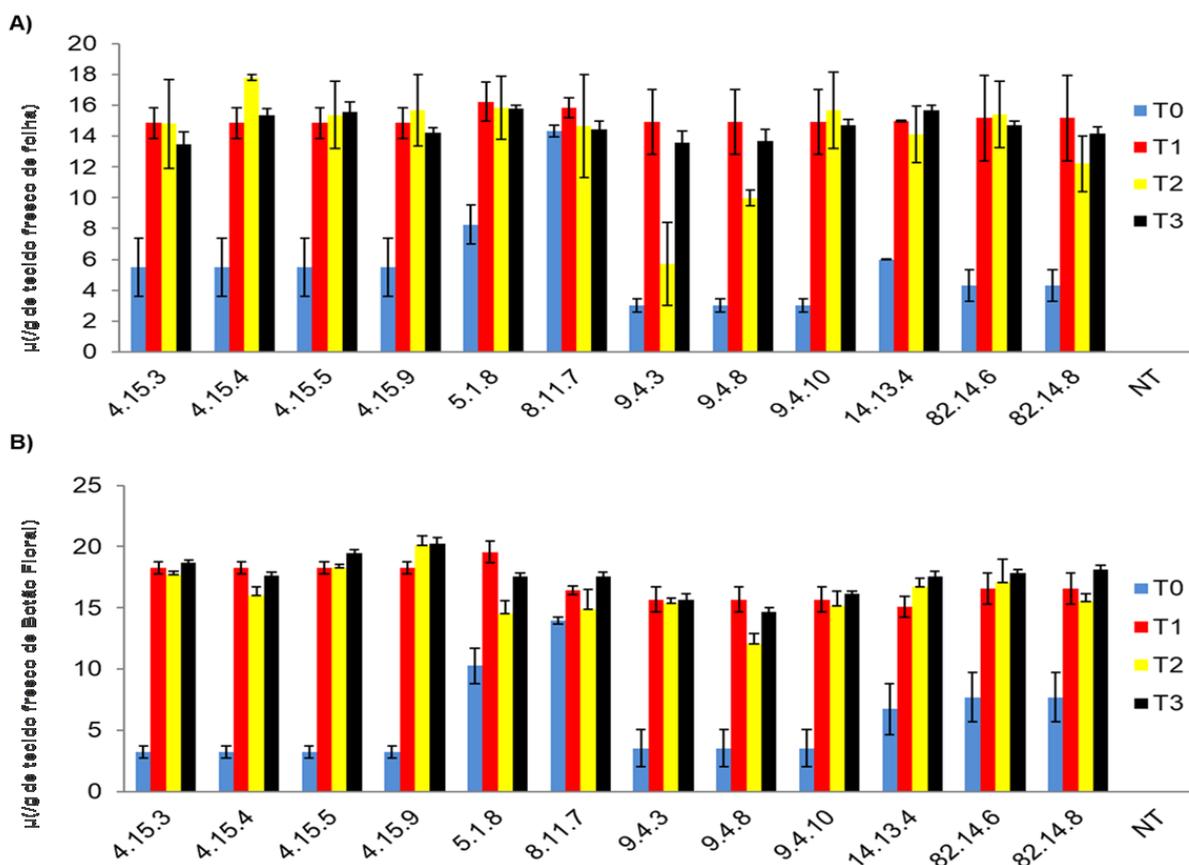


**Figura 12. Imunodeteccção da proteína Cry10Aa em plantas de algodão T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> selecionadas por PCR.**

Experimentos indiretos de ELISA (a e c) e Western-blot (b e d) mediram e detectaram a expressão da proteína Cry10Aa em botões florais, em eventos de algodão T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>. Os níveis de expressão de proteína foram mostrados em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido fresco. O anticorpo primário utilizado em todas as experiências foi pabCry10Aa em coelho por GenScript® a partir de um péptido sintético (VSSDSKIVKGPHT) baseado em Cry10Aa. Em experiências de transferência de Western, o peso molecular da toxina Cry10Aa observado foi de 77,7 kDa. Legenda - CTR +: controle positivo (proteína purificada Cry10Aa 23.0 $\mu\text{g}$ ); NT: plantas não transformada. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (teste de Studentt): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p \leq 0,001$ . Os valores de expressão de cada amostra foram comparados com o controle, que foi o

que apresentou o menor nível de expressão (excluindo a planta NT).

Por meio da análise comparativa da expressão da proteína cry10Aa em plantas GM, observa-se que a partir da geração T<sub>1</sub> houve uma estabilidade na expressão da proteína tanto em folha (Figura 13a) como em botões florais (Figura 13b).



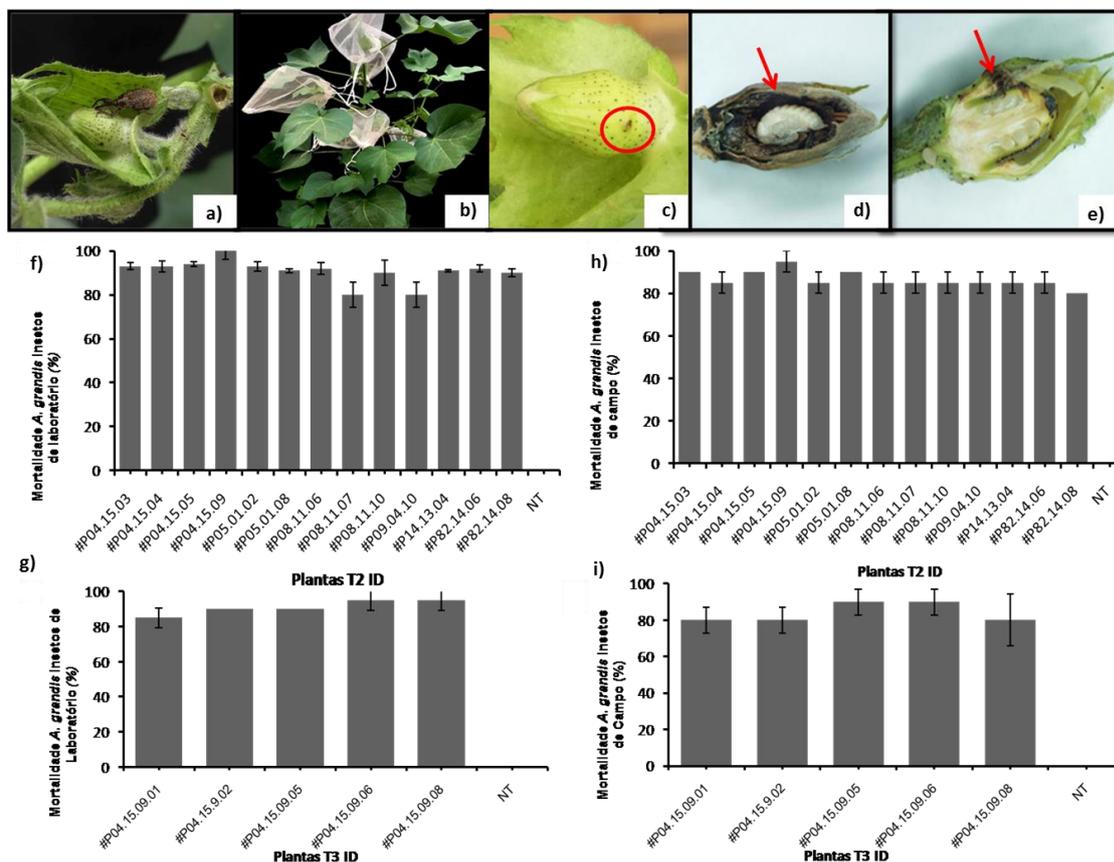
**Figura 13: Comparação da expressão da proteína Cry10Aa ao longo de diferentes gerações:** Experimentos indiretos de ELISA mediram e detectaram a expressão da proteína Cry10Aa em folhas (a) e botões florais (b), em eventos de algodão T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>. Os níveis de expressão de proteína foram mostrados em  $\mu\text{g}$  (g de tecido fresco)<sup>-1</sup>. O anticorpo primário utilizado em todas as experiências foi pabCry10Aa em coelho por GenScript® a partir de um péptido sintético (VSSDSKIVKGPHT) baseado em Cry10Aa. Legenda - CTR +: controle positivo (proteína purificada Cry10Aa 23.0 $\mu\text{g}$ ); NT: plantas não transformada.

Para avaliar a atividade da toxina Cry10Aa contra o inseto alvo, *A. grandis* foram utilizados dois tipos de bioensaio. Para isso foram selecionadas 13 plantas T<sub>2</sub> e 05 plantas T<sub>3</sub>, que apresentaram uma expressão da proteína Cry 10Aa acima de 14  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido fresco (dobro da  $Lc_{50}$ ) (Figura12). **O primeiro bioensaio** consistiu na avaliação da taxa de mortalidade de *A. grandis*, provenientes de laboratório e criados em dieta artificial, nesse bioensaio foram usados botões florais (em torno de 4-6 mm de diâmetro), de plantas transgênicas T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e plantas NT, estes botões foram inoculados com ovos de *A. grandis* semelhante ao bioensaio realizado nas plantas T<sub>0</sub> (Figura 9). Depois de um período de 25 dias, foi medida a taxa de mortalidade dos insetos. **O segundo bioensaio** consistiu na avaliação da taxa de mortalidade de *A. grandis*, criados em condições de campo para avaliar a resistência

dessas plantas GM em nível de campo. Neste experimento foram usados botões florais (em torno de 4-6 mm de diâmetro), de plantas transgênicas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> e plantas NT, foi colocado um inseto adulto (todas fêmeas já fertilizadas) por botão floral (Figura 14a). Os botões florais foram protegidos com telas específicas para bioensaio (Figura 14b), o experimento foi realizado em casa de vegetação, com fotoperíodo de 14h de luz, em 23 ± 2 °C. As observações foram feitas por 48 h. Em seguida, quando observado o sinal de oviposição nas estruturas florais (Figura 14c), os insetos eram retirados. Após 25 dias, a taxa de mortalidade foi calculada e o dano causado pelo inseto na planta NT (Figura 14d) e na planta GM (Figura 14e) foi observado.

No primeiro bioensaio, quando foi realizada a inoculação no botão floral com ovos de insetos provenientes de dieta artificial, a taxa de mortalidade dos insetos variou de 80-100% entre as plantas da geração T<sub>2</sub> (Figura 14f) e de 83-96% entre as plantas GM da geração T<sub>3</sub> (Figura 14g), quando comparadas com a planta NT.

