



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UMA VARIEDADE
BRASILEIRA DE ALGODÃO PARA CONTROLE DO
BICUDO-DO-ALGODOEIRO**

Autora: Dagna Maria Laurindo da Silva

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília – DF

2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UMA VARIEDADE
BRASILEIRA DE ALGODÃO PARA CONTROLE DO
BICUDO-DO-ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Brasília – DF

2018

Dissertação de autoria de Dagna Maria Laurindo da Silva, intitulada
“TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE UMA VARIEDADE BRASILEIRA DE
ALGODÃO PARA CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO”, apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular da
Universidade de Brasília, em (22/02/2018), defendida e aprovada pela banca
examinadora abaixo assinada:

Prof. Dra. Maria Fátima Grossi de Sa

Orientador

Prof. Dra. Maria Eugênia Lisei de Sa

EPAMIG

Prof. Dr. Elíbio Leopoldo Rech

Embrapa Cenargen

Prof. Dra. Maria Sueli Felipe

UNB/UCB

Brasília- DF

2018

Dedico esta obra

Em primeiro lugar, a Deus, por me dar sabedoria e pela oportunidade de me permitir crescer a cada dia.

Aos meus pais, Ivo Laurindo da Silva e Maria de Fatima Mustafa, por me proporcionarem amor, carinho e por me apoiarem nas minhas decisões, por serem minha família tão querida e amada.

A minha orientadora, professora Maria Fátima Grossi de Sá, por ter me aceitado em sua equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta Praga.

Agradecimentos

À Universidade de Brasília – UnB e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ser um centro de excelência, que me ofereceu as condições necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos Thuanne, Reneida, Joel, Athus e Dorival pela ajuda e pelas palavras de apoio.

A equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga e a todas as pessoas que por aqui passaram durante a fase do meu mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

Autora: Dagna Maria Laurindo da Silva

Título: Transformação genética de uma variedade brasileira de algodão para controle do bicudo-do-algodoeiro

Curso: Mestrado da Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Data da defesa: 22/02/2018.

Orientadora: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá.

A cotonicultura desempenha um importante papel para o agronegócio brasileiro, situando-se entre as dez maiores fontes de riquezas neste setor. A cultura é fortemente comprometida por insetos-praga, incluindo o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera; Curculionidae), uma das principais pragas, por possuir um dinamismo reprodutivo, no qual se alimenta e deposita seus ovos em estruturas florais. O presente estudo é focado no desenvolvimento de plantas de uma variedade brasileira de algodão GM para resistência ao bicudo do algodoeiro. O vetor de expressão utilizado na transformação de plantas foi desenvolvido para expressar uma toxina Cry10Aa Mod, no qual o gene *cry10Aa Mod* está sob controle de um promotor de algodão - *GhPGFS1*, que direciona a expressão preferencialmente ao botão floral. O cassete de expressão foi introduzido em embriões da cultivar BRS372 pelas técnicas de agrolística e biobalística. As plantas GM foram pré-selecionadas pela tolerância ao Imazapyr, indicando uma eficiência de transformação em torno de 0,5%. A caracterização molecular inicial foi realizada em 139 plantas. Destas, doze plantas T0 apresentaram resultados PCR positivo para o gene *cry10Aa Mod* e para o gene de seleção *ahas*. A análise de qPCR com base em $2^{-\Delta\Delta C_t}$ revelou que as plantas GM T0 possuem apenas uma cópia do transgene. A análise quantitativa da expressão da proteína Cry10Aa Mod mostrou níveis elevados, variando de aproximadamente 18,0 a 27 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco no botão floral. Os bioensaios realizados demonstraram um efeito entomotóxico significativo, chegando a níveis de 100% de mortalidade de larvas. Os eventos de transformação de algodão GM gerados neste estudo representam um grande avanço para o controle do *A. grandis* que contribuirá de maneira significativa para a produção e produtividade do algodão brasileiro.

Palavras chave: Transformação genética; agrolística; *Gossypium hirsutum*; toxina Cry; *Anthonomus grandis*; *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística.

ABSTRACT

Cotton cultivation plays an important role for Brazilian agribusiness, ranking among the ten largest sources of wealth in this sector. The crop is strongly affected by pest insects, including cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera; Curculionidae), one of the main pests because it has a reproductive dynamism, in which it feeds and deposit its eggs in floral structures. The present study is focused without plant development of a Brazilian GM cotton event presenting high resistance to CBW. A plant vector was developed to express a Cry10Aa Mod toxin, in which the *cry10Aa Mod* gene regulated by the cotton promoter-*GhPGFS1*, which directs the expression preferentially to the floral bud. The expression cassette was introduced into embryos of the cultivar BRS372 by the agrolistic and biolistic techniques. GM plants were preselected for tolerance to Imazapyr indicating efficiency of transformation around 0.5%. An initial molecular characterization was performed 139 plants. Of these, twelve T0 plants presented PCR positive results for the *cry10Aa Mod* gene and for the *ahas* selection gene. An analysis of qPCR based on $2^{-\Delta\Delta C_t}$ revealed that GM T0 plants possess only one copy of the transgene. A quantitative analysis of Cry10Aa Mod protein expression showed high levels, ranging from approximately 18.0 to 27 $\mu\text{g/g}$ of fresh floral bud tissue. Bioassays performed demonstrated a significant entomotoxic effect reaching 100% larval mortality. The GM cotton transformation events generated in this study represent a great advance for the control of *A. grandis*, which contribute significantly to the production and production of Brazilian cotton.

Keywords: genetic transformation; agrolistic; *Gossypium hirsutum*; Cry toxin; *Anthonomus grandis*; *Agrobacterium tumefaciens*, biobalistic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Anthonomus grandis</i> em botão floral de algodão	19
Figura 2- Morfologia de <i>B. thuringiensis</i>	21
Figura 3- Modo de ação das toxinas de <i>B. thuringiensis</i> Error! Bookmark not defined.	24
Figura 4- Transformação de plantas a partir do método <i>Agrobacterium spp.</i>	24
Figura 5- Esquema da construção contendo o gene <i>cry10Aa Mod.</i> Error! Bookmark not defin	
Figura 6- Transformação genética de embriões via agrolística e subsequente seleção de plantas tolerantes ao herbicida imazapyr. Error! Bookmark not defined.	32
Figura 7- Cultivo das plantas na casa de vegetação. Error! Bookmark not defined.	33
Figura 8- PCR de colônia utilizando primer <i>cry10</i> ativa. Error! Bookmark not defined.	39
Figura 9- Análise de PCR de DNA genômico da geração T0 para detectar o gene <i>cry10Aa Mod.</i>	Error! Bookmark not defined. 41
Figura 10- Imunodeteccção de proteínas Cry10Aa Mod em plantas de algodão GM. O anticorpo primário utilizado foi o policlonal anti Cry10Aa.	43
Figura 11- Taxa de mortalidade de larvas de <i>A. grandis</i> em botão floral de algodão expressando a toxina Cry10Aa Mod.	455
Figura 12- Bioensaio comparativo entre protoxina e toxina ativa.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sumário dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação do gene <i>cry10Aa Mod</i>	34
Tabela 2- Condições do ciclo utilizados na reação de PCR para a amplificação do gene <i>cry10Aa Mod</i>	35
Tabela 3- Sumário dos oligonucleotídeos utilizados na qPCR para verificação do número de cópias.....	36
Tabela 4- Número de cópias do gene <i>cry10Aa Mod</i> em plantas T0 de algodão GM, pelo método $qPCR-2^{-\Delta\Delta Ct}$	42

LISTA DE ABREVIATURAS

GM - Geneticamente Modificado

Cry – Deltaendotoxinas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis*

µg – microgramas

g – gramas

spp. – espécies

mod – modificada

BamHI – enzima de restrição derivada de *Bacillus amyloli*

Pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

DNA – ácido desoxiribonucléico

T0 – geração inicial

M – marcador molecular

CM – mortalidade corrigida

qPCR – PCR quantitativo

mm – milímetro = 10^{-3} m

°C- graus Celsius

Bt – *Bacillus thuringiensis*

Cyt – Deltaendotoxinas citolíticas produzidas pelo *Bacillus thuringiensis*

mg – miligrama = 10^{-3} g

mL – mililitros = 10^{-3} L

rpm – rotação por minuto

LB – Luria Bertani

L – litros

M – molar

μ M – micromolar = 10^{-6} M

μ L – microlitro = 10^{-6} L

nM – nanomolar = 10^{-9} M

psi – unidade de medida de pressão

β – Beta

PVP-40 – Polivinilpirrolidona

TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA

T_m – Temperatura média

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

KCL – Cloreto de Potássio

ng – nanograma = 10^{-9} g

PBS – Tampão Fosfato Salino

BSA – Albumina soro bovina

nm – nanometro = 10^{-9} m

Da – Dalton

T-DNA – DNA de transferência

vir – virulência

BRS – cultivar de algodoeiro

NT – não transformada

CaMV35S – Promotor do RNA ribossômico 35S do vírus da couve-flor

T1 – primeira geração filial, oriunda dos parentais (T0)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1 Cotonicultura: aspectos gerais e importância.....	16
1.2 <i>Anthonomus grandis</i> , o bicudo do algodoeiro	17
1.3 Métodos de transformação.....	19
1.4 Utilização de promotores na transformação de plantas.....	22
1.5 Toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
2.OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Construção do vetor.....	28
3.2. Esterilização e preparo das sementes	29
3.3. Preparo dos hipocótilos	30
3.4 Transformação via agrolística	30
3.5 Transformação via biobalística.....	32
3.6 Caracterização molecular dos transformantes primários (T0).....	33
3.6.1 Extração e quantificação de DNA.....	33
3.6.2 Seleção dos transformantes primários por PCR.....	34
3.6.3 Análise do número de cópias: qPCR-2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	35
3.6.4 Quantificação da expressão da proteína Cry10Aa Mod por ELISA.....	36
3.7 Caracterização fenotípica dos transformantes primários (T0).....	37
3.7.1Desafio de eventos de transformação T0.....	37
3.8 Avanço da progênie	38
3.8.1 Obtenção da geração T1.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	39
4.2. Transformação genética de embriões de algodão	39
4.3. Integração estável do gene <i>cry10Aa Mod</i> em plantas T0	40
4.4. Análise do número de cópias: qPCR-2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	41
4.5. Quantificação da expressão da proteína Cry10Aa Mod por ELISA.....	42
4.6 Desafio de plantas de algodão da geração T0 ao bioensaio com <i>Anthonomus grandis</i>	43
5. PERSPECTIVAS	47

6.CONCLUSÃO	47
7.REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cotonicultura desempenha um importante papel para o agronegócio brasileiro, principalmente, pelo valor econômico agregado aos seus produtos e a adaptabilidade da cultura às condições edafoclimáticas. O algodão é uma das culturas de maior relevância da agricultura, sendo considerada uma das principais *commodities* do agronegócio brasileiro. Representa grande importância sócio-econômica, gerando renda direta e indiretamente aos diversos elos da cadeia produtiva (BUENO e ROMERO, 2006). O algodão está entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário no Brasil, porém essa cultura vem sendo fortemente ameaçada por fatores bióticos e abióticos. Dentre os bióticos, o ataque de pragas foi o principal responsável pela redução da área plantada em 4% na safra 2017 em relação à safra anterior (USDA, 2018; CONAB, 2018).

O algodoeiro é uma planta com um alto grau de aproveitamento dos seus subprodutos, sendo a fibra, o seu principal produto, utilizada, principalmente, na indústria têxtil. Além da fibra, as sementes são utilizadas na indústria de alimentação animal, como farelo e torta; além de seu uso na indústria de óleo vegetal por apresentar alto potencial linoléico (SOARES, 2013).

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. Dentre as pragas 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 (GALLO et al., 2002).