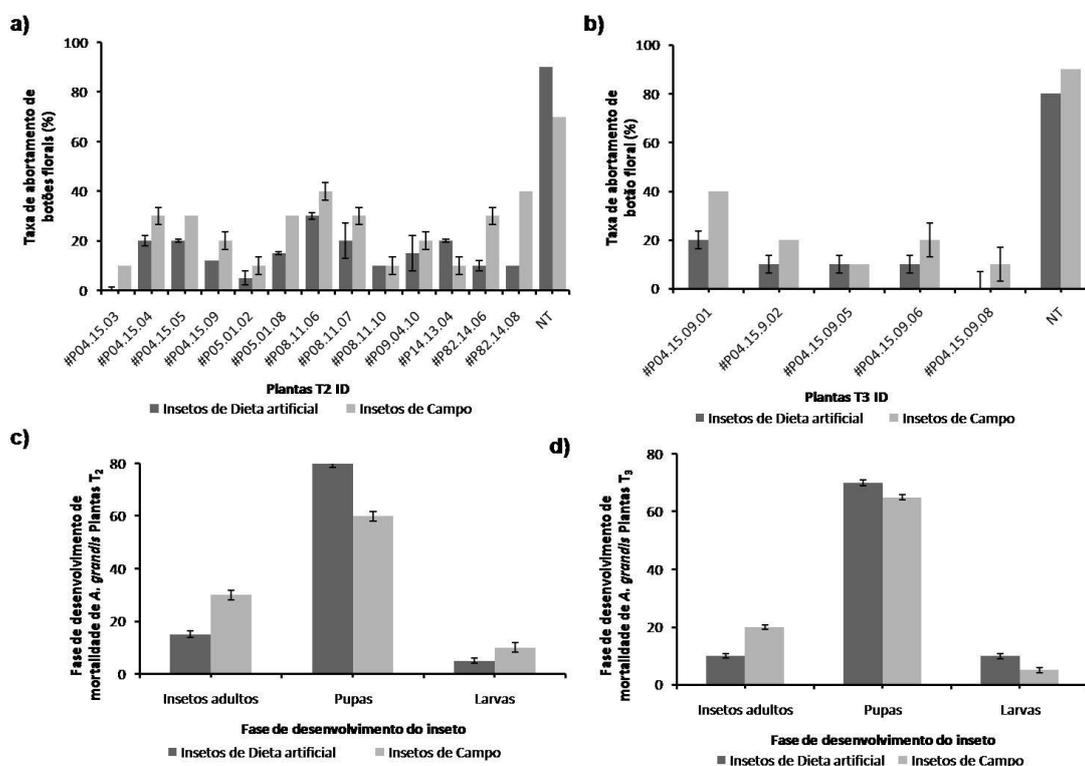
No segundo bioensaio, quando fêmeas de *A. grandis* que já estavam fecundadas foram colocadas em contato com as plantas GM simulando o ataque do inseto em nível de campo, foi observada uma taxa de mortalidade do inseto alvo na geração T<sub>2</sub> que variou de 80-100% (Figura 14h) e nas plantas da geração T<sub>3</sub> essa variação foi de 85-95% (Figura 14i).



**Figura 14. Comparação da taxa de mortalidade de insetos *A. grandis* originários de laboratório x campo, alimentados com algodoeiros que expressam alta quantidade da toxina Cry10Aa.** O gráfico (f e g) mostra

taxa de mortalidade de *A. grandis* (provenientes de dieta artificial) alimentados com botões florais de algodão de diferentes plantas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> expressando a toxina Cry10Aa. Um botão floral de cada evento T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> e NT (planta não transformada) foi perfurado e um ovo de *A. grandis* foi inoculado, os orifícios foram selados com vaselina. Os botões florais não foram removidos das respectivas plantas. A taxa de mortalidade foi avaliada pela morte de larvas dentro do botão floral, bem como o surgimento do inseto adulto 20 dias após a inoculação. Os gráficos (h e i) mostram a taxa de mortalidade de *A. grandis* provenientes de campo. Foram selecionados 10 botões florais por planta (a), o experimento foi realizado colocando um inseto (fêmea adulta já fertilizada) em cada botão floral (b). Após 28h foi observado se havia ou não sinal de oviposição nos botões florais (c). Após 20 dias foi avaliada e comparada a taxa de mortalidade em plantas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>. Danos nos botões florais foram avaliados 25 dias após o início do experimento em plantas Nt e transgênicas (d e e, respectivamente). A taxa de mortalidade foi avaliada pela morte de larvas dentro do botão floral, bem como o surgimento do inseto adulto 25 dias após o sinal de oviposição. Cada experimento foi realizado em três repetições experimentais, que foram compostas por 10 botões florais para cada evento T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> e NT, totalizando 30 repetições. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (*Test Student T*): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p < 0,001$ . NT, plantas não transformada.

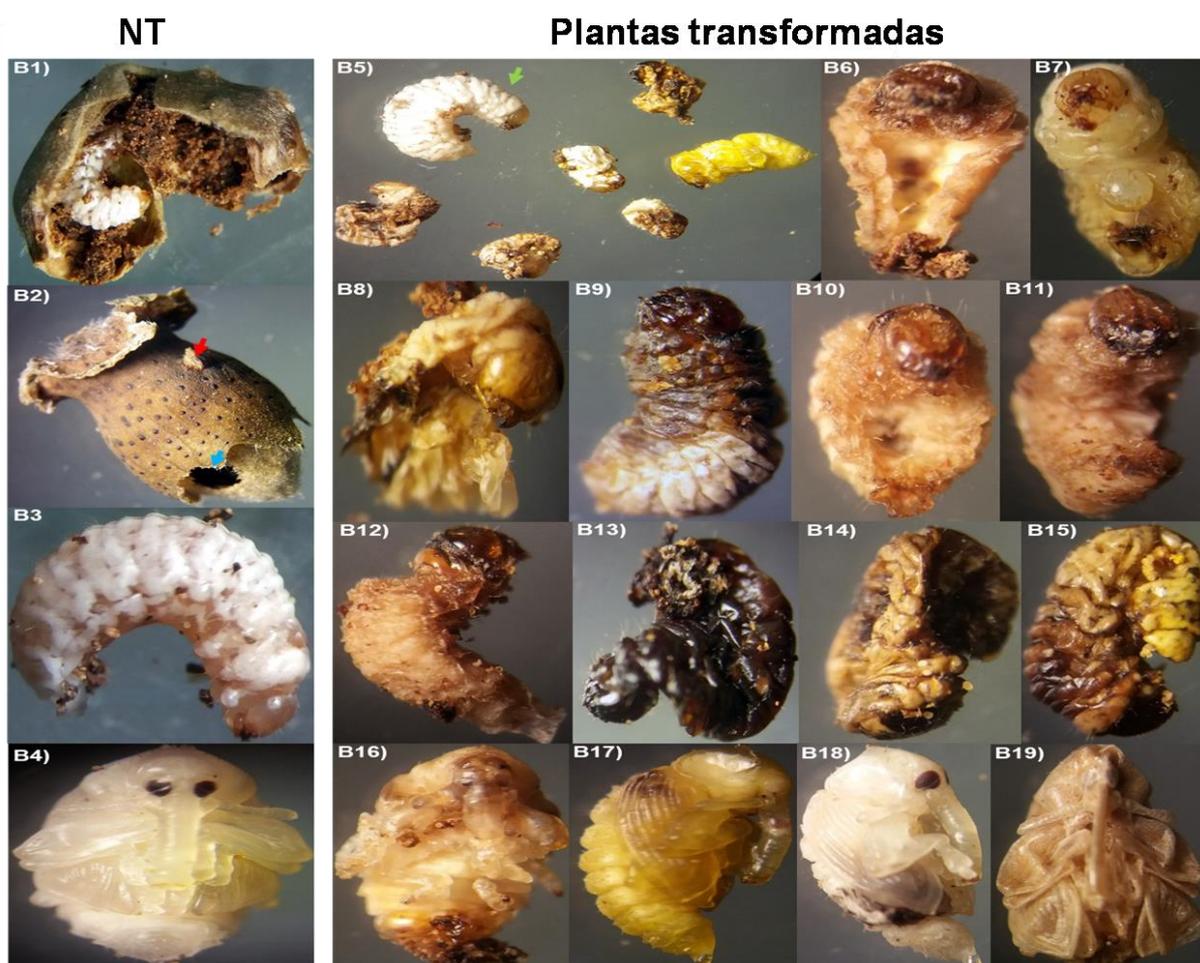
A taxa de abortamento de botões florais variou de 10-40% nas plantas da geração T<sub>2</sub> (Figura 15a), tanto no bioensaio com insetos de dieta artificial como no bioensaio com os insetos provenientes de campo, na planta NT essa taxa atingiu até 90%, inviabilizando assim boa parte dos botões florais que foram utilizados no experimento, enquanto que em plantas GM até 60% dos botões florais utilizados no experimento chegaram a produzir fibras mesmo depois do ataque do inseto. Já para as plantas da geração T<sub>3</sub> essa variação foi de 10-20% para o bioensaio com insetos provenientes de dieta artificial e de 10-40% (Figura 15b) para o bioensaio com insetos em condições de campo. Sendo que 80% dos botões florais utilizados no ensaio com insetos provenientes de dieta artificial chegaram à produção de fibras e no bioensaio com insetos de campo essa taxa foi de 60%.



**Figura 15.** Taxa de abortamento de botões florais em diferentes bioensaios com o inseto alvo (*A. grandis*): (a) O gráfico mostra a porcentagem de abortamento de botões de florais em treze plantas de algodão GM

geração T<sub>2</sub> que expressam as toxinas Cry10Aa e NT (controle) avaliadas durante dois diferentes bioensaios, **(b)** o gráfico mostra a porcentagem de abortamento de botões de florais em cinco plantas de algodão GM geração T<sub>3</sub> que expressam as toxinas Cry10Aa e NT (controle) avaliadas durante os bioensaios **(c)** O gráfico mostra o estágio de desenvolvimento em que ocorreu a morte do inseto em plantas da geração T<sub>2</sub>, **(d)** O gráfico mostra o estágio de desenvolvimento em que ocorreu a morte do inseto em plantas da geração T<sub>3</sub>. **NT**: planta não transformada.

Em relação ao estágio de mortalidade dos insetos utilizados nos bioensaios nas plantas T<sub>2</sub> observa-se que no primeiro ensaio (Insetos de laboratório) 80% dos insetos morriam na fase de pupa, 15% na fase adulta e 5% na fase larval, para o segundo bioensaio (Insetos de campo) 60% dos insetos morriam na fase de pupa, 30% na fase adulta e 10% na fase larval (Figura 15c). Comportamento semelhante foi observado para as plantas T<sub>3</sub>, onde no primeiro bioensaio 70% dos insetos morriam na fase de pupa, 10% na fase adulta e 10% na fase larval e no segundo bioensaio os insetos de campo morriam 65% na fase de pupa, 20% na fase adulta e 5% na fase larval (Figura 15d). Por meio desses dados é possível observar também que as plantas T<sub>3</sub> possuíam uma taxa inferior de insetos na fase adulta quando utilizados insetos provenientes de campo em comparação com as plantas T<sub>2</sub>, sendo que os insetos encontrados nas plantas Gm apresentavam algum tipo de anomalia fenotípica em relação aos insetos encontrados nas plantas Não transformadas (Figura 16).

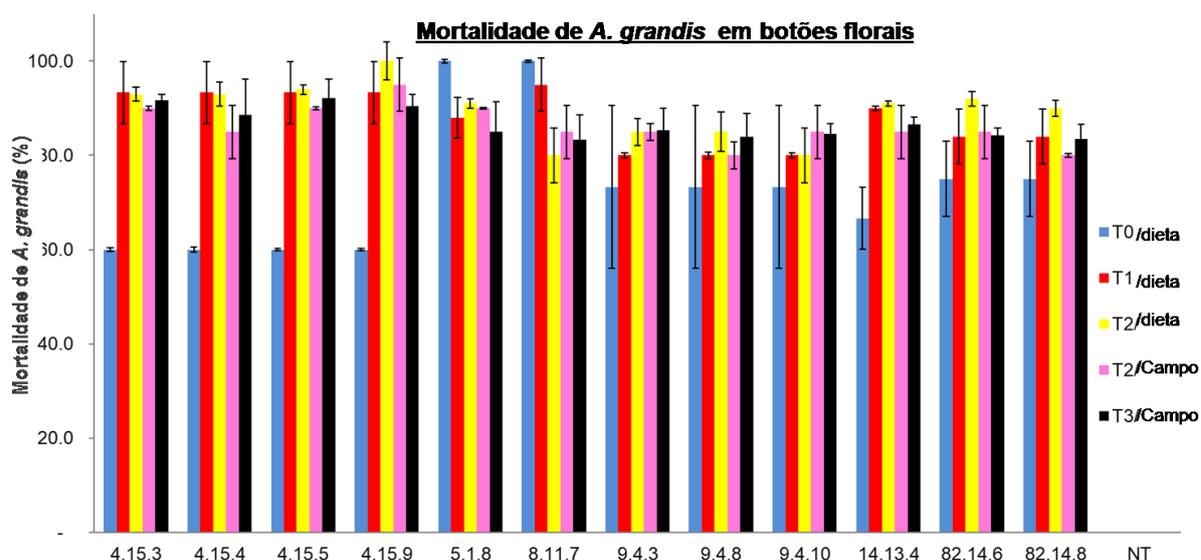


**Figura 16: Comparação fenotípica entre *A. grandis* encontrados em plantas GM em relação a plantas NT.** Larvas de CBW encontradas nos botões florais das plantas GM em relação as plantas NT; B4) pupa de *A.*

*grandis* encontrada nos botões florais das plantas de NT; B5 a B15) Larvas *A. grandis* encontradas nos botões florais de plantas GM Cry10Aa. A seta verde indica as larvas de controle encontradas nos botões florais das plantas NT; B16 a B19) pupa *A. grandis* encontrada nos botões florais das plantas Cry10Aa.

Estes dados evidenciam que as plantas, GM geradas neste estudo utilizando o *gene cry10Aa* como estratégia de transformação genética são promissoras para o controle do *A. grandis*, em nível de campo, uma vez que até mesmo em situações que simulam o ataque do inseto em nível de campo, a mortalidade dos insetos permaneceu alta e a taxa de insetos que chegam à fase adulta foi de apenas 20% em plantas na geração T<sub>3</sub>. Quando se analisa a taxa de abortamento de botões florais que é o principal órgão de reprodução da planta e de maior importância para o setor comercial, sendo que o abortamento do botão floral na lavoura é a principal causa de perda de produção ocasionado pelo ataque do inseto esse número é de apenas 40% em plantas da geração T<sub>3</sub>, esse fato pode ser explicado também pela alta expressão da proteína Cry10Aa (15-17  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . de tecido fresco), nas plantas dessa geração.

Por meio da análise comparativa da mortalidade de *A. grandis* em diferentes gerações de plantas GM Cry10Aa observa-se que a partir da geração T<sub>1</sub> houve uma estabilização da mortalidade de *A. grandis* em bioensaios realizados com botões florais (Figura 17).

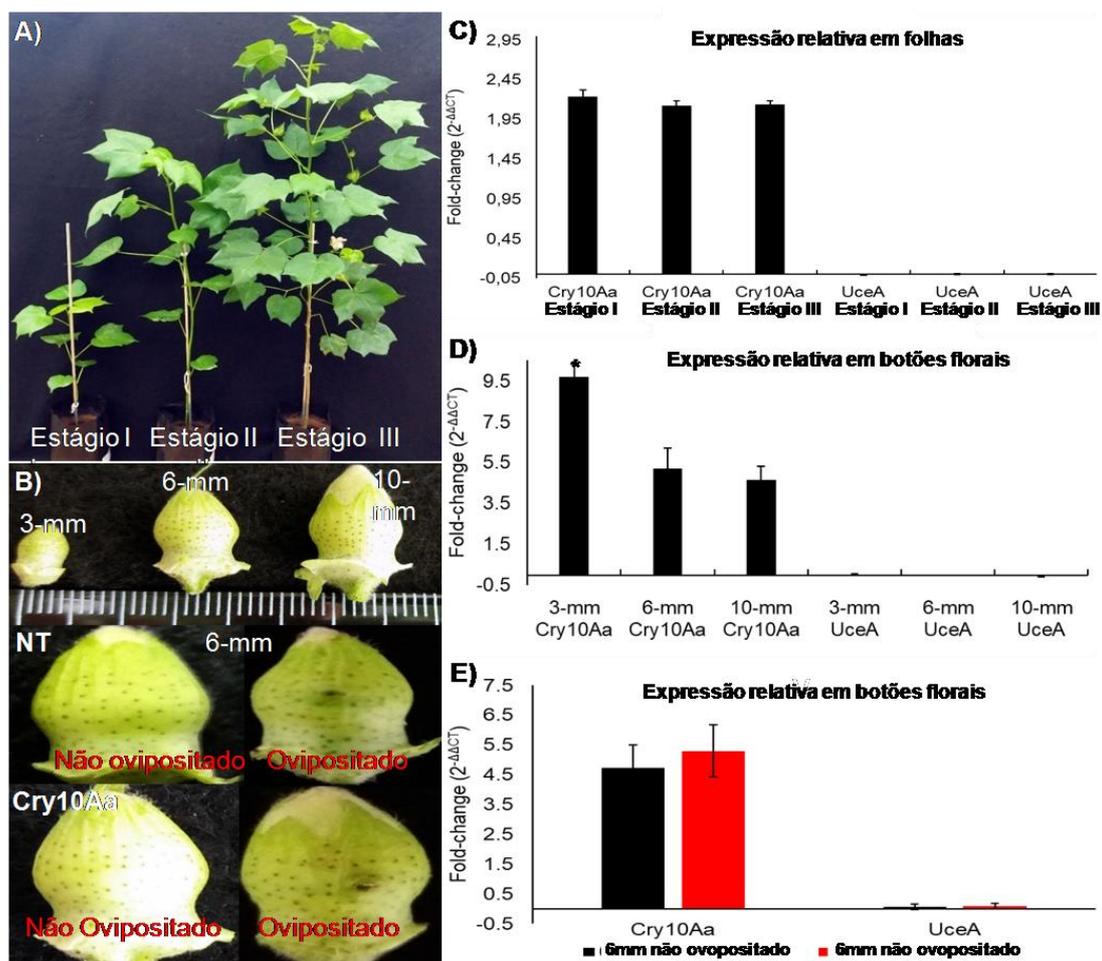


**Figura 17: Comparação mortalidade de *A. grandis* em diferentes gerações:** O gráfico mostra a taxa de mortalidade de *A. grandis* (Provenientes de dieta artificial) e de campo alimentados com botões florais de algodão de diferentes plantas T<sub>0</sub> - T<sub>3</sub> expressando a toxina Cry10Aa. A taxa de mortalidade foi avaliada pela morte de larvas dentro do botão floral, bem como o surgimento do inseto adulto 25 dias após o sinal de oviposição. Os asteriscos representam o nível de significância estatística (*Test Student T*): (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $0,05 < p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $0,01 < p < 0,001$ . NT, plantas não transformada.

### 5.5. Nível de expressão do mRNA Cry10Aa em plantas GM em diferentes estágios de desenvolvimento ou tecidos.

O gene Cry10Aa tem sua expressão controlada pelo promotor constitutivo *uceA1.7*, que foi isolado do algodoeiro e apresentou expressão elevada principalmente em gemas florais da *Arabidopsis thaliana* transgênica (Figura 2). No presente estudo, foi avaliada a estabilidade da expressão do Cry10Aa e do RNAm endógeno *uceA1.7* em folhas e botões florais. Para isso, selecionamos o evento 4.15.3 da geração T<sub>3</sub>, pois esse evento apresentou cópia única do transgene e acúmulo estável da proteína Cry10Aa. Três estágios diferentes de desenvolvimento das plantas (Figura 18a) e três tamanhos de botões florais com ou sem oviposição de ovos por *A. grandis* (Figura 18b) foram selecionados por qPCR. A expressão relativa do mRNA *cry10Aa* em folhas jovens não mostrou diferença estatística nos três estágios de desenvolvimento. Da mesma forma, que o mRNA de *uceA1.7* também não mostrou diferença estatística entre os três estágios de desenvolvimento e o nível de expressão foi semelhante as plantas NT (Figura 18c). Em contraste, o nível de mRNA *cry10Aa* em botões florais de 3 mm foi 1 a 2 vezes maior quando comparado com botões florais de 6 mm e 10 mm, enquanto que estes dois não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 18d). Além disso, o nível médio (3 a 10 mm) de expressão de *cry10Aa* nos botões florais foi até cinco vezes maior do que nas folhas, enquanto a expressão de mRNA de *uceA1.7* novamente foi estável. Da mesma forma, gemas florais de 6 mm com ou sem oviposição de ovos por *A. grandis* mostraram níveis similares de expressão de *cry10Aa* e *uceA1.7* (Figura 18e).

Portanto nossos resultados sugerem que o gene *cry10Aa* é mais expresso em botões florais de 3 mm e seu nível de expressão em botões florais de 6 mm aparentemente não é alterado pela oviposição de *A. grandis*. Além disso, o uso do promotor *uceA1.7* do próprio algodão para conduzir a expressão de *cry10Aa* aparentemente não altera o nível de expressão do gene *uceA1.7* endógeno tanto na folha como no botão floral.



**Figura 18: Nível de expressão do mRNA Cry10Aa em plantas GM em diferentes estágios de desenvolvimento ou tecidos:** (a) Estágios de desenvolvimento vegetativo (estágio I, estágioII e estágio II) de plantas T3 do evento 4.15.3, (b) botões florais (3, 6 e 10mm de diâmetro), 5-7 dias após a inoculação do ovo de *A. grandis*, em plantas transformadas e Não transformada (c) expressão relativa do gene *cry10Aa* e *ucea1.7* em folhas e (d) botões florais. (e) expressão relativa do gene *cry10Aa* e *ucea1.7* em botões folhais ovipositados e não ovipositados .

## 5.6. Identificação dos locais de inserção do transgene no genoma de plantas de algodão GM.

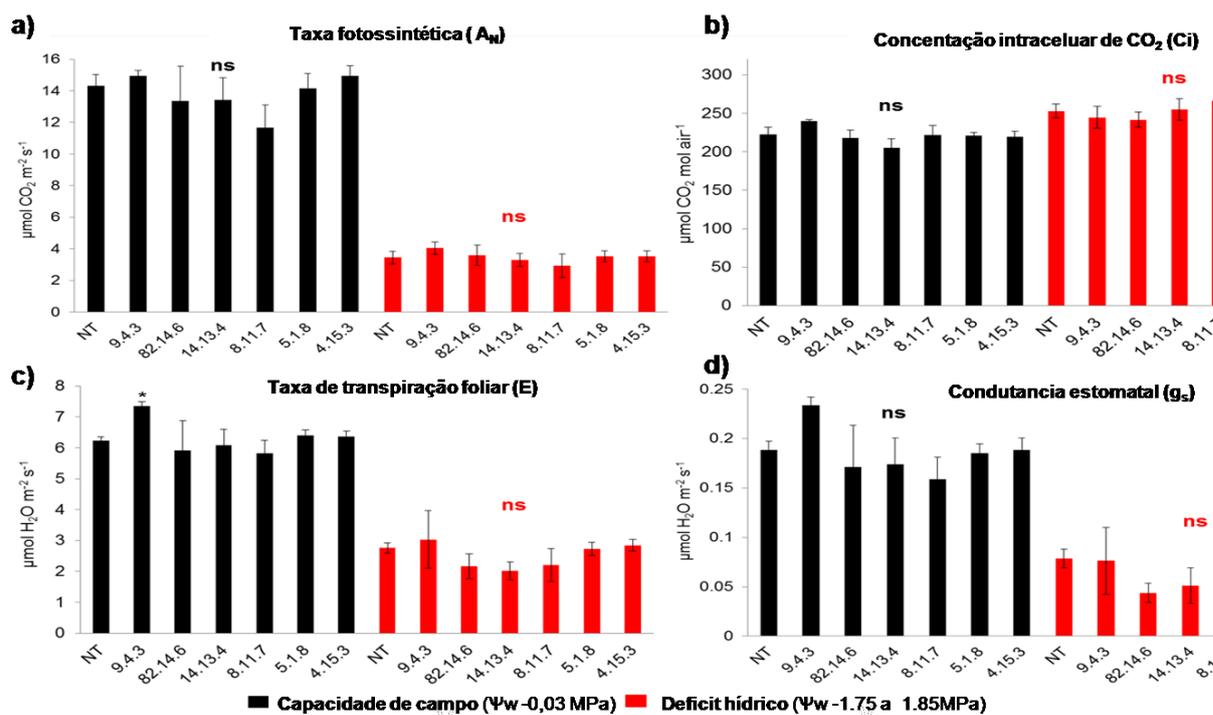
Os locais de inserção do transgene Cry10Aa nos seis eventos independentes GM T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> (a partir de 9 plantas retiradas) usando a estratégia padrão GenomeWalking, foram identificados com sucesso. Todos os locais de inserção foram mapeados em grandes regiões intergênicas, a montante ou a jusante dos operons, aparentemente não causando knockout ou knockdown de genes importantes (Tabela 7).