Desde meados da década de 80, o cultivo do algodão vem sofrendo sérios problemas, como o estabelecimento do *A. grandis* (Coleoptera; Curculionidae) no país, principalmente por possuir um dinamismo reprodutivo, no qual o inseto se alimenta e deposita seus ovos em estruturas florais. Em regiões altamente infestadas por esta praga e onde o controle adequado não é bem aplicado, o inseto pode inviabilizar o cultivo, causando prejuízos diretos à comercialização do algodão

(PRAÇA, 2007). Atualmente, o controle do inseto é realizado principalmente pelo uso de inseticidas químicos, aumentando substancialmente os custos de produção. O uso da biotecnologia se apresenta como uma alternativa promissora, por meio da incorporação de genes exógenos, para a obtenção de plantas de algodão GM resistente a inseto-praga. Em relação ao bicudo do algodoeiro, diferentes pesquisas encontram-se em andamento, com a integração de genes *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) em cultivares melhoradas de algodão, desenvolvidas pela Embrapa (IMA, 2015; OLIVEIRA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2017). Alternativas biotecnológicas aplicadas ao controle de insetos pragas vem sendo fortemente adotadas pelos agricultores no mundo e no Brasil e o controle do bicudo do algodoeiro por meio da tecnologia aqui aplicada atende às demandas do agronegócio do algodão contribuindo para o aumento da produção e produtividade, redução de custos e diminuição dos danos ao meio ambiente.

1.1 Cotonicultura: aspectos gerais e importância

O algodoeiro é uma angiosperma da classe das dicotiledôneas, pertencente à ordem Malvales, família das Malvaceae, gênero *Gossypium* (PENNA, 2005). Existem 52 espécies de algodão pertencentes à família *Malvaceae* e ao gênero *Gossypium*, dentre as quais, apenas quatro são cultivadas para fins comerciais, a *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium herbaceum* L. A espécie *Gossypium hirsutum* L. é a mais utilizada comercialmente, responsável por 90% da produção mundial de algodão, sendo seu cultivo de extrema importância socioeconômica (SOARES, 2013).

O algodão em caroço é o produto colhido e é composto pela pluma (fibra) e pelo caroço (sementes com “línter”, ou seja, fibras curtas). É amplamente utilizado na indústria de fiação e tecelagem, na indústria de alimentação animal (farelo) e humana (óleo), além de ser usado para a produção de grande número de produtos secundários (SOARES, 2013).

O estado do Mato Grosso é responsável por 60% da produção no país e a Bahia por 26% (CONAB, 2015). A produção mato-grossense, para a safra de 2017/18 deve ocupar uma área de 725,6 mil hectares, com aumento de 15,8% se

comparado ao ano anterior. Este aumento na área plantada é reflexo dos preços atrativos que geraram oportunidade de comercialização antecipada de grandes volumes de fibra (IMEA, 2017).

Quanto à produtividade, é estimada uma média de 261,6 arrobas por hectare na safra 2017/18, evidenciando um recuo inicial de 5,4% em relação à produtividade da safra anterior (IMEA, 2017). Em relação à produção mato-grossense de algodão em caroço, estima-se um valor de 2,85 milhões de toneladas e 1,2 milhões de toneladas de pluma, 9,5 % a mais que a safra passada (IMEA, 2017).

O incremento na produção brasileira de algodão foi possível devido às boas condições climáticas do país e ao elevado nível tecnológico adotado, por meio da utilização de cultivares altamente produtivas e adaptadas a vários fatores bióticos e abióticos (NASCIMENTO e SILVA, 2010). Apesar do cenário favorável, houve uma redução na área plantada de algodão no país em torno de 4%, devido, principalmente, ao ataque de pragas que interfere diretamente no rendimento e qualidade da fibra. Dentre as diferentes espécies de insetos-praga que afetam a cultura do algodão, o coleóptero *A. grandis* é considerado a praga chave da cotonicultura, trazendo grandes prejuízos à produção mundial (CONAB, 2015, 2017).

1.2. *Anthonomus grandis*, o bicudo do algodoeiro

O *A. grandis* é originário do México e foi descrito por C. H. Boheman em 1843. No ano de 1892, o inseto se dispersou para os Estados Unidos e, subsequentemente, teve sua introdução no Brasil e no Paraguai. O inseto foi identificado inicialmente no Brasil na região de Campinas-SP, próximo ao aeroporto de Viracopos, em 1983, e disseminou rapidamente para grandes áreas produtoras de algodão (AZAMBUJA & DEGRANDE, 2013).

O bicudo do algodoeiro, um dos principais insetos-praga que atacam a cotonicultura no Brasil e nas Américas, é um coleóptero que mede em torno de 7mm, apresenta coloração castanha, rostro bastante alongado e um par de espinhos nas patas dianteiras (GALLO et al., 2002). Trata-se de um inseto que apresenta metamorfose completa, elevado dinamismo populacional e gera inúmeros danos por usar estruturas reprodutivas para alimentação e oviposição (SANTOS et al., 2002). O controle do bicudo na Região Centro-Oeste é realizado, principalmente, com

inseticidas químicos, sendo necessárias entre 10 e 25 aplicações para manter as populações do inseto sob controle. O atraso nas aplicações dos inseticidas ou procedimentos inadequados pode causar até 42% do custo de produção e comprometer em até 70% da produção das fibras. Todo este impacto na cultura do algodão deve-se à adaptabilidade que o inseto desenvolveu, tornando-se uma praga de difícil controle (IMA, 2015).

Durante um ciclo de cultivo do algodoeiro podem ocorrer de 5 a 6 ciclos do inseto, sendo que o período crítico de ataque da praga ocorre de 50 a 90 dias após a emergência das plantas (SILVIE et al., 2013). O bicudo do algodoeiro alimenta-se principalmente de botões florais jovens, devido ao seu aspecto tenro. As brácteas servem como proteção; o orifício de alimentação evidencia a presença da praga na lavoura (GALLO et al., 2002). Além de se alimentarem dos botões florais, as fêmeas os utilizam para a oviposição (SANTOS et al., 2003).

Os ovos que possuem forma elíptica e medem em torno de 1 mm são colocados isoladamente com preferência de um ovo por botão/maçã. Após a abertura da punctura para oviposição, a fêmea recobre a fissura com uma substância cerosa que ela mesma produz, sendo assim, possível distinguir o local da postura dos orifícios de alimentação, os quais permanecem abertos. Geralmente, são realizadas cerca de 6 posturas por dia e a eclosão das larvas ocorre após 2 a 4 dias. Estas larvas se alimentarão do botão floral de 4 a 12 dias, período de intenso acúmulo de reservas. Posteriormente, inicia a fase de pupa, que dura de 2 a 6 dias, fase em que não há alimentação e a metamorfose é intensa (SILVIE et al., 2013).

Um novo ciclo é iniciado quando os adultos emergem do botão floral ou das maçãs e copulam (FIGURA 1). Os botões florais contendo os insetos em desenvolvimento e/ou ovos são abortados e as maçãs novas ficam sujeitas à podridão ou caem no solo entre 5 a 10 dias após a postura dos ovos (IMA, 2015).

A temperatura e a umidade são fatores importantes para o desenvolvimento do ciclo do inseto, onde temperaturas mais altas, em torno de 30°C, reduzem o período de incubação do ovo e estágio pupal (AZAMBUJA & DEGRANDE, 2013).

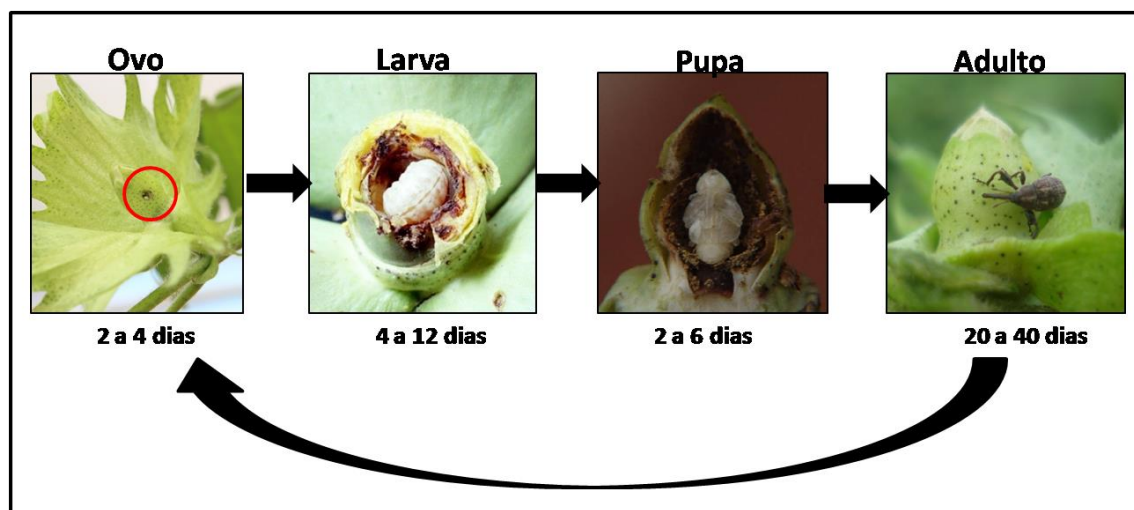


Figura 1- Ciclo de vida do *Anthonomus grandis* em botão floral de algodão. Estágio de ovo dura entre 2 a 4 dias. Após a eclosão, o desenvolvimento larval dura de 4 a 12 dias. Em seguida, o estágio pupal, com duração de 2 a 6 dias, de onde emerge o inseto adulto, podendo apresentar longevidade de 20 a 40 dias. Imagem adaptada ao conteúdo descrito em GALLO et al., (2002).

Levando em consideração seus danos causados à cotonicultura, o controle do inseto é de extrema importância. Como alternativa para o controle da praga, o uso de abordagens biotecnológicas vem sendo destacada, com a integração de diferentes genes em cultivares de algodão, por meio da transformação genética de plantas (SILVA, 2014).

1.3. Métodos de transformação

A transformação genética consiste na transferência de um ou mais genes para o organismo hospedeiro sem que haja fecundação ou cruzamento. Esses organismos transformados geneticamente recebem o nome de transgênicos e os genes inseridos são denominados de transgenes (BESPALHOK, GUERRA e OLIVEIRA, 1999). O uso da transformação genética tem como principal vantagem a possibilidade de transferência de genes entre organismos sexualmente incompatíveis, em oposição ao melhoramento convencional, onde a troca de genes é limitada somente entre espécies que são sexualmente compatíveis (BESPALHOK, GUERRA e OLIVEIRA, 1999).

A transformação genética de plantas pode ser realizada utilizando a tecnologia de biobalística, também chamada de método de bombardeamento de partículas ou, ainda, aceleração de partículas. Este processo faz uso da aceleração de microprojéteis com alta velocidade com o objetivo de inserir ácidos nucléicos e outras substâncias nos diferentes órgãos e tecidos, e que independem do genótipo usado (KLEIN, GRADZIEL, et al., 1988; SANFORD, 1990). 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, que consiste no surgimento de variantes genéticas a partir da cultura de calos (ANDRADE, 2001).

A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria encontrada no solo, do tipo bacilo Gram-negativo, considerada patogênica para várias espécies, em especial para as dicotiledôneas, causando a formação de tumores na região da infecção (SMITH e TOWNSEND, 1907). O crescimento dos tumores é resultado da expressão de genes do T-DNA da bactéria, que é transferido para a célula hospedeira e inserido no genoma nuclear (FIGURA 2), o T-DNA é delimitado por duas bordas formadas por 25 pares de bases conhecidas como “seqüências repetidas”, entre as quais se encontram os genes oncogênicos, responsáveis pela formação de tumores e biossíntese de opinas. Estes genes são de origem bacteriana, porém apenas são funcionais em células de plantas. Sua remoção não diminui a capacidade da bactéria transferir o T-DNA e integrá-lo no genoma da célula hospedeira, porém, inibe a formação de tumores, como desejado no processo de transformação de plantas. O principal componente para realizar a transferência com sucesso do T-DNA são os genes localizados na região *vir*, a qual possui, aproximadamente, 35 genes que são responsáveis desde o reconhecimento do hospedeiro pelo patógeno até a inserção do segmento de T-DNA no núcleo da célula hospedeira (ANDRADE, 2001).