**Tabela 7:** Inserção do transgene no genoma de plantas de algodão GM: Mapeamento do sítio de inserção do transgene Cry10Aa em diferentes eventos de algodão, usando o kit Universal genome Walker™ 2.0 (Clontech Laboratories, Inc.), por PCR e Sanger sequenciamento. Resultados de performance de alinhamento com BLASTn (NCBI) usando como referência genoma de *Gossypium hirsutum* v1.1 (Zhang et al., 2015), disponível em Phytozome v12.1 database.

Evento	Cromossomo	Identidade (%)	Posição no genoma
4.15.3	D02	94.3 (99/105)	Região Intergênica a 102.7 kb abaixo do gene Gohir.D02G095900
5.1.8	D03	97.9 (231/236)	Região Intergênica a 673 bp abaixo do gene Gohir.D03G108700.1
8.11.7	D07	100 (243/243)	Região Intergênica a 42.1 kb acima do gene Gohir.D07G170900
9.4.3	A04	98.9 (186/188)	Região Intergênica a 1.98 kb acima do gene Gohir.A04G053300
14.13.4 a	A02	98.4 (125/127)	Região Intergênica a 182 kb acima do gene Gohir.A04G053300
14.13.4 b	D10	100 (140/140)	Região Intergênica a 56.7 kb abaixo do gene Gohir.A02G083100
82.14.6 a	D02	98.8 (80/81)	Região Intergênica a 7.5 kb abaixo do gene Gohir.D02G115300.1
82.14.6 b	A04	98.2 (108/110)	Região Intergênica a 274.1 kb acima do gene Gohir.A04G048600

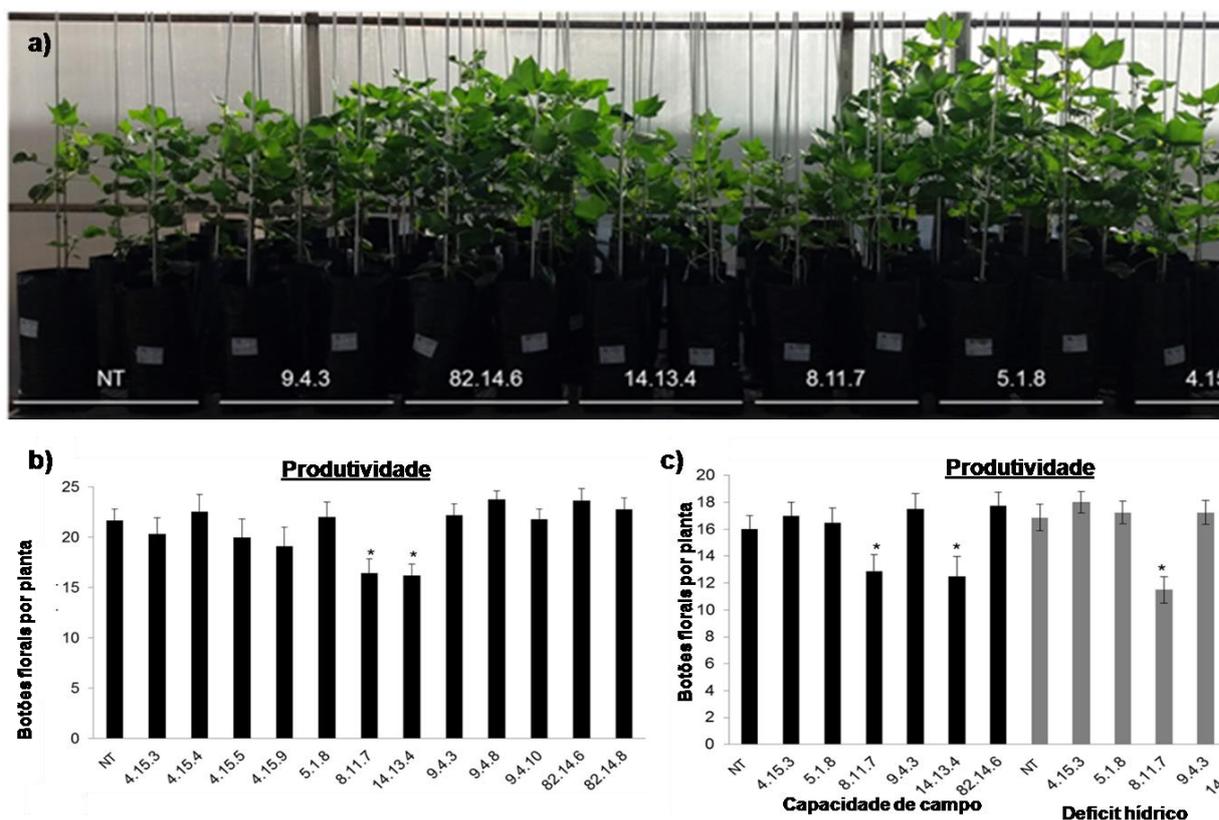
### 5.7. Desempenho agrônômico e potencial de rendimento das plantas GM CryAa

Foram escolhidos seis eventos independentes (4, 5, 8, 9, 14 e 82 eventos) da geração T<sub>3</sub> para avaliar o desempenho agrônômico em comparação com plantas não transformadas em condições de casa de vegetação. Plantas em fase de crescimento foram mantidas em déficit hídrico moderado ( $\Psi_w$  -0,85 a -0,95 MPa) essas plantas foram avaliadas quanto taxa fotossintética ( $A_N$ ), concentração de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) transpiração foliar (E), condutância estomatal ( $g_s$ ) e produtividade (botões florais, sementes e fibras por planta). Os eventos transgênicos mostraram parâmetros de  $A_N$ ,  $C_i$ , E e  $g_s$  semelhantes às plantas de NT, tanto em plantas bem irrigadas como em plantas sob déficit hídrico (Figura 19a a 19d).



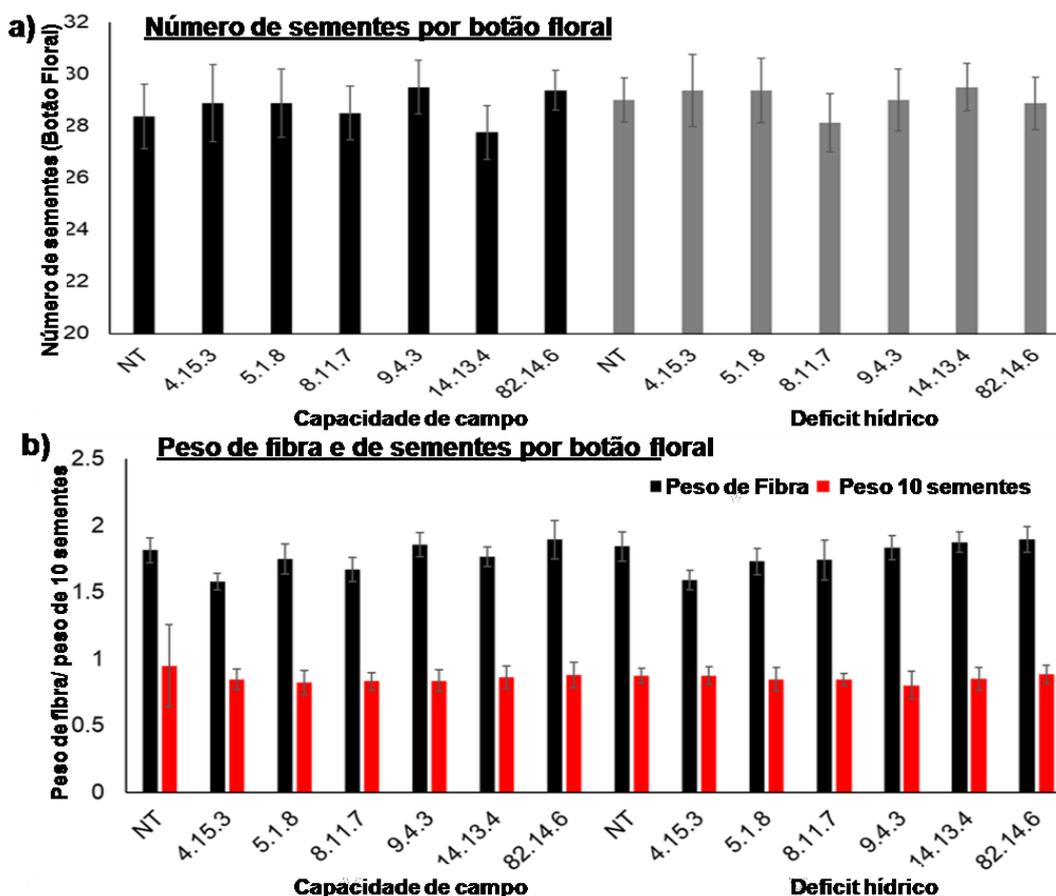
**Figura 19: Desempenho agrônomo de eventos GM Cry10Aa:** Eventos mostraram similar performance em comparação com plantas não transgênicas para (a) taxa fotossintética, (b) concentração de  $CO_2$  (c) transpiração foliar, e (d) condutância estomatal

Em seguida, avaliou-se a produtividade de eventos bem irrigados ou submetidos a déficit hídrico em contraste com plantas de NT. Inicialmente, foi avaliada a produtividade de botões florais de todos os 12 eventos segregantes (Figura 20a) mantidos bem irrigados em casa de vegetação. Todos os eventos transgênicos, com exceção dos eventos 8.11.7 e 14.13.4, mostraram resultados semelhantes aos das plantas de NT aos 30 dias após o início da floração (Figura 20b e 20c). Esses dois eventos destacados mostraram menor precocidade de florescimento e conseqüentemente menor rendimento de botões florais aos 30 e 40 dias avaliados. No entanto, em fases posteriores eles foram equivalentes aos outros eventos ou plantas NT (dados não mostrados).



**Figura 20: Capacidade produtiva de eventos Cry10Aa GM:** (a) 12 eventos GM Cry10Aa geração T<sub>3</sub> em casa de vegetação (b) Produtividade dos eventos GM Cry10Aa em comparação com a planta Nt, (c) comparação da produtividade de eventos GM em relação a planta Nt em condição de campo e em deficit hídrico

Para avaliação do número de sementes por capulho foram mantidos 5 capulhos em cada planta, sendo retirados os outros capulhos que nasciam em seguida. Esses 5 capulhos tiveram seus botões florais selados e avaliados o número de sementes por capulho, por meio dessa análise observou-se que o número de sementes por capulho foi semelhante a planta não transformada (Figura 21a). Tendência similar foi observada em eventos submetidos a déficit hídrico ou bem irrigados. Para avaliação do peso de sementes foram selecionadas 10 sementes por capulho e essas sementes foram pesadas mostrando que não houve diferença do peso de sementes tanto em plantas transformadas em relação a planta não transformada, similar tendência foi observada também entre as plantas mantidas em capacidade de campo e em deficit hídrico (Figura 21b). Assim como o peso da fibra também foi similar entre as plantas GM e as planta não tranformada.



**Figura 21: Produtividade de fibra e sementes por botão floral:** (a) Eventos mostraram similar número de sementes por botão floral e (b) similar peso de fibra e de sementes em comparação com plantas não transgênicas.

Todos os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Mostrando que não houve alteração fenotípica nas plantas transformadas em relação a planta não transformada. A alta estabilidade do transgene Cry10Aa em algodão T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> GM mostra um alto na resistência ao ataque de *A. grandis*. Assim como o nível de tolerância ao estresse abiótico semelhante a plantas de algodão não transformadas e a ausência de características fenotípicas indesejáveis na planta GM, além das plantas GM apresentarem similar produtividade a plantas não transformadas sugerem equivalência agrônômica.

Sendo assim quatro eventos elite geração T<sub>3</sub> foram selecionados para futuros testes de campo. Os eventos GM Cry10Aa podem ter um grande potencial para o gerenciamento integrado de *A. grandis* nas culturas mundiais de algodão, melhorando a sustentabilidade do agronegócio.

## 6. DISCUSSÃO

O *Gossypium hirsutum* é uma cultura economicamente importante para muitos países agrícolas e a principal fonte de fibras para a indústria têxtil. No entanto, a cultura do algodão sofre com o ataque de pragas ao longo do seu ciclo de vida. O *A. grandis* é uma das pragas mais importantes dessa cultura em todo o mundo, principalmente nos principais países produtores de algodão das Américas (de Lima *et al.*, 2013; Grossi-de-Sa *et al.*, 2007). Sua alta incidência pode representar perdas econômicas significativas, com redução de até 100% no número de cápsulas de algodão e diminuição do rendimento de fibras (Foster, 2009). Sua ocorrência tem sido relatada não apenas nos estágios de produção das gemas florais, mas também nos estágios iniciais da planta, forçando os produtores a aumentar o número de aplicações de agroquímicos (em alguns casos até 30 aplicações por cultura) (Neves *et al.*, 2014). Em consequência disso, aumenta o custo de produção, causando danos ambientais e reduzindo a população de insetos não-alvo que mantém o equilíbrio de outros insetos-praga importantes. Restos culturais, número reduzido de cultivares comerciais de *G. hirsutum* que apresentam pelo menos baixa resistência a *A. grandis*, plantas de algodão que crescem no período de entressafra e hospedeiros alternativos são alguns dos principais fatores responsáveis pelas altas fontes de inóculo e pelo insucesso no controle de *A. grandis* (Ribeiro *et al.*, 2010; Magalhães *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2016; Pimenta *et al.*, 2016). Assim, a busca de alternativas novas ou adicionais para auxiliar na sua gestão tornou-se importante para reduzir sua população, diminuir perdas econômicas e para o controle efetivo. Por outro lado, novas ferramentas biotecnológicas baseadas na estratégia de interferência de RNA (RNAi) in planta para controle de cross-talk (Baum *et al.*, 2007; Burand e Hunter, 2013), estratégia de RNAi de aplicação tópica em algodão (Gillet *et al.*, 2017; Macedo *et al.*, 2017), e na expressão vegetal de proteínas entomotóxicas (proteínas *Bt*) (Grossi-de-Sa *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017) são consideradas alternativas promissoras para auxiliar no manejo de *A. grandis* em plantações de algodão. Proteínas entomotóxicas foram testadas com sucesso para o controle de várias espécies de coleópteros, incluindo o *A. grandis*. Os Cry1Ba6, Cry8Ka5, Cry1Ia, Cry1Ia12 e Cry10Aa já foram comprovados por testes *in vitro* como entomotóxicos para o *A. grandis* (Grossi-de-Sa *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010; Aguiar *et al.*, 2012; Farias *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). Além disso, Cry1Ia12, Cry1Ia e Cry10Aa tiveram seu efeito entomotóxico ao *A. grandis* provado através da expressão em algodão transgênico (de Oliveira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017). O algodão Cry1Ia12 GM apresentou redução de até 60% no surgimento de pupa *A. grandis*, enquanto larvas e adultos sobreviventes de insetos foram mais

fracos e significativamente menores em comparação com insetos alimentados em plantas de NT (de Oliveira *et al.*, 2016). Da mesma forma, o algodão Cry1Ia GM apresentou percentual de mortalidade de adultos *A. grandis* e larvas alimentadas em folhas e botões florais de até 85,7 e 60,7%, respectivamente (Silva *et al.*, 2016).

No presente trabalho foram geradas plantas de algodão GM que apresentaram alta expressão da proteína Cry10Aa e alta mortalidade de *A. grandis* em diferentes tipos de bioensaios com o inseto alvo em casa de vegetação, simulando o ataque do inseto em campo, apresentando até 100% de mortalidade do inseto alvo em diferentes gerações de plantas GM. O controle de insetos-praga, através do uso da transformação genética de plantas teve início na década de 1990, quando foi desenvolvido o primeiro algodão transgênico expressando a toxina *Bt* Cry1Ac (Perlak *et al.*, 1990). Em 1995 foi liberado para plantio nos Estados Unidos o primeiro algodão transgênico, o evento BollgardI® da Monsanto, para resistência ao ataque de insetos da ordem Lepidóptera. Após essa conquista, diferentes tipos de algodão GM, expressando genes *Bt* para o controle de insetos-praga, foram liberados para plantio (James, 2015). Porém, os eventos de algodão GM disponíveis atualmente são eficientes apenas no controle de insetos da ordem Lepidóptera. Não existe nenhum evento disponível comercialmente com resistência a insetos da ordem Coleóptera, como o *A. grandis*, que é considerado a praga mais prejudicial à cultura do algodão. Portanto, esse estudo mostra o primeiro evento de algodão GM desenvolvido que apresenta resistência ao ataque do bicudo.

O cassete de transformação genética utilizado para transformação de plantas, possui como gene de interesse o gene *cry10Aa*, regulado pelo promotor relacionado a ubiquitinação de algodão (*uceA* 1.7). A eficácia deste algodão GM está relacionada principalmente à estabilidade e altos níveis de expressão de proteína impulsionados pelo promotor constitutivo de algodão *uceA* 1.7. Um dos fatores mais importantes para alcançar o desejado nível de expressão de um transgene é a escolha do promotor (Bruderer *et al.*, 2003). Plantas de algodão GM vêm sendo aprovadas em todo o mundo e a maioria dos transgenes são controlados pelo promotor *CaMV35S*. Entretanto, o padrão de estabilidade desse promotor plantas não é constante ao longo das gerações, apresentando assim uma variação temporal ao longo do ciclo das plantas (Kranthi *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2005).

O uso do promotor *uceA* 1.7 apresentou altos níveis de expressão da proteína Cry10Aa em diferentes tecidos da planta (folha/botão floral) e esse nível de expressão manteve-se elevado ao longo do tempo e em diferentes gerações. Puspito *et al.* (2015) relataram que 74 plantas de algodoeiro GM contendo dois genes (*cry1Ac* e *cry2A*) continham níveis da toxina cry que diminuíam ao longo do tempo, provavelmente, por possuir uma fraca região promotora (*CaMV35S*) ou devido ao envelhecimento da planta, podendo assim ocorrer o silenciamento

do transgene ao longo de diferentes gerações, o que não foi observado com o uso do promotor *uceA 1.7* (Bakhsh *et al.*, 2011; Olsen *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2009). Além disso, este estudo demonstrou que o promotor *uceA 1.7* dirige níveis de transcrição de transgenes em algodão e estas transcrições são traduzidos em proteína funcional. Portanto, o promotor *uceA 1.7* é um elemento regulador promissor para o desenvolvimento de algodão GM resistente a *A. grandis*, especialmente, devido à alta expressão nos tecidos reprodutivos do algodão visados pelo inseto. Portanto, o uso de promotores mais fortes e mais estáveis é crucial para alcançar níveis de resistência e expressão do gene em tecidos alvo. Em contraste com *CaMV35S*, promotores de genes relacionados à ubiquitinação (de enzimas conjugadas à ubiquitina E2) são reguladas diferencialmente através dos tecidos e fases de desenvolvimento (Christensen e Quail, 1996; Mazzucotelli *et al.*, 2008). Embora alguns tecidos de *A. thaliana* tenham apresentado expressão de gene repórter impulsionada pelo promotor *CaMV35S* semelhante ou superior ao impulsionado pelo promotor *uceA 1.7* (Figura 2), a escolha do promotor *uceA 1.7* para o cassete de expressão para transformação de algodão é justificável porque o *uceA 1.7* é um promotor endógeno, que pode impedir o silenciamento futuro do gene na progênie GM.

Outro fator que garantiu o sucesso da obtenção de plantas GM neste estudo foi a escolha da metodologia de transformação genética de plantas. A maioria dos cultivares comerciais de algodão não são férteis quando transformadas por *A. tumefaciens*. No entanto, a integração e expressão estável de genes foram efetivamente alcançadas em diferentes cultivares de algodão usando método de biobalística (Aragão *et al.*, 2005). O principal objetivo da transformação genética de plantas é a produção de plantas férteis que expressem uma característica desejável. Para alcançar esse objetivo, desde o início da década de 80 diferentes técnicas para inserção de genes em plantas têm sido desenvolvidas (Aragão *et al.*, 2005). Sendo a técnica de transformação de algodão por biobalística, associada à resistência a herbicidas, considerada promissora para a obtenção de cultivares GM uma vez que essa técnica permite a alta seleção de plantas GM *in vitro* (Aragão *et al.*, 2005; Rech *et al.*, 2008). Atualmente, as plantas de algodão GM comercializadas possuem resistência a insetos, tolerância a herbicidas, ou uma combinação de ambas estas características (James, 2015). O método de transformação de plantas via biobalística mostrou-se eficiente para transformar embriões de sementes de algodão da variedade BRS 372 com elevada de transformação (0,5%), quando comparada com a transformação via do tubo de polínico (0,01%) (Oliveira *et al.*, 2016). Essa observação pode estar relacionada pela eficiência da seleção da planta T<sub>0</sub> via Imazapyr associado à otimização do processo de transformação. Segundo Aragão *et al.* (2005), este sistema de seleção aumenta em torno de 0,55% a frequência de linhas germinativas e a transformação que é 100 vezes mais eficiente em comparação com o mesmo sistema sem este agente

seletivo. Uma desvantagem da técnica de transformação de algodão por biobalística é a geração de plantas T<sub>0</sub> com várias cópias para o transgene, o que não foi observado no presente trabalho, uma vez que por meio da avaliação do número de cópias do transgene pela técnica qPCR  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e do Southern Blot. As plantas transformadas de algodão T<sub>0</sub> apresentaram uma (um único evento) ou duas (a maioria) cópias do transgene *cry10Aa* (Figura 7). O que foi observado nas gerações T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub>/T<sub>3</sub> demonstrando assim a integração bem-sucedida do cassete *uceA1.7::cry10Aa-nost-ahas* no genoma de diferentes gerações de plantas de algodão GM (Figura 7, 10c, 11b).

A alta reprodutibilidade e sensibilidade da técnica de qPCR  $2^{-\Delta\Delta CT}$  torna este método uma alternativa confiável para determinar o número de cópias do transgene, uma vez que a técnica do Southern blot não é confiável para determinar o número de cópias do gene sob rearranjo ou em integração de repetições *in tandem* (Yang *et al.*, 2012). O incremento do número de cópias do transgene no genoma da planta, diferentemente do aumento da dose do gene por meio da adição de um alelo no locus, não contribui para a elevação da quantidade de proteína transgênica expressa, ou seja, em alguns casos, múltiplas inserções do transgene no genoma costumam resultar em expressão gênica de 1 única cópia (Hobbs *et al.*, 1990). As plantas de algodão T<sub>0</sub> são hemizigotas (possuem um alelo nulo e um locus transgênico), já as plantas T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> são consideradas heterozigotas, a análise da geração GM T<sub>3</sub> mostrou que 100% das plantas GM T<sub>3</sub> apresentam uma única cópia mostrando assim que as todas as plantas estão em homozigose, confirmando assim que houve a segregação do transgene *cry10Aa* nas gerações iniciais e sua estabilidade na geração T<sub>3</sub> com um alto nível de expressão da toxina.