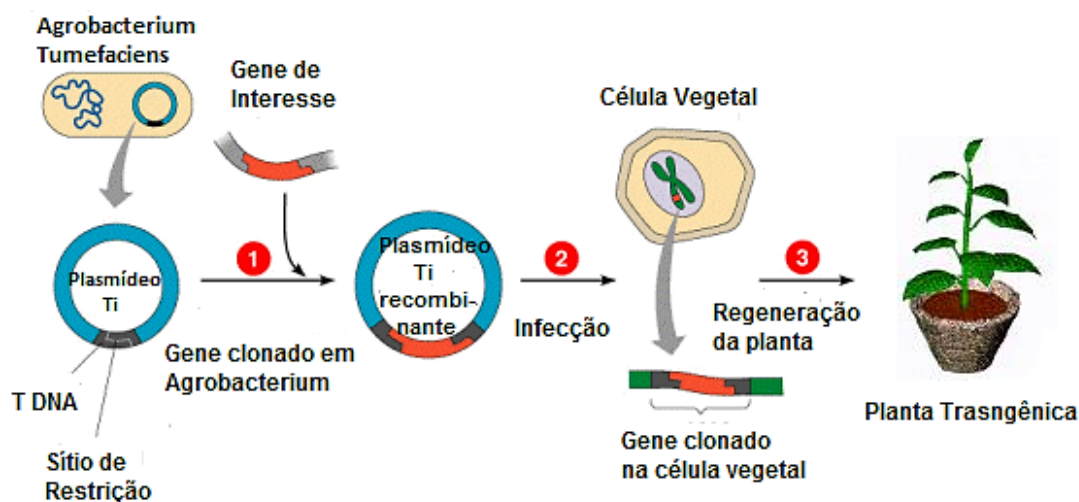


Figura 2- Transformação de plantas a partir do método *Agrobacterium tumefaciens*.

O plasmídeo Ti contém a região T, que é transferida para células de plantas infectadas, e genes de virulência (*vir*), que funcionam na transferência do T-DNA. Nos vetores plasmídicos de Ti, o DNA exógeno é inserido na região T. **(1)** O plasmídeo recombinante é introduzido em *Agrobacterium tumefaciens*, **(2)** que é então utilizado para infectar células cultivadas. A região T do plasmídeo (que transporta o DNA inserido) é transferida para as células da planta e integra-se no DNA cromossômico. **(3)** Uma planta transgênica pode então ser gerada a partir das células transformadas.

Fonte: COSTA, J. A (2016).

Uma complexa série de sinais químicos de comunicação está envolvida na interação entre a *Agrobacterium* e a planta, os quais incluem açúcares neutros, compostos fenólicos e opinas. Estes compostos fenólicos induzem os genes *vir* das bactérias. Um exemplo a ser citado de composto fenólico é a acetoseringona, a qual é percebida por proteínas receptoras, as VirA, e a autofosforilação dessas proteínas e a subsequente fosforilação das proteínas VirG resultam na ativação da transcrição dos genes *vir*. Muitas proteínas Vir estão diretamente envolvidas no processo de transferência do T-DNA da bactéria para a célula da planta (ANDRADE, 2001).

Ambas as técnicas de transformação produzem organismos geneticamente modificados (OGM) com diferentes graus de eficiência. Desse modo, a associação da biobalística com a técnica de *Agrobacterium*, denominada agrolística, pode favorecer a entrada do T-DNA na célula vegetal. Esta técnica consiste no bombardeamento dos explantes com partículas de tungstênio, sem a presença de DNA, a fim de causar macro e microferimentos no tecido vegetal. Os compostos

fenólicos liberados pela célula vegetal mobilizam a transferência do T-DNA para a célula hospedeira, durante o co-cultivo com *A. tumefaciens*, carreando o DNA exógeno para o interior da célula. Esse processo de transformação foi desenvolvido com o objetivo de se obter maiores frequências de transformação, uma vez que os microferimentos não prejudicam a célula vegetal e são suficientes para a indução da transferência do T-DNA. Além disso, vem solucionar a limitação dos protocolos de transformação de algodão que, na maioria das vezes, são dependentes do genótipo e de difícil reprodutibilidade. Por meio desses diferentes tipos de técnicas de transformação genética de plantas é possível a incorporação de genes provenientes da bactéria *B. thuringiensis* em plantas, tornando-as resistente ao ataque de insetos praga (BIDNEY, et al., 1992; BRASILEIRO, et al., 1996; HANSEN e CHILTON, 1996).

1.4 Utilização de promotores na transformação de plantas

Promotores gênicos são fragmentos de DNA que antecedem o gene, nesta região, a RNA Polimerase se liga para dar início a transcrição (BATUT, et al., 2013; BANG, et al., 2013), sendo assim, estes são de suma importância e essenciais para garantir a expressão de genes de interesse, que desempenham papel importante na biotecnologia (ZOU, et al., 2011).

Um exemplo de promotor gênico é o promotor do vírus mosaico da couve-flor (CaMV35S), isolado e descrito em 1985 (ODELL, NAGY e CHUA, 1985), é um dos mais utilizados em pesquisa e em processos de transgenia, devido a sua característica de ser constitutivo, ou seja, ser expresso na maior parte dos tecidos vegetais (ODELL, NAGY e CHUA, 1985). Apesar da grande utilização deste promotor, este pode resultar em uma baixa expressão dos transgenes, não havendo garantia de expressão no tecido de interesse. Deste modo, a utilização de promotores de genes constitutivos não é desejável em alguns casos, por ativarem a expressão gênica do transgene em todos os tecidos da planta (ZHENG; MURAI, 1997; GREEN et al., 2002; NEUTEBOOM et al., 2002). Promotores cuja expressão seja tecido-específica são utilizados quando o alvo são insetos de hábitos endofíticos, como *A. grandis*, sendo possível direcionar a expressão para os botões florais, local

de oviposição e desenvolvimento do inseto-praga (BRAGA SOBRINHO; LUKEFAHR, 1983).

O promotor constitutivo proveniente do gene de conjugação à ubiquitina (UceA 1.7) em algodão foi isolado e, posteriormente caracterizado pelo grupo do LIMPP/Cenargen (GROSSI-DE-SA et al., 2008). Plantas de *A. thaliana* foram transformadas com um vetor que possuía esse promotor no cassete de expressão, e então foi observada a expressão do gene em diversos tecidos, principalmente em raiz e botão floral, quando comparado ao promotor 35S (GROSSI-DE-SA et al., 2008; VIANA, 2011). Além dos citados acima, outro promotor, denominado GhPGFS1, foi isolado de *G. hirsutum* e, caracterizado por qRT-PCR como um promotor altamente expresso e específico de botão floral (ARTICO et al., 2010; ALVES et al., 2014)..

Diante disso, é importante a correta escolha do promotor para a obtenção de um organismo geneticamente modificado de acordo com a característica desejada.

1.5. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *B. thuringiensis* foi descoberta no início do século XX e passou a ser bastante estudada devido à sua propriedade entomopatogênica. Este microrganismo pode ser encontrado em vários substratos, como solo, água, insetos mortos, grãos armazenados e superfícies de plantas. Em 1915, Berliner observou a presença de inclusões nas células de *B. thuringiensis*, as quais são responsáveis pela atividade tóxica (FIGURA 3). Estas são produzidas durante o processo de esporulação e conhecidas por δ -endotoxinas ou toxinas Cyt e Cry (IMA, 2015).

São conhecidas estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a insetos das ordens Diptera, Coleoptera, Himenoptera, Homoptera e Ortoptera, cujos mecanismos de ação ocorrem através de interações moleculares no intestino médio dos insetos. O microrganismo pode ser utilizado na sua forma selvagem ou como fonte de genes para serem introduzidos em plantas pelo processo de transgenia. Além de sua toxicidade a insetos, a utilização das toxinas *Bt* apresenta vantagens quanto a inocuidade aos seres humanos, insetos não-alvo, vertebrados e plantas (IMA, 2015).

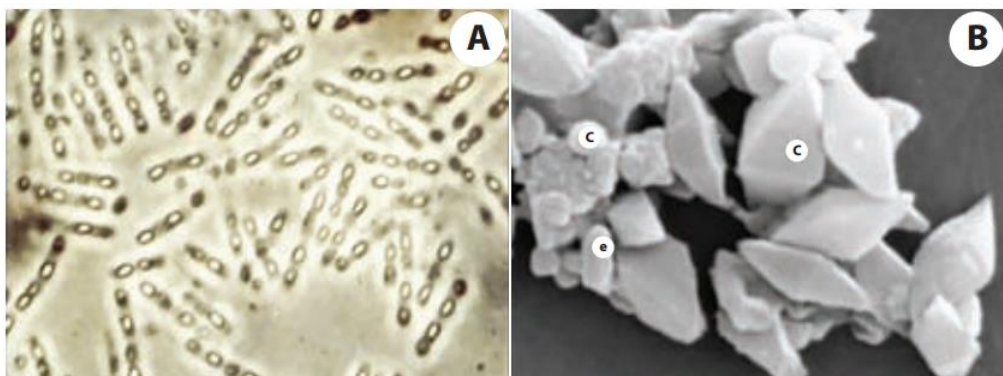


Figura 3- Morfologia de *B. thuringiensis*. (A) microscopia de contraste de fases de *B. thuringiensis* (1.000X). (B) microscopia eletrônica de varredura de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporo (15.000X).

Fonte: IMA, 2015.

O mecanismo de ação das proteínas Cry envolve os seguintes passos: ingestão da toxina, processamento dos cristais e/ou das toxinas, ligação das toxinas ao receptor, inserção da membrana, agregação, formação do poro, citólise e morte do inseto (FIGURA 4) (IMA,2015).

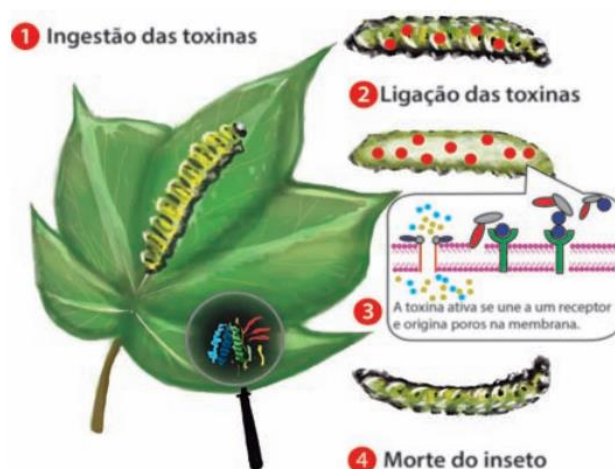


Figura 4- Modo de ação das toxinas de *B.thuringiensis*. O mecanismo de ação das proteínas Cry envolve diversas etapas, como: (1) ingestão da toxina, seu processamento, (2) ligação das toxinas ao receptor, (3) inserindo-se na membrana e dando origem aos poros, (4) ocasionando citólise e morte do inseto.

Fonte: IMA, 2015

Além das lavouras GM, que contém o gene *cry*, demandarem menor uso de pesticidas, que são poluentes ao meio ambiente, esta tecnologia tem como vantagem o fato de a proteína ser expressa em tecidos específicos da planta.

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, *A. grandis* (MARTINS et al., 2007).

Em 2016 surgiu o primeiro relato sobre produção de algodão *Bt* apresentando resistência ao ataque do bicudo em casa de vegetação. Esse estudo mostrou plantas de algodão geneticamente modificadas que expressam o gene *cry11a12* apresentando um controle de até 60% desses insetos, não o controle total dessa praga. Este fato reforça a necessidade da busca por novas moléculas com potencial inseticida para a geração de novos eventos de algodão GM. Neste sentido, cresce a busca por novas δ -endotoxinas ou proteínas Cry provenientes de *B. thuringiensis* com potencial para o controle de coleópteros (OLIVEIRA, et al., 2016).

O gene *cry10Aa* mostrou-se bastante promissor para o controle do *A. grandis* (AGUIAR et al., 2012). O gene *cry10Aa* codifica uma protoxina de 78 kDa que é clivada em uma toxina ativa de 60 kDa (THORNE et al., 1986). Um vetor de transformação genética contendo o gene *cry10Aa* protoxina, regulado pelo promotor de ubiquitinação do algodão - *ucea1.7*, foi introduzido em uma cultivar brasileira de algodão, utilizando a técnica de biobalística. Os resultados demonstraram que a taxa de mortalidade dos insetos em casa de vegetação foi de 100%, sendo essa taxa diretamente correlacionada com a expressão da protoxina Cry10Aa nos eventos de transformação (RIBEIRO, et al., 2017).

Como mostrado em estudos anteriores, o gene *cry10Aa* codifica para uma protoxina, podendo ser expresso também na forma da toxina ativa (gene sem a alfa hélice, localizada na região C-terminal do domínio III da proteína que lhe deu origem). O efeito da toxina na sua forma ativa ainda é pouco estudado, tornando-se assim uma outra alternativa para uso na geração de plantas de algodão GM com potencial de controle do bicudo do algodoeiro.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo a transformação genética de uma cultivar brasileira de algodão com o gene *cry10Aa Mod*, codificando para a toxina Cry10Aa na forma ativa. Eventos de transformação de algodão resistentes ao bicudo do algodoeiro gerados neste estudo representam um grande avanço para a cultura do algodão, podendo proporcionar uma melhoria e aumento substancial na produção e produtividade de algodão.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi a obtenção de eventos de transformação de algodão GM, como alternativa para o controle do bicudo do algodoeiro, por meio das técnicas de agrolística e biobalística.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Transformar uma variedade de algodão brasileira com gene *cry10* sintético mutante
- 2- Caracterizar molecularmente os eventos de transformação para identificação do transgene;
- 3- Avaliar os níveis de expressão da proteína nos botões florais;
- 4- Validar os eventos de transformação de algodão GM através de bioensaios com insetos adultos provenientes do campo, em casa de vegetação.
- 5- Determinar os níveis de controle das larvas em contato com botões florais das plantas GM.

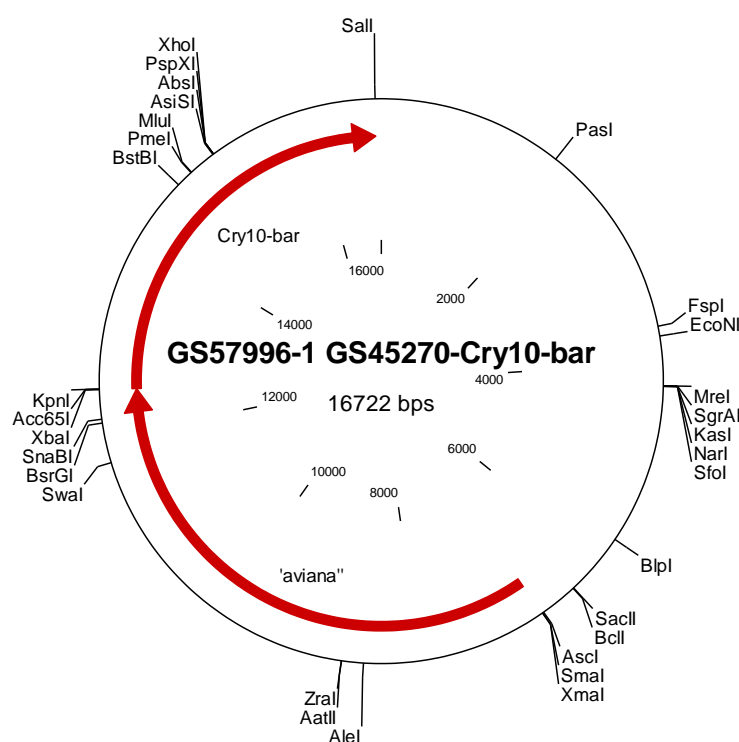
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Construção do vetor

O plasmídeo *GS57996-1 GS45270-Cry10-bar*, utilizado para transformar os embriões de algodão, foi sintetizado pela empresa EPOCH Life Science (FIGURA 5A). O vetor base utilizado foi o pCambia 0380, o qual possui a canamicina como agente seletivo em bactéria. O gene *ahas* foi adicionado ao vetor para seleção das plantas GM ao imazapyr.

O gene que codifica a toxina Cry10Aa modificada está sob controle do promotor de algodão *GhPGFS1* (ARTICO et al., 2010; ALVES et al., 2014). O gene para a toxina Cry10Aa, presente neste vetor, foi modificado para a expressão da forma ativa da proteína, sendo denominado *cry10Aa Mod*.

A)



B)

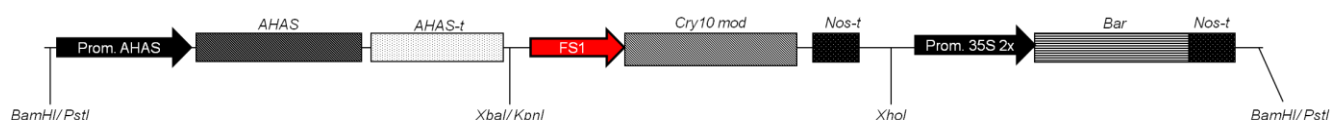


Figura 5- Esquema da construção contendo o gene *cry10Aa Mod*. Em (A) Vetor *GS57996-1 GS45270-Cry10-bar* (16.722 pb). Neste vetor foi inserido o gene *cry10mod* sob o controle do promotor *GhPGFS1* e agente seletivo para plantas Ahas. (B) Cassete de transformação (9.910 pb), obtido após digestão do plasmídeo com a enzima *BamHI*.

Após a construção do vetor, o mesmo foi utilizado para a transformação por choque térmico de células competentes de *E.coli*, para obtenção de biomassa do plasmídeo. Em seguida, o DNA foi preparado por Miniprep, seguindo o Protocolo da QIAprep Miniprep Handbook. Posteriormente, o plasmídeo foi inserido, por eletroporação, em células competentes de *A. tumefaciens* LBA4404 para posterior transformação dos embriões de algodão, pelo método de agrolística.

Para o método de bombardeamento de partículas, o cassete de transformação foi obtido pela digestão do plasmídeo GS57996-1 GS45270-Cry10-bar com a enzima de digestão *BamHI* (Biolabs®) (Figura 3B). Esta digestão libera dois fragmentos, um de 6.812 pb e outro de 9.910 pb, sendo este último o que contém as sequências utilizadas na transformação das plantas. As condições de digestão foram: 1U *BamHI*, 1 µg DNA, 1X NEBuffer 3(Biolabs®), 1X BSA, overnight a 37°C. O fragmento correspondente ao cassete de transformação foi purificado por eletroeluição, tendo 5 µg de DNA sido utilizados no bombardeamento de 50 embriões.

3.2. Esterilização e preparo das sementes

As sementes de algodão da variedade BRS 372 foram previamente lavadas em água corrente e, em seguida, adicionadas a um recipiente estéril com álcool 70% por 3 minutos. O álcool foi retirado e as sementes foram lavadas (5x) com água MILLI-Q autoclavada. Posteriormente, foi acrescentada uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) de cloro ativo e as sementes incubadas por 30 minutos. O hipoclorito de sódio foi descartado e as sementes lavadas cinco vezes com água estéril. Logo após, foram imersas em água estéril com o antibiótico ampicilina (100 mg/mL) e o antifúngico nistatina (200 mg/mL) durante 18 a 20 horas e mantidas no escuro. Após este período, a solução de água com os antibióticos e antifúngico foi retirada e as sementes permaneceram no escuro em temperatura ambiente por 48 horas.

3.3. Preparo dos hipocótilos

Os embriões zigóticos de algodoeiro mantidos no escuro durante 48 horas para germinação foram, posteriormente, removidos da semente de algodão e seu meristema apical ficou exposto, sem a presença das folhas cotiledonares, com a finalidade de facilitar o processo de transformação. Após a remoção dos hipocótilos, os embriões foram inseridos com a extremidade apical voltada para cima em uma placa contendo o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), composto de 4,3% (m/v) de sais basais, 3% (m/v) de sacarose e 0,25% (m/v) de fitagel. O preparo dos explantes foi o mesmo para os processos de transformação por agrolística e biobalística.

3.4 Transformação via agrolística

A cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* foi transformada com o vetor *GS57996-1 GS45270-Cry10-bar*.

O pré-cultivo bacteriano das cepas foi feito durante 16 horas com agitação constante de 180 rpm a 28°C em 5mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido contendo 100 µg/mL de canamicina, 50 µg/mL de spectromicina e 100 µg/mL de rifampicina, onde uma colônia isolada foi inoculada.

Após o período indicado acima, a suspensão bacteriana foi transferida para 125 mL de meio LB líquido com os mesmos antibióticos e mantidos em agitação constante a 28°C até atingir a fase logarítmica de crescimento ($OD_{600}=1$). Posteriormente, as células foram centrifugadas (1500g/10 min) e ressuspendidas em 10 mL do meio PIM (Pre induction medium) contendo 10 g/L de glicose, 14,62 g/L de MES, 20 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 5,6) e 50 mL/L de AB salts stock (20x) pH 5,6, ao qual foi adicionado acetoseringona na concentração final de 100µM. A densidade de células bacterianas foi ajustada para OD_{600} de 0,4-0,5 antes do processo de transformação.

Inicialmente, foi realizado o bombardeamento de partículas de tungstênio com o objetivo de lesionar a região meristemática caulinar que ficou totalmente exposta com a remoção das folhas cotiledonares dos embriões germinados, a uma pressão de gás hélio de 700 psi. As partículas de tungstênio foram preparadas do seguinte modo: 50 µL de $CaCl_2$ 2,5 M, seguido de 20 µL de

espermidina 0,2 M, que foram adicionados a 50 μ L de partículas de tungstênio em suspensão em água destilada. A solução foi levada ao vortéx por 10 minutos, em seguida adicionou-se 150 μ L de etanol 96% e centrifugou-se a 13.000 rpm por 20 segundos. Após a lavagem com etanol, as partículas foram ressuspendidas em 24 μ L de etanol 96% e, então, levadas ao ultrassom por 3 a 4 segundos. Ao final, 3,2 μ L da solução foram distribuídos no centro de cada membrana carreadora, as quais foram previamente incubadas na câmara de sílica por 10 a 15 minutos, com a finalidade de reduzir a umidade das membranas.

Após o bombardeamento, os hipocótilos foram transferidos para a suspensão de *A. tumefaciens* por 30 minutos a 28°C, sendo após, lavados com água MILLI-Q autoclavada, secos em papel de filtro autoclavado e transferidos para meio MS; suplementado com 3% (m/v) de sacarose e 0,25% (m/v) de fitagel e 250 mg/L de cefotaxima, sem agentes seletivos, e mantidos no escuro por 2 dias.

Após o período citado acima, os explantes foram transferidos para meio MS contendo 3% (m/v) de sacarose, 0,25% (m/v) de fitagel, 300 nM de imazapyr, 0,1% (m/v) de carvão ativado, 0,3 mg/L de BAP e 250 mg/L de cefotaxima e mantidos durante 30 dias neste meio. Como este já possui o agente seletivo, foi realizada a observação das plântulas que se desenvolveram mais rapidamente nas primeiras 3 semanas (FIGURA 6). Em seguida, as plântulas selecionadas pela ação do herbicida foram aclimatizadas na casa de vegetação em recipientes contendo vermiculita e, após 15 dias, transferidas para o solo (FIGURA 7).