Todos os dados obtidos fornecem fortes evidências de que a expressão bem-sucedida do gene *cry10Aa* contribui para alto nível de resistência das plantas GM ao bicudo do algodoeiro. A escolha do gene de interesse foi de fundamental importância para o sucesso da geração de plantas resistentes ao ataque de insetos-praga. A forte toxicidade do gene *cry10Aa in vitro* tornou-o promissor para uso no desenvolvimento de algodão GM resistente a *A. grandis*. A toxina Cry10Aa apresenta como grande vantagem ser específica para insetos da ordem Coleoptera, tornando-se promissora para o controle do *A. grandis*. A LC<sub>50</sub> da proteína Cry10Aa recombinante de *E. coli* para *A. grandis* foi equivalente a LC<sub>50</sub> relatado por Aguiar *et al.* (2012; Tabela 3). Comparando com outras tóxicas Cry descritas na literatura, a proteína objeto deste estudo foi ainda menor, demonstrando a alta toxicidade do gene *Cry10Aa* contra *A. grandis*. Por exemplo, a LC<sub>50</sub> da Cry1Ia de 21,5 µg.g<sup>-1</sup> para larvas recém-nascidas do inseto e a LC<sub>50</sub> da Cry1Ba é de 305,32 µg.g<sup>-1</sup>, mostrando uma moderada atividade de outras toxinas Cry contra *A. grandis* (Martins *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010).

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é de fundamental importância e pode ter implicações diretas no desenvolvimento de plantas GM com maior resistência ao bicudo-do-algodoeiro. Sendo assim Mahalakshmi & Shenbagarathai (2010) propuseram um modelo para a toxina Cry10Aa obtida por homologia, para o qual o modelo foi o cristal Cry2Aa obtido por cristalografia de raios-X. Neste modelo, os autores identificaram os três domínios clássicos presentes nas toxinas Cry. Como a homologia entre Cry10Aa e Cry2Aa é baixa, uma alternativa prévia baseada no modelo estrutural de cristal Cry1Ac foi apresentado (Evdokimov *et al.*, 2014), que tem maior identidade da sequência com Cry10Aa (26,42%; Figura 1) e é filogeneticamente relacionado com Cry1Ac do que Cry2Aa (Figura 1d). Embora os dois modelos mostrem Cry10Aa com três domínios distintos e uma região N-terminal (Figura 1), algumas diferenças foram observadas: (i) o novo modelo possui sete  $\alpha$ -hélices no domínio I, enquanto o anterior tem oito e (ii)  $\alpha$ -hélice da região C-terminal foi melhor elucidada no novo modelo (Figura 1b e 1c). Além disso, (iii) o domínio Cry10Aa tinha maior semelhança estrutural com o respectivo domínio em Cry2Aa do que em Cry1Ac, enquanto os domínios II e III apresentaram maior similaridade com Cry1Ac do que para Cry2Aa (Figura 1C). Estas observações podem indicar eventos de recombinação entre locus de genes *cry* relacionados no genoma *Bt* do plasmídeo. Assim, a elucidação estrutural do Cry10Aa usando técnicas recorrentes, como a cristalografia de raios X, é essencial para determinar a estrutura real da toxina contribuindo para o seu uso em futuros programas de controle do *A. grandis*.

Uma vez determinado que a toxina Cry10Aa é tóxica para o *A. grandis in vitro*, o seu uso para o controle de *A. grandis* em plantas de algodão GM, controlados pelo promotor *uceA 1.7* tornou-se possível. Por meio da técnica do ELISA observa-se que as plantas geradas neste estudo apresentaram uma alta expressão da proteína Cry10Aa, sendo importante para o controle do inseto alvo. O nível de expressão do gene *cry1Ac* no algodão Bollgard I GM (Monsanto®) é de 1,56 e 0,86  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco de folhas e sementes, respectivamente, e o nível do gene *cry2Ab2* no algodão Bollgard II GM (Monsanto®) é 8,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tecido fresco de pólen (Grossi-de-Sa *et al.*, 2006). Silva *et al.* (2015) e Oliveira *et al.* (2016) relataram plantas de algodão GM com níveis de transgene *cryIIA12* de 2,7 e 2,26  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido fresco de folha, respectivamente. O maior nível de expressão da proteína Cry10Aa foi observado na planta de algodão T<sub>0</sub> P#008 (14,0  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de tecido fresco em folhas e botões florais) mostrando assim, claramente, que o algodão Cry10A GM pode produzir toxinas em níveis mais altos do que o usual (Figura 6).

A alta acumulação Cry10Aa em folhas ou botões florais (até 18 e 20  $\mu\text{g/g}$  peso fresco, respectivamente) dos eventos T<sub>2</sub> a T<sub>3</sub> foi correlacionada com o maior porcentagem de

mortalidade *A. grandis*. Além disso, o acúmulo de Cry10Aa e a porcentagem de mortalidade *A. grandis* da geração T<sub>1</sub> para T<sub>3</sub> foram altamente estáveis em cada evento, em contraste com a geração T<sub>0</sub>, sugerindo estabilidade na expressão dos transgênicos. As variações no nível de expressão e no acúmulo de proteínas em diferentes eventos podem ser explicadas principalmente por diferentes locais de inserção do transgene no genoma e especificidade intrínseca dos genes Cry ou proteínas (de Oliveira *et al.*, 2016). Além disso, a expressão baixa e variável do transgene Cry10Aa em eventos T<sub>0</sub>, em contraste com gerações mais avançadas, é uma consequência da necessidade de rearranjo de loco devido à inserção de seqüência de DNA (Kohli *et al.*, 2006). A utilização de seqüências promotoras de transcrição com atividades específicas de botões florais e induzidas por *A. grandis* é uma alternativa para aumentar ainda mais a expressão e o acúmulo do gene *cry10Aa* nesse tecido de algodão (Artico *et al.*, 2014a; Artico *et al.*, 2014b; Lambret-Frotteet *et al.*, 2016). O promotor de algodão *UceA1.7* utilizado neste estudo foi previamente caracterizado como sendo forte e com alto nível de expressão no tecido floral (Viana *et al.*, 2011). Além disso, esses promotores de algodão dirigiram níveis de até 7 vezes de transcritos de *uidA* do que o promotor *CaMV 35S* em capulhos de *A. thaliana* transgênica (Ribeiro *et al.*, 2017). Nossos estudos também confirmam a alta expressão e estabilidade do mRNA *cry10Aa* dirigida pelo promotor *UceA1.7* nas folhas e em ambos os botões florais ovipositados e não ovipositados. Esta observação pode ser explicada, parcialmente também pela atividade do promotor *uceA1.7*. Além disso esse aumento pode ser atribuído a autofecundação da planta que promove locus em homozigose que combinada com a melhoria das características agrônômicas, contribui para o aumento da quantidade de proteína expressa. Os perfis de expressão do transcrito *cry10Aa* e da proteína foram semelhantes (Figuras 5 e 6). Além disso, o transcrito *cry10Aa* em níveis de expressão de proteína foram positivamente correlacionados com plantas de algodão GM conferindo resistência ao *A. grandis*. Esta observação demonstra que o gene *cry10Aa* expresso em botões florais de algodão GM confere resistência ao ataque do bicudo. Sendo que as plantas que apresentaram alta expressão do transcrito *cry10Aa* e da proteína Cry10Aa foram as mesmas que apresentaram alta taxa de controle do inseto em bioensaios em casa de vegetação simulando o ataque do inseto a nível de campo, chegando assim a controlar 100% dos insetos em diferentes gerações da planta transgene.

Bioensaios *in vitro* anteriores revelaram que a toxina Cry10Aa apresentou LC<sub>50</sub> (dose letal que mata 50% das larvas de insetos) de 6,35 µg/ml<sup>-1</sup> contra as larvas *A. grandis* (Ribeiro *et al.*, 2017). Da mesma forma, Aguiar *et al.* (2012), realizando bioensaios com extratos de insetos infectados por vírus recombinantes, observaram alta toxicidade para as larvas *A. grandis*, com LC<sub>50</sub> de 7,12 µg/ml<sup>-1</sup>. No entanto, esses valores de LC<sub>50</sub> da proteína Cry10Aa

para a toxicidade de larvas *A. grandis* é menor do que o observado com outras proteínas Cry (de Oliveira et al., 2016; Oliveira et al., 2011). Em contraste, nossos resultados sugerem que a concentração de Cry10Aa no algodão transgênico para atingir 100% de mortalidade de larvas de *A. grandis* é de pelo menos 20 µg/g de tecido fresco. O nível mais alto de acumulação de toxina Cry em plantas transgênicas em comparação com LC<sub>50</sub> para o controle eficiente de *A. grandis* ou outras espécies de insetos já foi sugerido e discutido em outros estudos (de Oliveira et al., 2016; Gould, 1998). Portanto, esse alto acúmulo de proteína pode aumentar a eficiência do controle do *A. grandis* e reduzir a probabilidade do surgimento da população resistente, enquanto o manejo da resistência pode garantir maior durabilidade dessa toxina como ferramenta biotecnológica (Perlak et al., 2001). O empilhamento genético de dois ou mais genes Cry ou associados com a estratégia de RNAi da planta em uma cultivar também é considerado uma alternativa promissora para aumentar a durabilidade da resistência (Christou et al., 2006; Yang et al., 2011). No entanto, a prospecção de novas toxinas ou melhorar as toxinas existentes é realmente necessária. A proteína Cry10Aa é acumulada na planta e ingerida pelo *A. grandis* como protoxina, e proteases endógenas do inseto clivando alguns domínios e liberando a toxina ativa Cry10Aa (Bravo et al., 2007; Pardo-Lopez et al., 2013; Adang et al., 2014). Isto sugere que a engenharia de Cry10Aa ou outras toxinas cry, removendo previamente alguns desses domínios específicos, pode aumentar seu efeito entomotóxico (Pardo-López et al., 2009). Outra alternativa promissora é a melhoria transcricional mediada por CRISPR/dCas9 de Cry10Aa usando RNA guia visando o promotor UceA 1.7 (Gao, 2018).

Ensaio genotóxicos e hepatotóxicos usando o recombinante Cry10Aa mostraram aparentemente nenhum efeito mutagênico em camundongos, destacando seu potencial de biossegurança para uso em cultivos transgênicos (de Souza Freire et al., 2014). O que destaca o potencial biotecnológico da toxina Cry10Aa no desenvolvimento de algodão GM sem risco ao meio ambiente “biosafe” e resistente a *A. grandis*. Dado o potencial entomotóxico para o controle de *A. grandis* e seu uso de biossegurança, então avaliamos o desempenho agrônomico do algodão GM Cry10Aa em casa de vegetação. Seis eventos independentes com baixo número de cópias e expressão de transgene alta e estável foram rastreados e algumas características medidas. Nossos resultados sugerem que a expressão de Cry10Aa no algodão transgênico não causa penalidades aparentes no rendimento e tolerância ao estresse (por exemplo, déficit hídrico). Embora os eventos 8.11.7 e 14.13.4 tenham apresentado pequeno atraso no crescimento inicial e conseqüentemente menor número de botões florais aos 30 ou 40 dias após o plantio. No entanto, em fases posteriores, estas plantas apresentaram desenvolvimento vegetativo e produção equivalentes. O local de inserção do transgene

identificado evidencia a possível ausência de ocorrência de alterações genotípicas destes 6 eventos. Desta forma, consideramos estes eventos como bons candidatos para avaliar a eficácia do Cry10Aa no controle de *A. grandis* a partir de triagem em condições de campo. Finalmente, destacamos a eficiência da toxina Cry10Aa no controle do *A. grandis* e a alta estabilidade da expressão do transgene confirmam seu potencial para testes de campo. Em um futuro próximo, acreditamos que o algodão geneticamente modificado Cry10Aa pode fazer parte das estratégias de manejo do *A. grandis* nas culturas de algodão e contribuir para reduzir as perdas de produção e melhorar a sustentabilidade do agronegócio.