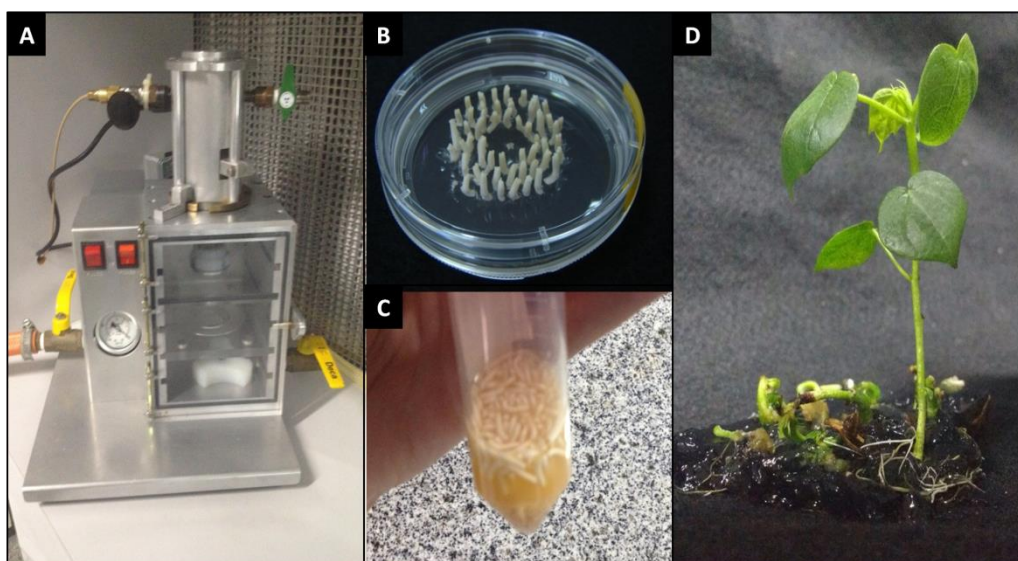


Figura 6- Transformação genética de embriões via agrolística e subsequente seleção de plantas tolerantes ao herbicida imazapyr. Em (A) equipamento de biobalística; (B) embriões bombardeados; (C) infecção com *A. tumefaciens*. Os embriões permaneceram em contato com a bactéria durante 30 minutos; (D) plântula tolerante ao imazapyr.

3.5 Transformação via biobalística

Para a transformação via biobalística, os embriões foram preparados nas mesmas condições citadas acima. No bombardeamento foi utilizado o acelerador de partículas (FIGURA 6a), onde a pressão do gás hélio foi ajustada para 1200 psi. As partículas de tungstênio foram preparadas seguindo o mesmo procedimento utilizado na transformação via agrolística, porém com o acréscimo de 5 μ L de uma solução contendo o cassete de transformação (1 μ g/ μ L), previamente purificado.

Após o bombardeamento, os embriões foram transferidos para meio MS, suplementado com 3% (m/v) de sacarose e 0,25% (m/v) de fitigel, sem agentes seletivos, permanecendo por 48 horas no escuro. Em seguida, foram transferidos para recipientes contendo meio seletivo com sais MS, suplementado com 3% (m/v) de sacarose, 0,25% (m/v) de fitigel, 300 nM de imazapyr, 0,1% (m/v) de carvão ativado e 0,3 mg/L de BAP, onde permaneceram por 30 dias. Posteriormente, as plântulas que se desenvolveram na presença do herbicida imazapyr foram transplantadas para copos contendo vermiculita, cobertos com

sacos plásticos transparentes, e aclimatadas em casa de vegetação (temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$). Após duas semanas, as plantas foram transferidas para o solo (FIGURA 7).

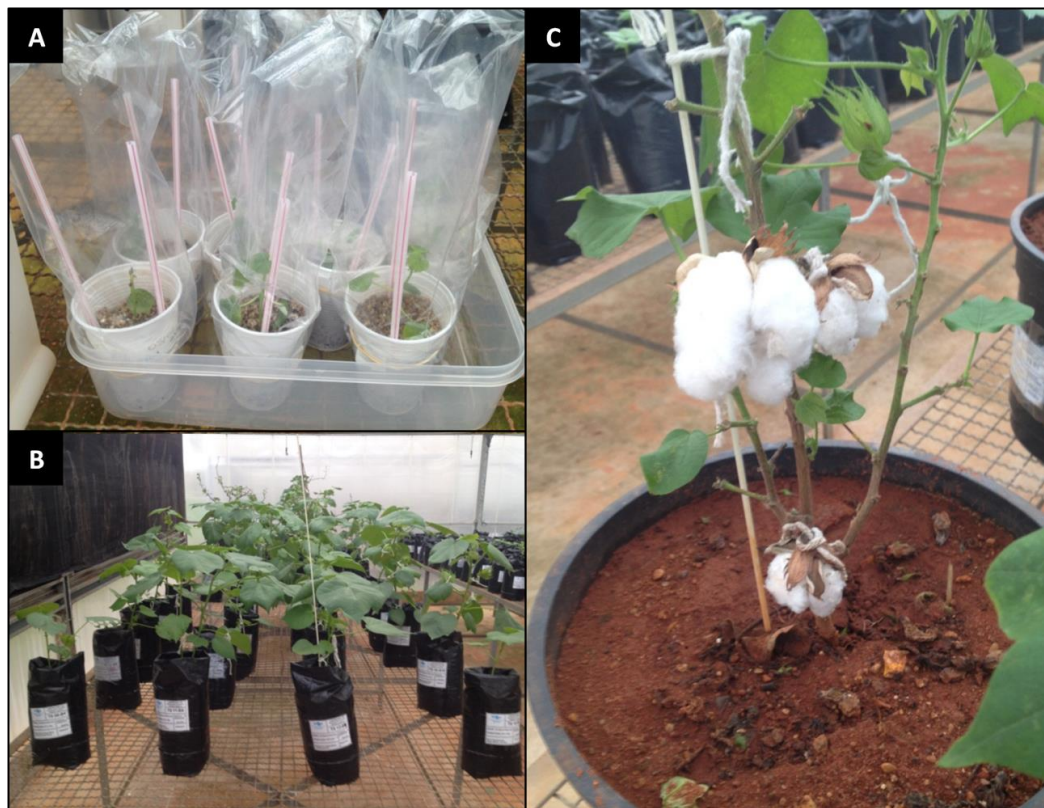


Figura 7- Plantas na casa de vegetação. Em (A) plantas aclimatizadas na vermiculita; **(B)** plantas transferidas para o solo; **(C)** planta adulta com capulho aberto.

3.6 Caracterização molecular dos transformantes primários (T0)

3.6.1 Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA total foi feita utilizando 4 discos de tecido foliar de cada planta avaliada. A extração foi realizada de acordo com método descrito por Michiels e colaboradores (2003), com modificações. Cada amostra foi macerada em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionou-se o tampão de extração, constituído de 100mM de Tris HCl, pH 8,0; 5 mM de EDTA, pH 8,0; 0,35 mM de glicose; 1 % de β -mecaptoetanol e 2 % de PVP-40. Após a extração, o pellet foi ressuspensionado em água MILLI-Q com Ribonuclease A (RNase A 10 mg mL^{-1}) e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1

hora para ação da enzima. A concentração de DNA foi quantificada por espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare, USA) e as amostras estocadas a -20 °C.

Para avaliar a qualidade de DNA, alíquotas da extração acrescida de tampão de amostra de DNA foram submetidas a eletroforese unidimensional em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE (0,5 X). O gel foi corado com brometo de etídeo e o marcador “High DNA Mass Ladder” (cat. n° 10496016: Invitrogen®) foi utilizado para analisar a massa molecular de DNA.

3.6.2 Seleção dos transformantes primários por PCR

Reações de PCR para amplificar o DNA extraído das folhas de algodão foram realizadas para confirmar a inserção do gene *cry10Aa Mod*, utilizando os oligonucleotídeos da Tabela 1. As condições de cada reação seguiram as instruções do fabricante do “Multiplex PCR Kit” (cat. n° 206143: Qiagen®) e estão dispostas na Tabela 2. O volume final de cada reação foi de 10 µL e a concentração dos iniciadores foi de 10 µM. O termociclador utilizado foi o T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) e as reações foram feitas em tubos de 0,2 mL. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo.

Tabela 1- Sumário dos oligonucleotídeos utilizados na PCR para amplificação do gene *cry10Aa Mod*.

Nome	Sequência
Cry10-ativaF	5'- GGCCAGCAGATATTCGTAGAG- 3'
Cry10-ativaR	5'- ATCGTTAGGGAGACCGATCA- 3'

Os oligonucleotídeos utilizados (TABELA 1) apresentam uma T_m de 57°C e geraram um fragmento de 406 pb.

Tabela 2- Condições do ciclo utilizados na reação de PCR para a amplificação do gene *cry10Aa Mod.*

Etapa	Temperatura	Tempo
1 Desnaturação	94° C	15 minutos
2 Desnaturação	94° C	30 segundos
3 Anelamento	57° C	30 segundos
4 Extensão	72° C	90 segundos
Repetir 35 vezes os passos de 2 a 4		
6 Extensão	72° C	7 minutos

3.6.3 Análise do número de cópias: qPCR-2^{- $\Delta\Delta C_t$}

O número de cópias inserido no genoma das plantas GM de algodão foi determinado de acordo com Yang et al. (2012) usando o método qPCR-2^{- $\Delta\Delta C_t$} . O DNA genômico da planta não transformada e das plantas GM foi extraído de folhas jovens e saudáveis, cuja concentração foi determinada por espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare, USA) e sua integridade foi checada por eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado o plasmídeo denominado *pBSK-ahas-ubc1* como referência contendo o fragmento do gene de ubiquitina C (*ubc1*) de *G. hirsutum*, com uma única cópia do gene, e o gene de seleção *ahas*, o qual também está presente no cassete de expressão para a transformação de algodão.

A quantificação relativa do *ahas* contra o gene de referência endógeno *ubc1* foi usada para calcular o número de cópias do transgene presente no genoma de plantas de algodão GM usando os primers AHASF, AHASR, GhUBC1F e GhUBC1R (TABELA 3). Inicialmente, a quantidade absoluta dos dois genes, *ubc1* e *ahas*, foi determinada por qPCR em referência a curvas padrão. Duas curvas padrão foram obtidas a partir do plasmídeo de referência,

pBSKahas-ubc1. O número de cópia absoluta do plasmídeo *pBSKahas-ubc1* foi calculado usando valores de Ct com base em curvas padrão. O número de cópia relativa do gene alvo *ahas* foi obtido dividindo a concentração absoluta do gene *ahas* pelo do gene endógeno *ubc1* na mesma amostra.

Tabela 3- Sumário dos oligonucleotídeos utilizados na qPCR para verificação do número de cópias.

Nome	Sequência
GhUBC1F	5'- TGGCATTATATTGTCATTGTTACTATCC - 3'
GhUBC1R	5'- ACCATGTTATCTTATTCTAAGACAAGCTC - 3'
AHASF	5'- GTCACTGGGTTAATATCTCTCGAATCTTGCA - 3'
AHASR	5'- CCTACTTCCAATGTCTGATTAGTGCTTCTGG - 3'

3.6.4 Quantificação da expressão da proteína Cry10Aa Mod por ELISA

Botões florais de planta não transformada (NT) e das plantas transformadas foram coletados, colocados em nitrogênio líquido e posteriormente, macerados. A extração de proteínas totais de 12 plantas transformadas e uma planta NT foi feita segundo o método utilizado por De Mot (1989) com modificações. Um botão floral de 6 mm de cada planta foi macerado separadamente, com nitrogênio líquido e, em seguida, adicionou-se o tampão de extração (0,7M de sacarose, 0,5M de Tris, 50mM de EDTA, 0,1M de KCL, 1mM de DTT, 0,1% de Triton X-100 e 5% de PVPP, pH8,0). As amostras foram homogeneizadas e permaneceram sob agitação a 4°C por 60 minutos. Os extratos foram centrifugados a 9000 rpm a 4°C, por uma hora. O sobrenadante dos botões foram coletados e quantificados com o uso do “Bradford Protein Assay”.

Para a quantificação da expressão da proteína Cry10Aa modificada em plantas transgênicas de algodoeiro foi realizado um Ensaio Indireto de Imunoabsorbância Ligado à Enzima (ELISA Indireto) com uma planta não transformada e as plantas transformadas, utilizando 200 ng de proteínas totais. O volume final foi ajustado para 100 µL com PBS (100 mM NA₂HPO₄, 17 mM

KH₂PO₄, 5 M NaCl, 27 mM KCl, pH 7.4) adicionado de 0,05% Tween-20. Após sensibilização a 4 °C overnight, o conteúdo da placa foi descartado e lavado três vezes com PBS 1X e 0,05 % de Tween-20. A placa foi, então, bloqueada com PBS 1X e 0,05 % de Tween-20 e 5 % de BSA durante 4 horas a 37°C. Em seguida, o conteúdo da placa foi descartado e a placa foi lavada três vezes com PBS e 0,05 % de Tween-20. Foi feita a incubação com o anticorpo primário “pabCry10Aa” produzido em coelho pela GenScript© (New Jersey) (1:1000 em 3,0% BSA-PBS e 0,05 % de Tween-20) por 2 horas a 37 °C. Posteriormente, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa lavada três vezes com PBS e 0,05 % Tween-20. A placa foi, então, incubada com o segundo anticorpo “Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate” da BioRad (1:3000 em 3,0% BSA-PBS e 0,05 % de Tween-20) durante 1 hora a 37°C. A seguir, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa lavada três vezes com PBS e 0,05 % de Tween-20.

A revelação foi feita com TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina, Sigma), como substrato, dissolvido em 10 mL de tampão de revelação (0,1 M de Ácido Cítrico, 0,2 M de Fosfato de Sódio Dibásico, pH5,0) e 10 µL de peróxido de hidrogênio 30 %. A reação foi finalizada utilizando 3M de Ácido Sulfúrico seguida pela leitura no comprimento de onda de 450 nm, realizada em espectrofotômetro (“Benchmark Plus” –BioRad).

3.7 Caracterização fenotípica dos transformantes primários (T0)

3.7.1 Desafio de plantas de algodão da geração T0 ao bioensaio com *A. grandis*

As plantas de algodão GM e a planta não transformada foram submetidas a bioensaios com botões florais. Dois diferentes tipos de bioensaios foram realizados: a) no primeiro utilizou-se fêmeas fecundadas oriundas do campo que realizaram a oviposição nos botões florais; b) no segundo foram inoculados ovos oriundos de insetos criados em laboratório.

Para o bioensaio com as larvas, botões florais com aproximadamente 6 mm de diâmetro, tanto das plantas de algodão GM como das plantas NT foram

perfuradas com uma broca logo acima do receptáculo floral. Posteriormente, um ovo contendo um embrião viável e ativo foi introduzido no orifício perfurado e a região foi selada com vaselina para prevenir a desidratação do ovo, antes da eclosão da larva. Após 20 dias, avaliou-se a taxa de mortalidade das larvas e a taxa de abortamento dos botões.

No bioensaio com as fêmeas fecundadas, os insetos foram mantidos em contato com o botão floral por 48 horas para permitir a oviposição e depois retirados. Após este período, o botão floral foi mantido isolado por 20 dias, para então realizar-se a avaliação da taxa de mortalidade das larvas. A taxa de mortalidade do inseto foi estimada utilizando a fórmula de Schneider-Orelli (Schneider-Orelli, 1947): $CM(\%) = (T-C)/(100-C) \times 100$; onde T (%) é a taxa de mortalidade nas plantas GM e C (%) é a taxa de mortalidade em plantas de algodão NT (controle negativo de bioensaio).

3.8 Avanço da progênie

Botões florais antes da antese tiveram suas pétalas seladas com esmalte de unha comercial, com a finalidade de impedir a fertilização cruzada entre as plantas. Este procedimento permite que as pétalas se unam sem qualquer dano à formação dos frutos ou abertura dos capulhos.

3.8.1 Obtenção da geração T1

Com o procedimento de selagem dos botões florais, foi possível coletar sementes das plantas T0 que, futuramente, serão submetidas à análise de PCR para confirmar a presença do gene *cry10Aa Mod* e dar continuidade a caracterização dos indivíduos T1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Transformação de *A. tumefaciens* LBA4404

As colônias que se desenvolveram no antibiótico de seleção (canamicina), após a eletroporação, foram submetidas a PCR de colônia para verificação da inserção do vetor de interesse, utilizando o primer *cry10ativa* (FIGURA 8). Foi possível obter um fragmento de 406 pb, indicando assim, que o vetor foi inserido nas 12 colônias analisadas, as quais foram utilizadas para a transformação genética de *G. hirsutum*.

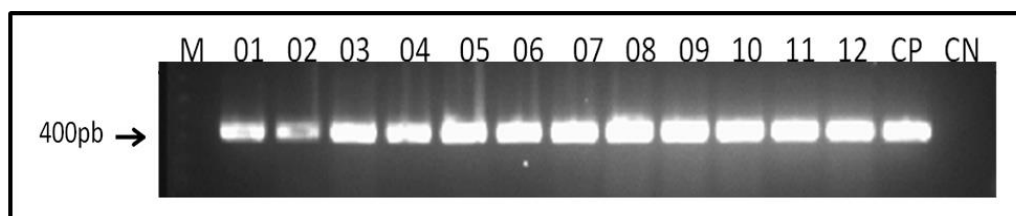


Figura 8- PCR de colônia utilizando primer para o gene *cry10Aa Mod*. A amplificação mostrou um fragmento de 406 pb. **M**, marcador molecular de 1 Kb; **CP**, controle positivo (plasmídeo GS57996-1 GS45270-Cry10-bar.); **CN**, controle negativo; os números de 01 a 12 correspondem as colônias analisadas.

4.2. Transformação Genética de Embriões de Algodão

Dos 3.805 embriões da variedade BRS 372 transformados pela técnica de agrolística, 58 transformantes putativos foram selecionados pela ação do herbicida imazapyr e aclimatizados em casa de vegetação. Quanto à técnica de biobalística, foram bombardeados 1.369 embriões, deste total, 81 plântulas apresentaram bom desenvolvimento de raízes e folhas, além de resistência ao herbicida e foram aclimatizadas para posterior caracterização molecular. Em cada experimento de transformação foi possível observar a ação do herbicida imazapyr nas plantas que não receberam o cassete de transformação, devido à inibição da enzima Aceto Lactato Sintase (ALS). Esta enzima interrompe a síntese protéica, interferindo no crescimento celular e causando amarelecimento dos meristemas, além de causar

redução do sistema radicular, prejudicando a absorção de nutrientes (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). As 139 plantas que mostraram resistência ao herbicida imazapyr, conferido pelo gene *ahas*, passaram para as etapas seguintes de caracterização.

4.3 Integração estável do gene *cry10Aa Mod* em plantas T0

Após a aclimação dos 139 eventos de transformação putativos em casa de vegetação, estes foram analisados por PCR, onde foi possível observar a inserção do cassete de transformação no genoma de 12 plantas, por meio da amplificação do fragmento de 406 pb, correspondente ao gene *cry10Aa Mod* (FIGURA 9). Como esperado, não foi detectado amplificação do fragmento na planta não transformada (NT). Das 12 plantas PCR positivas, 5 são oriundas da técnica de agrolística e 7 da técnica de biobalística, sendo assim, podemos observar uma taxa de eficiência de transformação de 0,13% no primeiro método e 0,5% no segundo.

Oliveira (2015) realizou o estudo de transformação genética de algodão com a variedade Coker 310, pelo método de agrolística e relatou uma taxa de transformação de 0,62%. Diante disso, a taxa de eficiência no presente estudo pode ser explicada pela diferente variedade das sementes utilizadas, pois o cocultivo com *A. tumefaciens* requer regeneração via embriogênese somática, restrita a poucas cultivares como, por exemplo, a linhagem Coker (VIDAL e CARVALHO, 2002). Além disso, o protocolo utilizado necessita ser otimizado para tornar-se mais eficiente por se tratar de um método novo de introdução de genes exógenos.

O método biobalístico mostrou-se eficiente para a transformação da variedade de algodão BRS372, com uma alta taxa de transformação em comparação com outras técnicas, como a transformação via tubo polínico, que foi de aproximadamente 0,01% (OLIVEIRA et al., 2016). Adicionalmente, a taxa de transformação encontrada no presente estudo está de acordo com a literatura, onde foi descrito que a frequência média de transformação (número total de plantas transgênicas dividido pelo número total de embriões bombardeados) é de 0,5 %, podendo ocorrer variações, dependendo da cultivar (ARAGÃO, et al., 2005).

Ribeiro et al. (2017) utilizando a mesma cultivar (BRS 372) obteve igualmente uma taxa de transformação de 0,5%.

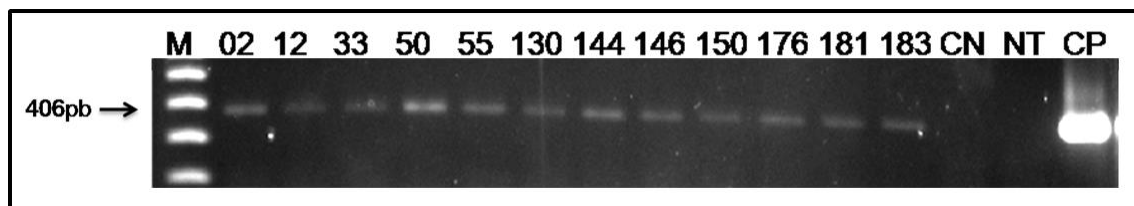


FIGURA 9- Análise de PCR de DNA genômico da geração T0 para detectar o gene *cry10Aa Mod*. A amplificação mostrou o fragmento de 406 pb. **M**, marcador molecular de 1 Kb; **CP**, controle positivo (plasmídeo GS57996-1 GS45270-Cry10-bar); **NT**, planta não transformada; os números correspondem às plantas T0 que foram submetidas à PCR.

4.4 Análise do número de cópias: qPCR- $2^{-\Delta\Delta Ct}$

O número de cópias do cassete de expressão do transgene *cry10Aa Mod* no genoma das plantas de algodão GM foi determinado por qPCR, baseado no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Deste modo, o DNA genômico das plantas foi utilizado como molde para amplificação por qPCR do gene *ahas* e do gene da ubiquitina (*ubc1*). O número de cópias do cassete de expressão foi calculado para as 12 plantas GM T0, demonstrando haver uma cópia em todos os eventos de transformação, independente do método de transformação utilizado, demonstrando, a integração bem sucedida do cassete de expressão no genoma das plantas (TABELA 4). Barros e Guimarães (2011) utilizaram a técnica de qPCR para quantificar o número de inserções de transgene em milho e observaram que os clones gerados pela técnica de biobalística apresentaram acima de quadro inserções do transgene, enquanto os eventos obtidos por transformação mediada por *A.tumefaciens* apresentaram apenas uma cópia.

O presente estudo apresenta a vantagem dos putativos eventos possuírem inserção única do transgene, demonstrando um resultado desejável, pois são geneticamente estáveis e são os alvos primários para a seleção de eventos-elites (GADALETA et al., 2011).

Este método apresenta alta reprodutibilidade e sensibilidade, tornando-o confiável para determinação do número de cópias do transgene, levando em consideração que a técnica de *Southern Blot* não é confiável para determinar o número da cópia do gene em rearranjo ou na integração de repetições em tandem (YANG et al., 2012).