## 7. CONCLUSÃO

O bicudo do algodoeiro é um grande problema para o cultivo de algodão, cujo controle é ineficaz e dispendioso. Até com a erradicação do *A. grandis* dos EUA devido a um robusto programa de controle, o risco de propagação para a África e Ásia é iminente. Neste contexto, o desenvolvimento do algodão GM apresentado neste trabalho torna-se promissor para o controle sustentável do bicudo-do-algodoeiro.

Atualmente, não há cultivar comercial de algodão – seja convencional ou GM - resistente ao *A. grandis*. Estudos recentes têm apresentado variedades brasileiras de algodão expressando a toxina Cry11a12, o que resulta em até 60% de mortalidade do inseto. As plantas de algodão geneticamente modificadas, geradas neste estudo são promissoras para caracterização de plantas no campo e eventual comercialização, uma vez que estas plantas atingiram 100% de mortalidade.

Portanto, o presente estudo demonstrou que plantas de algodão GM superexpressando a toxina Cry10Aa são altamente promissoras para serem inseridas em programas de melhoramento genético, após avaliação a campo, uma vez que resultaram em até 100% de mortalidade do bicudo-do-algodoeiro. Representando assim um grande avanço para esse grave problema biótico que afeta a cultura do algodão e pode proporcionar uma melhoria e aumento substancial na produção de algodão em todo o mundo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrapa – Associação Brasileira de Produtores de Algodão. (2018) Estatísticas: O Algodão no mundo. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-noMundo.aspx>. Acessado em 14 de Junho de 2018.

Adang, M.J., Crickmore, N., Jurat-Fuentes, J.L., (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action, in: Dhadialla, T.S., Gill, S.S. (Eds.), *Advances in Insect Physiology*. Academic Press, pp. 39-87.

Aguiar, R.W.S. (2007). Estudo da toxicidade de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto. UnB, Brasília, 130p. *Tese de doutorado*.

Aguiar, R.W.S., Martins, E.S., Ribeiro, B.M. and Monnerat, R.G. (2012) Cry10Aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera:Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields. *BtRes.* 3, 20–28.

Almeida, R. P.; Silva, C. A. D., (1999). Manejo integrado de pragas do algodoeiro. Brasília, DF: *Embrapa Informação Tecnológica*: v. 2, p. 753-820.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.

Amorim, M. S.; et al. (2001) Zoneamento agroecológico e definição da época de semeadura do algodoeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, Passo Fundo, v. 9, n. 3, (número especial: Zoneamento Agrícola), p. 422-428.

Amugune N, Anyango B, Mukiyama T. (2011) Agrobacterium-mediated transformation of common bean. *African Crop Sci* 19: 137-147.

Andrade S G, et al. (2011). *Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Embrapa Cerrados. Planaltina,

Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R. and Rech, E.L. (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile and transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1–6.

Aragão, F.J.L., Vianna, G.R., Carvalheira, S.B.R.C. and Rech, E.L. (2005) Germline genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Sci.* 168, 1227–1233.

Artico, S., Nardeli, S.M., Brilhante, O., Grossi-de-Sa, M.F., Alves-Ferreira, M., (2010). Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC plant biology* 10, 49.

Artico, S., et al. (2013) Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32, 630–643.

Artico, S., et al., (2014a.) Isolation and Characterization of Three New Promoters from *Gossypium hirsutum* that Show High Activity in Reproductive Tissues. *Plant Molecular Biology Reporter* 32, 630-643.

Artico, S., et al., (2014b). Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. *BMC Genomics* 15, 854.

Azambuja, R. & Degrande, P.E. (2014) Thirty years of cotton boll weevil in Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81, 377–410.

- Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, Eisenhaber F. (2001) Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci*, 6(10):463-470. 15.
- Bakhsh, A., Qayyum, R.A., Shamim, Z. and Husnain, T. (2011) A mini review: RuBisCo small subunit as a strong, green tissue-specific promoter. *Arch. Biol.Sci.* 63, 299–307.
- Bastos, C.S., Pereira, M.J.B., Takizawa, E.K., Ohl, G. and Aquino, V.R. (2005) Bicudo do Algodoeiro: Identificação, Biologia, Amostragem e Técnicas de Controle. Campina Grande: Embrapa Algodão, (*Embrapa Algodão. Circular Técnica*) Vol. 79, 31 p.
- Baum, J.A., et al. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25, 1322-1326.
- Beltrão, N. E. M.; Azevedo, D. M. P., (2008) Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: O Agronegócio do algodão no Brasil. Brasília, DF: *Embrapa Informação Tecnológica*: v. 1, p. 1033-1098.
- Benfey, P. N.; Ren, L.; Chua, N. H. (1990) Tissue-specific expression from camv 35s enhancer subdomains in early stages of plant development. *Embo Journal*, v. 9, n. 6. p. 1677-1684.
- Becerra, C. A. V. (2000) World Cotton Demand in the Future: Issues on Competitiveness. 25<sup>th</sup> International Cotton Conference. Bremen, Germany: March, 23.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M. and Bordoli, L. (2014) SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 42, W252–W258.
- Borém, A., et al.. (2003) Considerations about cotton gene escape in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*.
- Borém, A. (2001) *Escape gênico e transgênicos*. Viçosa, MG: UFV, 206 p.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M., (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology 49, 423-435.
- Bruderer, S., Leitner, K.E. and Lindenmeyer, J. (2003) Genetically modified (GM) crops: molecular and regulatory details. Basel, \_Svica, BATS, *Centre for biosafety and sustainability* (<http://www.bats.ch/gmo-watch/>).
- Burand, J.P., Hunter, W.B., (2013). RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, S68-S74.
- Busoli, A.C. and Michelotto, M.D. (2005) Algodão: Fechando o Cerco. pp. 18–21. Brazil: *Cultivar*.

Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M., (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science* 11, 302-308.

Conab. (2018) <http://www.conab.gov.br>, acessado em 05/08/2018.

Corrêa, S. T.; Couto, E. P. (2015) A história do algodão no Brasil e seu desenvolvimento no estado do Mato Grosso, o atual maior produtor do país. *Disponível em: <<http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica>>*.

Christensen, A.H. and Quail, P.H. (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5, 213–218.

Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. et al. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807–813.

Crickmore, N., Adang, M. J., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In *Advances in insect physiology* (Vol. 47, pp. 39-87). Academic Press.

CTNbio. (2018) <http://ctnbio.mcti.gov.br/a-ctnbio>, acesso em 23/07/2018.

De Lima, Jr. I.S., Degrande, P.E., Miranda, J.E. and Santos, W.J. (2013) Evaluation of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera:Curculionidae) suppression program in the state of Goiás, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 42, 82–88.

de Oliveira, R.S., et al. (2016). Transgenic cotton plants expressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). *Frontiers in plant science* 7.

de Souza Freire, I., et al. (2014). Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and hematotoxicity of the recombinant spore-crystal complexes Cry1Ia, Cry10Aa and Cry1Ba6 from *Bacillus thuringiensis* in Swiss mice. *Toxins* 6, 2872-2885.

Donovan, W.P., et al. (1992) Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3921–3927.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-1797.

Evdokimov, A.G., Moshiri, F., Sturman, E.J., Rydel, T.J., Zheng, M., Seale, J.W. and Franklin, S. (2014) Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Sci.* 23, 1491–1497.

Farias, D.F., Peijnenburg, A.A.C.M., Grossi-de-Sá, M.F., Carvalho, A.F.U., (2015). Food safety knowledge on the Bt mutant protein Cry8Ka5 employed in the development of coleopteran-resistant transgenic cotton plants. *Bioengineered* 6, 323-327.

Foster, R.N., (2009). Chapter 30 - Boll Weevil, in: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.), *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*. *Academic Press*, San Diego, pp. 116-117.

Freire, I.S., Miranda-Vilela, A.L., Barbosa, L.C.P., Martins, E.S., Monnerat, R.G. and Grisolia, C.K. (2014) Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and hematotoxicity of the recombinant spore-crystal complexes Cry1Ia, Cry10Aa and Cry1Ba6 from *Bacillus thuringiensis* in Swiss mice. *Toxins*, 6, 2872–2885.

Gallo, D., Nakano, O., Neto, S.S., Carvalho, R.P.L. and Baptista, G.C. (2002) Manual de entomologia agrícola. In Omoto. *Entomologia Agrícola*. FEALQ, Brasil (de Moraes, R. C. B., ed.), pp. 67-69. Piracicaba: Agronomica Ceres.

Gao, C., (2018). The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 275.

Genschik P, Marbach J, Uze M, Feuerman M, Plesse B, Fleck J: (1994) Structure and promoter activity of a stress and developmentally regulated polyubiquitin-encoding gene of *Nicotiana tabacum*. *Gene*, 148(2):195-202.

Gillet, F.X., et al. (2017). Investigating Engineered Ribonucleoprotein Particles to Improve Oral RNAi Delivery in Crop Insect Pests. *Frontiers in physiology* 8, 256.

Gould, F., (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review Entomology* 43, 701-726.

Goodstein, D.M., Shu, S.Q., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* 40.

Gowda, A., et al. (2016) A transgenic approach for controlling *Lygus incotton*. *Nat. Commun.* 7, 1–6.

Gravena, S. (2001) Quem é esse tal de bicudo. *Cultivar Grandes Culturas*, Pelotas, n.25, p.42-44.

Grossi-de-Sa, M.F., Guimarães, L.M., Batista, J.A.N., Viana, A.A.B., Rocha Fragoso, R. and Rocha, T.L. (2012) Compositions and methods for modifying gene expression using the promoter of ubiquitin conjugating protein coding gene of cotton plants. U.S. Patent 8227588 B2, filed Jan 21, 2008 and issued July 24, 2012.

Grossi-de-Sa, M.F., Lucena, W., Souza, M.L., Nepomuceno, A.L., Osir, E.O., Amugune, N., Hoa, T.T.C. et al. (2006) Transgene expression and locus structure of Bt cotton. In *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms. Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil* (Hilbeck, A., Andow, D. A., Fontes, E. M. G., eds.), pp. 93–107. Wallingford, UK: CAB International.

Grossi-de-Sa, M.F., Magalhaes, M.Q., Silva, M.S., Silva, S.M., Dias, S.C., Nakasu, E.Y.T., Brunetta, P.S.F. 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. *BMB Rep.* 40, 773–782.

Habib, M.E.M. and Fernandes, W.D. (1983) *Anthonomus grandis* Boheman (Curculionidae) j\_aest\_a na lavoura algodoeira do Brasil. *Revista de Agricultura*, 58, p. 74.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.1–R19.14.

Hobbs, S. L., Kpodar, P., & DeLong, C. M. (1990). The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant molecular biology*, 6, 851-864.

Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(2), 242-255.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – (2018). Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. p. 1-72.

ISAAA, (2018) *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*, GM Approval Database . Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>>, acesso: 14 de Agosto de 2018.

Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmT). (2015) *O bicudo-do-algodoeiro (Anthonomus grandis BOH., 843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle*/editor técnico: Jean Louis Belot - Cuiab\_a (MT).

James, C.. (2006) Situação Global da Comercialização das Lavouras GM: 2006. *ISAAA Briefs No. 35*. Ithaca, Nova York.

James, C. (2015) ISAAA Brief 49–2014: Executive summary. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications*.

Kearse, M., et al. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647-1649.

Kohli, A., Melendi, P.G., Abranches, R., Capell, T., Stoger, E., Christou, P., (2006). The Quest to Understand the Basis and Mechanisms that Control Expression of Introduced Transgenes in Crop Plants. *Plant signaling & behavior* 1, 185-195.

Kranthi, K.R., 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* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Curr. Sci. Bangalore*, 89, 291–298.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685. Lambret-Frotte, J., et al. (2016). Promoter isolation and characterization of GhAO-like1, a *Gossypium hirsutum* gene similar to multicopper oxidases that is highly expressed in reproductive organs. *Genome* 59, 23-36.

Laskowski, R.A. (2007) Enhancing the functional annotation of PDB structures in PDBsum using key figures extracted from the literature. *Bioinformatics* 23, 1824-1827.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lajolo, F. M.; Nutti, M. R. (2003) Transgênicos: bases científicas da sua segurança. São Paulo: *Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*. 112 p.

Leigh, T. F.; Roach, S. H.; Watson, T. F. (1996) Biology and ecology of important insect and mite pests of cotton. p. 17-20. In: KING, E. G.; PHILLY, J. R.; COLEMAN, R. J. *Cotton Insects and Mites: Characterization and Management*, 3, The cotton foundation reference book series.

Loka, D. A., & Oosterhuis, D. M. (2010). Effect of high night temperatures on cotton respiration, ATP levels and carbohydrate content. *Environmental and Experimental Botany*, 68(3), 258-263.

Maagd, R.A. (2015) Bacillus thuringiensis-based products for insect pest control. In Principles of Plant–Microbe Interactions (Lugtenberg, B., ed.), pp. 185–192. Switzerland: *Springer International Publishing*.

Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4), 193-199.

Macedo, L.L. Pe et al. (2017). Knocking down chitin synthase 2 by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research and Innovation* 1, 72-86.

Magalhaes, D.M., Borges, Et al. (2012). Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Journal of chemical ecology* 38, 1528-1538.

Magalhaes, D.M., et al. (2016). Influence of Two Acyclic Homoterpenes (Tetranorterpenes) on the Foraging Behavior of *Anthonomus grandis* Boh. *Journal of chemical ecology* 42, 305-313.

Martins, E.S., et al. (2007a) Characterization of Bacillus thuringiensis isolate toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Biol. Control*, 40, 65–68.

Martins, W.F., Ayres, C.F., Lucena, W.A., (2007b). Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the New World. *Genetics and Molecular Research* 6, 23-32.

Martins, E.S., et al. (2008). Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of applied microbiology* 104, 1363-1371.

Martins, E.S. et al. (2010) Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of Bacillus thuringiensis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 138–145.

Mapa, (2018) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Plano agrícola e pecuário 2017/2018*. Brasília, p. 1-48.

- Mahalakshmi, A. and Shenbagarathai, R. (2010) Homology modelling of Cry10Aa toxin from *B. thuringiensis israelensis* and *B. thuringiensis* subsp. LDC-9. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 28, 363–378
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A.M. and Cattivelli, L. (2008) Abiotic stress response in plants: when posttranscriptional and post-translational regulations control transcription. *PlantSci.* 174, 420–431.
- Monnerat, R. G. (2012) Cry10Aa Protein is Highly Toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera:Curculionidae), an Important Insect Pest in Brazilian Cotton Crop Fields. *Bt Research*, Vol.3, No.4, 20-28.
- Monnerat, R.G., Dias, S.C., Oliveira-Neto, O.B., Nobre, S.D., Silva-Werneck, J.O. and Grossi-de-Sa, M.F. (2000) Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Comunicado Técnico, 46, 1–4.
- Monnerat, R. G.; Dias, d.; Silva, S; Martins, e.; Berry, c.; Falcão, r.; Gomes, A. M. m.; Praça, l.; Soares, C. M. (2005) Screening of *Bacillus thuringiensis* strain effective against mosquitoes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40, p. 103-106,
- Monnerat, r. g.; Batista, a. c.; Medeiros, p.; Martins, e.; Melatti, v. m.; Praça, l. (2007). Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control* 41, p. 291-295.
- Mukhopadhyay, D., Riezman, H. (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 315:201-205. 17.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Muratani M., Tansey W, P.(2003) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 4(192-201). 18.
- Nalivaeva, N. N; Turner A, J. (2001) Post-translational modifications of proteins: Acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics*, 1:735-747. 16.
- Navon, A. (2013) Laboratórios Dipel”, Foray” crops, greenhouse, Chicago IL, orchard fruits & US nuts, ornamentals, forestry, stored products. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, 356 p.
- Neves, R.C., Colares, F., Torres, J.B., Santos, R.L., Bastos, C.S., (2014). Rational Practices to Manage Boll Weevils Colonization and Population Growth on Family Farms in the Semiarid Region of Brazil. *Insects* 5, 818-831.
- Oecd-Fao Agricultural Outlook (2018): Special Feature – Brazil: Prospects and Challenges. Group of Commodity Markets – *Working Party on Agricultural Policies and Markets*, 26-27.
- Oliveira, G. R. (2008). *Evolução in vitro de moléculas cry ativas contra Anthonomus grandis e Spodoptera frugiperda*. Porto Alegre. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto alegre.

Oliveira, G.R., et al. (2011). Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology* 11, 85.

Oliveira, R.S., et al. (2016) Transgenic cotton plantsexpressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodopterafrugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Front. Plant Sci.* 7, 1–11.

Olsen, K.M., Daly, J.C., Holt, H.E. & Finnegan, E.J. (2005) Season-longvariation in expression of Cry1Ac gene and efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxin in transgenic cotton against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 98, 1007–1017.

Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodríguez-Almazán, C., Soberón, M., Bravo, A., (2009). Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 30, 589-595.

Pardo-Lopez, L., Soberon, M., Bravo, A., (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS microbiology reviews* 37, 3-22.

Pathak, L., Parvez, N., Pate, A.I. & Jani, J. (2015) Insect resistance to *Bacillusthuringiensis* (Bt) transgenic crops and its management. In *New Horizons inInsect Science: Towards Sustainable Pest Management* (Chakravarthy, A. K.,ed.), pp. 83–92. *India: Springer*.

Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., et al. (1990). Insect resistant cotton plants. *Biotechnology* 8, 939–943. doi: 10.1038/nbt1090-939.

Perlak, F.J., et al. (2001). Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA-early promises versus today's reality. *Plant Journal* 27, 489-501.

Pimenta, M., et al. (2016). Survival and preference of cotton boll weevil adults for alternative food sources. *Brazilian Journal of Biology* 76, 387-395.

Puspito, A.N., et al. (2015) Transformation and evaluation of Cry1Ac + Cry2A and GTGene in *Gossypium hirsutum* L. *Front. Plant Sci.* 6, 1–13.

Randel, R.D., Chase, C.C. Jr. and Wyse, S.J. (2002) Effects of gossypol andcottonseedproducts on reproduction of mammals. *J Animal Sci*70: 1628-1638.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X., (2013). An improvement of the  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics* 3, 71-85.

Rech, E.L., Vianna, G.R. and Aragão, F.J.L. (2008) High-efficiencytransformation by biolistics of soybean, common bean and cottontransgenic plants. *Nat. Protoc.* 3, 410–418.

Ribeiro, P.A., et al. (2010) Alternative food sources andoverwintering feeding behavior of the boll weevil, *Anthonomus grandisboheman* (coleoptera: curculionidae) underthe tropical conditions of centralBrazil. *Neotrop. Entomol.* 39, 28–34.

Ribeiro, T.P., et al. (2017). Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. *Plant biotechnology journal* 15, 997-1009.

Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of life reviews*, 9(3), 308-345.

Roh, J. Y. et al. (2007) *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, n. 4, p. 547-559.

Sali, A. (1995) Modelling mutations and homologous proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 437-451.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 9, 671-675.

Santos, W. J. (2011) Monitoramento e controle das pragas do algodoeiro. In: CIA, E.; Freire, E. C.; Santos, W. J. (Eds.). *Cultura do algodoeiro*. Piracicaba: Potafós. p.133-179.

Schneider-Orelli, O. (1947) *Entomologisches praktikum: Einführung in die landundforstwirtschaftliche Insektenkunde*. Switzerland: Sauerländer Aarau.

Shah, J.V., Shailesh, B.L., Rakeshkumar, Y. and Sanjay, S.I. (2016) Activity of two indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates on lepidopteran insect pest *Amsacta albistriga* (Arctiidae). *Int. J. Appl. Res.* 2, 20-23.

Silva, C.R., Monnerat, R., Lima, L.M., Martins, E.S., Melo Filho, P.A., Pinheiro, M.P. & Santos, R.C. (2015) Stable integration and expression of a cry1Ia gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest Manag. Sci.* 11, 1-9.

Silva, C.R., et al. (2016). Stable integration and expression of a cry1Ia gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest Management Science* 72, 1549-1557.

Silvie, P. J.; Thomazoni, D.; Soria, M. F.; Saran, P. E.; Bélot, J. L. (2013) *Pragas e seus danos em algodão*. Primavera do Leste, MT., 184 p. (IMAMT Boletim de identificação nº 1).

Sociedade Nacional de Agricultura. (2018) PIB do setor agropecuário recua, mas fatia é de 23%. Rio de Janeiro, 21 Jan. 2018. Disponível em: <<http://sna.agr.br/pib-do-setor-agropecuario-recua-mas-fatia-e-de-23>> .

Sohrab, S. S. (2016) Development of Cotton leaf curl virus resistant transgenic cotton using antisense BC1 gene. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 23, n. 03, p. 358-362.

Soria, M.F., Thomazoni, D., Tachinardi, R. and Degrande, P.E. (2013) Alerta para o bicudo-do-algodoeiro—breve panorama pr\_e-safra 2012/2013 e ac\_oes para o combate da praga. Circular Técnica, *Instituto Mato-grossense do Algodão*, 3, 1-4.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Thorne, L., et al. (1986) Structural similarity between the lepidoptera-anddiptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. “kurstaki” and “israelensis”. *J. Bacteriol.* 166, 801–811.

Tomquelski, G. V & Martins, G. M. (2008). Bicudo em algodão. *Cultivar Grandes Culturas*, Pelotas, n.111, p.42-45.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci.* 76, 4350–4354

Usda. (2018) *Agricultural Projections*. Disponível em: .Acesso em: maio 2018.

Valicente, F. H.; Barreto, M. R. (2003) *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil:geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, v. 32, n. 4, p. 639-644.

Viana, A.A.B., et al. (2011) Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 50UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. *BMC Biotechnol.* 11, 1–11.

VIDAL NETO, F. D. C., & Freire, E. C. (2013). Melhoramento genético do algodoeiro. *Embrapa Agroindústria Tropical-Capítulo em livro científico (ALICE)*.

Yang, Z., Chen, H., Tang, W., Hua, H., Lin, Y., (2011). Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. *Pest management science* 67, 414-422.

Yang, X., et al. (2012). Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real-time quantitative PCR and the 2<sub>-DDCt</sub> method. *Afr. J. Biotechnol.* 11,6226–6233.

Ye, R., et al. (2009) Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C\* free endosperm. *Pest Manag. Sci.* 65, 1015–1020.

Zhang, T., et al. (2015) Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nature Biotechnology* 33, 531.

Zhao, S. & Fernald, R.D. (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* 12, 1047–1064.