Tabela 4- Número de cópias do gene *cry10Aa Mod* em plantas T0 de algodão GM, pelo método $qPCR-2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Plant ID	$qPCR-2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>ahas</i> gene	Número de cópias estimado
02	0,865142148	1
12	1,256319999	1
33	1,030989186	1
50	0,982109278	1
55	0,889341455	1
130	0,924950186	1
144	0,955772494	1
146	0,989562179	1
150	1,004045406	1
176	1,271366539	1
181	1,322912115	1
183	0,881985857	1
NT	-17,0866338	0

4.5 Quantificação da expressão da proteína Cry10Aa Mod por ELISA

A detecção do nível de expressão da proteína Cry10Aa Mod foi realizada utilizando extrato de proteínas totais de botões florais, pelo uso da técnica de ELISA, o qual indicou diferentes níveis de toxina nas 12 plantas analisadas (FIGURA 10). O ELISA revelou que as plantas GM expressam altos níveis de toxina, variando de 18,26 a 27,29 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco. Isto se deve ao promotor *GhPGFS1* utilizado na construção do cassete de expressão, o qual apresenta altos níveis de expressão em botão floral, local onde o inseto causa danos.

A expressão da protoxina Cry10Aa em plantas de algodão GM, que deu origem à toxina ativa, variou entre 3,1 e 13,9 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco de botão floral (RIBEIRO et al.,2017). Os níveis de expressão de Cry10Aa ativa aqui encontrados foram mais altos, que pode ser explicado pelo uso do promotor *GhPGFS1*, já que, no estudo anterior, a expressão do gene foi controlada pelo promotor *uceA1.7*.

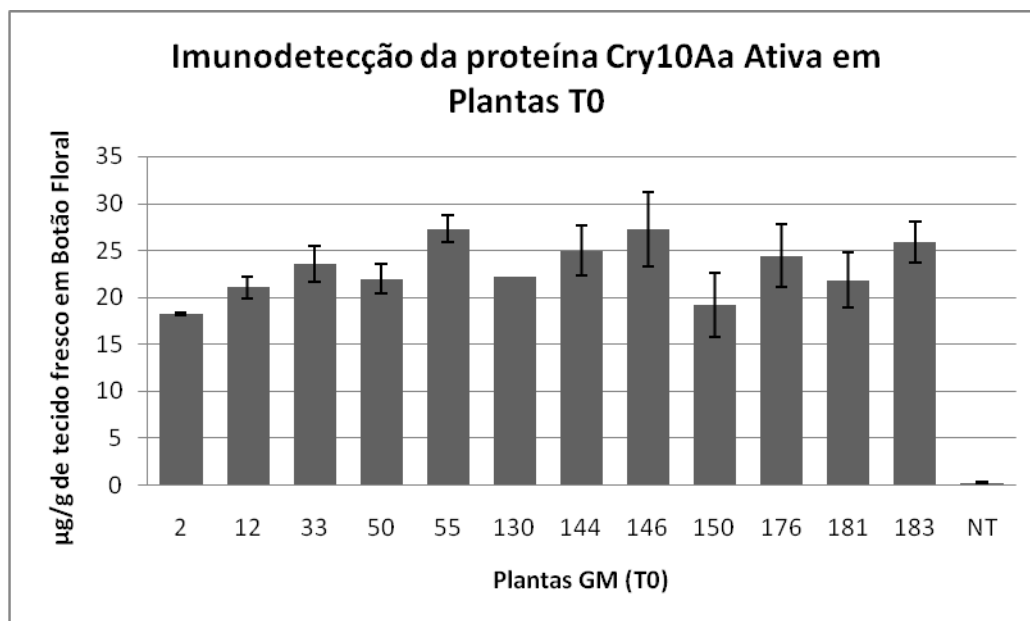


Figura 10- Imunodeteccção de proteínas Cry10Aa Mod em botão floral nos diferentes eventos de transformação de algodão GM. O anticorpo primário utilizado foi o policlonal anti Cry10Aa. A quantidade total de proteína utilizada no ELISA indireto foi de 200ng por poço. **NT:** planta não transformada (controle negativo). Os números indicam os eventos de transformação de algodão GM T0.

4.6 Desafio de plantas de algodão da geração T0 ao bioensaio com *A. grandis*

Os bioensaios foram realizados para avaliar a atividade da toxina Cry10Aa Mod contra *A. grandis*. A taxa de mortalidade das larvas, quando o ovo foi inoculado no botão floral, foi avaliada ao longo de 20 dias e foi observada uma variação de 43% a 100% em 5 plantas GM, em relação as plantas não transformadas (FIGURA 11a). Quando as fêmeas fecundadas de campo foram submetidas ao bioensaio, a taxa de mortalidade das larvas variou de 28% a 100% (FIGURA 11b). Estes dados evidenciam que a proteína Cry10Aa Mod é tóxica para *Anthonomus grandis*. A planta GM de número 55 apresentou maior taxa de mortalidade (100%) nos dois bioensaios correlacionando com o maior nível de expressão em botão floral, que foi aproximadamente 27µg/g de tecido fresco.

Os bioensaios apresentados no presente estudo foram realizados como testes piloto para validar a atividade da proteína expressa nas plantas transgênicas

contra o *A. grandis*. Outras repetições serão realizadas para confirmar a taxa de mortalidade apresentada e garantir reprodutibilidade dos dados.

Ribeiro et al. (2017) observou uma variação na taxa de mortalidade de larvas *A. grandis* de 60% a 100% nas plantas analisadas que expressaram a protoxina Cry10Aa. Um bioensaio comparativo entre as duas proteínas, protoxina e toxina ativa, foi realizado para observar as diferenças causadas no desenvolvimento do inseto e o número de botões florais abortados (FIGURA 12). Foi possível observar que a toxina ativa, Cry10Aa Mod, causou a mortalidade do inseto-praga antes deste se tornar adulto, houve uma menor evidência da praga no estágio pupal, maior incidência no estágio larval e menor taxa de botões abortados, se comparado a protoxina.

Os cristais produzidos por Bt, ao serem ingeridos pelas larvas, são solubilizados no intestino médio e para serem ativadas, as protoxinas precisam ser processadas pelas proteases intestinais da larva, perdendo a extremidade C-terminal, restando a porção N-terminal como parte ativa, a qual configura o fragmento tóxico (MONNERAT & BRAVO, 2000). Como a toxina ativa não possui a região C-terminal presente na protoxina que lhe deu origem, não é necessário a clivagem da molécula, desencadeando um efeito entomotóxico mais rápido e, conseqüentemente, causando a mortalidade do inseto em um estágio de desenvolvimento mais precoce (estágio larval), se comparado a protoxina Cry10Aa.

Os resultados encontrados evidenciam um promissor avanço no controle do bicudo-do-algodoeiro, principalmente pelo fato da mortalidade ser atingida no início do desenvolvimento do inseto, gerando menor taxa de abortamento de botões florais e, conseqüentemente, menores perdas causadas pela praga.

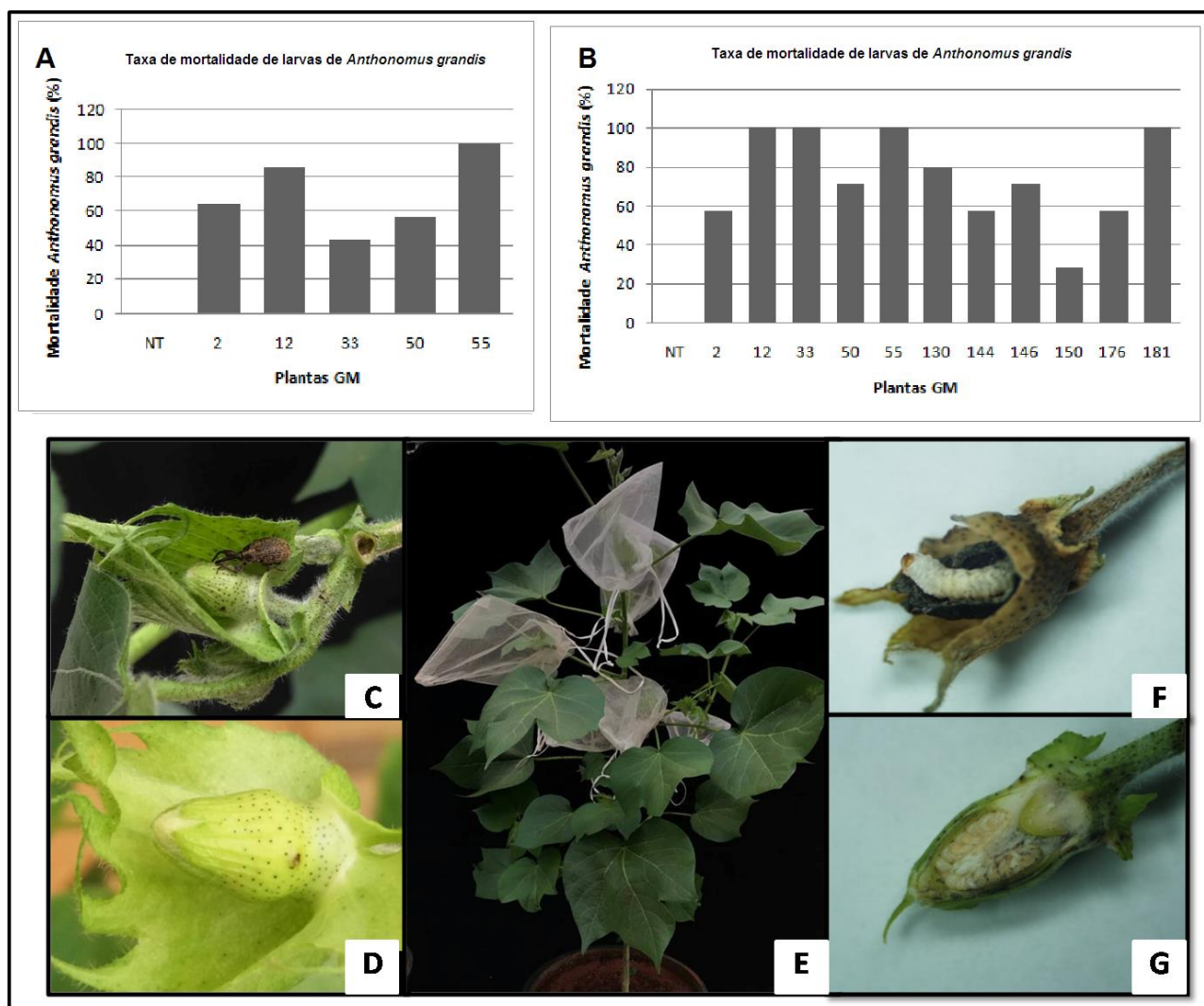


Figura 11- Taxa de mortalidade de larvas de *A. grandis* em botão floral de algodão expressando a toxina Cry10Aa Mod: (a) O gráfico mostra a taxa de mortalidade de *A. grandis* corrigida (CM) quando o ovo do inseto foi inoculado no botão; (b) taxa de mortalidade do bicudo do algodoeiro quando as fêmeas fecundadas eram mantidas em contato com o botão floral para oviposição; (c) fêmeas de campo fecundadas em contato com o botão floral para realizar oviposição; (d) oviposição realizada no botão floral pela fêmea; (e) planta submetida ao bioensaio; (f) NT (wild type - planta não transformada), (g) evento T0.

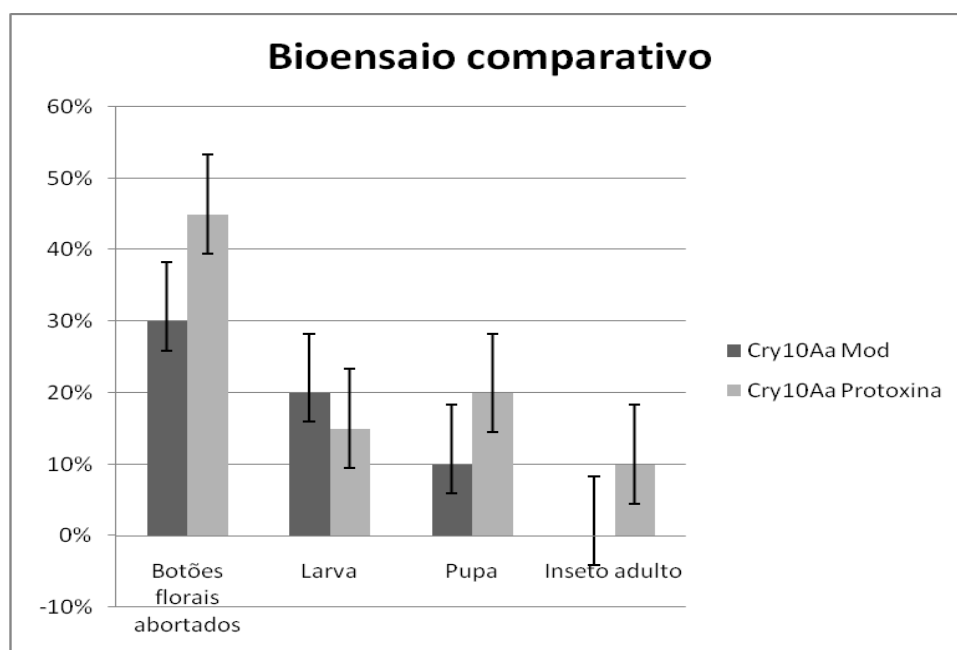


Figura 12- Bioensaio comparativo entre protoxina e toxina ativa. O gráfico mostra a porcentagem de *A. grandis* nos diferentes estágios de desenvolvimento e porcentagem de botões florais abortados quando os ovos foram inoculados nas plantas que expressam a toxina Cry10Aa e a toxina Cry10Aa Mod.

5. PERSPECTIVAS

A continuidade desse estudo inclui: (1) finalização da caracterização molecular dos eventos de transformação T0, T1 e T2 (níveis de mRNAs, níveis da toxina nas folhas e botão floral, inserção no genoma da planta), (2) desafio dos eventos de transformação com insetos oriundos de dieta artificial e campo, em nível de casa de vegetação (avaliação da mortalidade do inseto praga).

6. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados demonstram que ambas as metodologias, transformação por agrolística e transformação por biobalística, foram eficientes para a variedade de algodão utilizada, como comprovado pela presença do transgene *cry10Aa Mod* e pelo alto nível de expressão da proteína nos eventos de transformação GM. Os níveis de mortalidade dos insetos obtidos nos bioensaios, sob condição de casa de vegetação, são indicativos de que esses eventos poderão ser eficientes no controle do bicudo do algodoeiro no campo, o que contribuirá para o avanço no controle desse devastador inseto praga.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. W. D. S.; MARTINS, E. S.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. Cry10Aa Protein is Highly Toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an Important Insect Pest in Brazilian Cotton Crop Fields. **Bt Research**. v. 3, n. 4. P. 20-28. 2012.

ALVES, F.M.; ARTICO, S.; LAMBRET, F.S.J.; MUNIZ, N.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Compositions and method for modifying gene expression using a promoter of gene specific to plant flowers**. (WO 2014000074A3:2014).

ANDRADE, A. **Avaliação de Parâmetros que Influenciam a Transformação Genética do *Eucalyptus grandis* via *Agrobacterium***. Piracicaba. 2001.

ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; CARVALHEIRA, S.B.R.C.; RECH, E.L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. **Plant Sci**. 168, 1227–1233. 2005

ARTICO, S. et al. Isolamento e caracterização de promotores Tecido-Específico de Flor de *Gossypium hirsutum* para o controle do bicudo do algodoeiro. Congresso Brasileiro de Genética, 56^o. **Anais**. p. 266, 2010.

AZAMBUJA, R. & DEGRANDE, P. E. Trinta anos de bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo. 2013.

BANG, SEUNG WOON; PARK, S. H.; JEONG, J. S.; KIM, Y. S.; JUNG, H.; HÁ, S. H.; KIM, J. K. Characterization of the stress-inducible OsNCED3 promoter in different transgenic rice organs and over three homozygous generations. **Planta**, v. 237, p. 211-224, Janeiro 2013.

BARROS, B. A.; GUIMARÃES, C. T. Estimativa do Número de Inserções de Transgenes em Milho por PCR Quantitativo (qPCR). **Circular Técnica**. Sete lagos, MG, 2011.

BATUT, P.; DOBIN, A.; PLESSY, C.; CARNINCI, P.; GINGERAS, T. R. High-fidelity promoter profiling reveals widespread alternative promoter usage and transposon-driven developmental gene expression. **Genome Research**, p. 169-180, 2013.

BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Plantas Transgênicas. In: BESPALHOK F., J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. 1999. Cap. 5.2.

BIDNEY, D.; SCELONGE, C.; MARTICH, J.; BURRUS, M.; SIMS, L.; HUFFMAN, G. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 301-313, 1992.

BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHAR, M. J. **Bicudo (*Anthonomus grandis*, Boheman): Nova ameaça a cotonicultura brasileira: Biologia e Controle**. Cmapina grande: Embrapa/CNPA 32p (Documentos, 22), 1983.

BRASILEIRO, A. C. M.; ARAGÃO, F. J. L.; ROSSI, S.; DUSI, D. M. A.; BARROS, L. M. G.; RECH, E. L. Susceptibility of common and tepary beans to *Agrobacterium* spp. strains and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation using microprojectile bombardment. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, p. 810-815, 1996.

BUENO, O. D. C.; ROMERO, M. G. C. Participation of the fossil energy in cotton agroecosystem in family agricultural exploration. **Encontro de Energia no Meio Rural**, Campinas, 2006.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**, v. 3, Safra 2015/2016, n. 2, Novembro 2015.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**, v. 3, Safra 2017/2018, n. 1, Janeiro 2018.

COSTA, J. A. Avaliação funcional do promotor *pGmRD26* de soja e prova de conceito do gene *cahb12* envolvido em tolerância à seca em plantas de algodão. **Tese**, (Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia)- Universidade Católica de Brasília. 2016.

GADALETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 16, p. 652-688, 2011.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: Fealq, 2002. 920p.

GREEN, J.; VAIN, P.; FEARNEHOUGH, M.T.; WORLAND, B.; SNAPE, J.W.; ATKINSON, H.J. Analysis of the expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* tubulin-1 and *Zea mays* ubiquitin-1 promoters in rice plants in association with nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 60. P. 197-205, 2002.

GROSSI-DE-SA, M. F.; GUIMARÃES, L. M.; BATISTA, J. A.; VIANA, A. A. B.; FRAGOSO, R. R.; ROCHA, T. L. **Compositions and methods for modifying gene expression using the promoter of ubiquitin conjugating protein coding gene of cotton plants**. 08002062.1-1212, 04.02.2018.

HANSEN, G.; CHILTON, M. D. "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta. **Proceedings of the National Academy of Sciences/USA**, v. 93, n. 25, p. 14978-14983, 1996.

IMA. O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle. **Boletim de P&D**. 2015.

IMEA. Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária. **1ª Estimativa da Safra 2017/18: Algodão**. Novembro, 2017.

KLEIN, T.M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M.E.; SANFORD, J.C. Factors influencing gene delivery into *Zea-mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio-Technology**, v. 6, n. 5, p. 559-563, 1988.

MARTINS, E.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; SILVAWERNECK, J. O.; SONE, E.; WAGA, I.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil. **Biological Control**, v. 40, p. 65-68, 2007.

MONNERAT, R.G., BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* modo de ação e resistência. In: MELO, I.S. AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna, 2000, p.163-200

MONNERAT, R. G.; DIAS, D.; SILVA, S.; MARTINS, E.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. M. M.; PRAÇA, L.; SOARES, C. M. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40, p. 103-106, 2005.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P.; MARTINS, E.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control** 41, p. 291-295, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15. 1965.

NASCIMENTO, A. F.; SILVA, J. C. Melhoramento Genético do Algodoeiro no Brasil: Breves Considerações. In: **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia: Centro Científico Conhecer, v. 6, 2010. p. 1-12. 2010.

NEUTEBOOM, L. W.; KUNIMITSU, W. Y.; WEBB, D.; CHRISTOPHER, D. A. Characterization and tissue-regulates expression of genes involved in pineapple (*Ananas comosus* L.) root development. **Plant Science**. V. 163. P. 1021-1035, 2005.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, v. 313, p. 810-820, 1985

OLIVEIRA, R. S. Plantas geneticamente modificadas de algodão aplicada ao controle dos insetos-praga *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*. **Tese**, (Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia)- Universidade Católica de Brasília, 2015.

OLIVEIRA, R.S.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MOURA, H.F., MACEDO, L.L.P.; ARRAES, F.B.M.; LUCENA, W.A.; LOURENÇO-TESSUTI, I.T. et al. Transgenic cotton plants expressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Plant Sci.** 7, 1–11. 2016.

PRAÇA, L. B. *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae). **Documentos 216**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2007.

PENNA, J. C. V. Melhoramento do algodão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. p. 15-53.

RIBEIRO, T.P.; ARRAES, F.B.M.; LOURENÇO-TESSUTTI, I.T.; SILVA, M.S.; LISEI-DE-SÁ, M.E.; LUCENA, W.A.; MACEDO, L.L.P.; LIMA, J.N.; SANTOS AMORIM, R.M.; ARTICO, S.; ALVES-FERREIRA, M.; MATTAR SILVA, M.C.; GROSSI-DE-SA, M.F. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnol. J.**, doi: 10.1111/pbi.12694. 2017.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2005. 592 p.

SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia plantarum**, v. 79, p. 206-209, 1990.

SANTOS, R. C.; MONNERAT, R. G.; SÁ, M. F. G.; CORDEIRO, C. M. T.; GOMES, A. C.; GANDER, E. S. Cholesterol oxidase interferes on emergence and viability of cotton boll weevil larvae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37(11), p. 1525-1530, 2002.

SANTOS, R. C.; MARCELLINO, L. H.; MONNERAT, R. G.; GANDER, E. S. Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. **Pesq. Agropec. Bras.**, 38(11), p. 1351-1356, 2003.

SILVA, C. R. C. Seleção de eventos transformados de algodão resistente a insetos por meios moleculares e de imunodeteção. 2014. 97f. **Tese**, (Pós-graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

SILVIE, P. J.; THOMAZONI, D.; SORIA, M. F.; SARAN, P. E.; BÉLOT, J. L. **Pragas e seus danos em algodão**. Primavera do Leste, MT, 2013. 184 p. (IMAmt Boletim de identificação n°1).

SMITH, E. F.; TOWNSEND, C. O. A plant-tumor of bacterial origin. **Science**, v. 25, p. 671-673, 1907.

SOARES, T. C. **Indução Da Morfogênese *in vitro* em cultivares de algodoeiro**. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande. 2013.

THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A. M.; POLLOCK, T. J. Structural similarity between the lepidoptera and diptera specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. **J. Bacteriol.** 166(3), p.801-11, 1986.

USDA. **USDA Agricultural Projections**. 2018.

VIANA, A. A. B.; FRAGOSO, R. R.; GUIMARÃES, L. M.; PONTES, N.; OLIVEIRA-NETO, O.; ARTICO, S.; NARDELI, S. M.; ALVES-FERREIRA, M.; BATISTA, J. A. N.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SA, M. F. Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 5'UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. **BMC Biotechnology**. v. 11, n. 115, 2011.

VIDAL, M. S.; CARVALHO, J. M. F. C. **Regeneração e Transformação Genética de Plantas**. Circular Técnica - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA. Campina Grande. 2002.

YANG, X.; LI, F.; LIU, C.; ZHANG, X.; LIU, K.; FANG, W.; WU, Z. et al. Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Afr. J. Biotechnol.** 11, 6226–6233. 2012.

ZHENG, Z.; MURAI, N. A distal promoter regions of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**. v. 128. P. 59-65, 1997.

ZOU, C.; SUN, K.; MACKALUSO, J. D.; SEDDON, A. E.; JIN, R.; THOMASHOW, M. F.; SHIU, S. H. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108(36), 2011.