



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

***ADAPTABILIDADE DE HÍBRIDOS ENTRE *Gossypium*  
*barbadense* E *G. hirsutum* CONTENDO O GENE *cry1Ac****

**JAIR MOISÉS DE SOUSA**

**NATAL-RN  
2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

***ADAPTABILIDADE DE HÍBRIDOS ENTRE *Gossypium  
barbadense* E *G. hirsutum* CONTENDO O GENE *cry1Ac****

**JAIR MOISÉS DE SOUSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Centro de Bociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientadora: Dra. Lúcia Vieira Hoffmann  
Co-orientador: Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso**

NATAL-RN  
2009

S726A

Souza, Jair Moisés de  
Adaptabilidade de híbridos entre *Gossypium barbadense* E *G. hirsutum*  
contendo o gene *cry1Ac*/ Jair Moisés de Souza. – Natal: UFRN / Centro de  
Biotecnologia, 2009.  
xi, 64 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Lúcia Vieira Hoffman; Co- orientador: Paulo Augusto Vianna  
Barroso

Dissertação (mestrado) – UFRN / Centro de Biotecnologia, Programa  
de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, 2009.

Referências bibliográficas: f. 43-64

1. Genética 2. Genética de Populações 3. Adaptabilidade -  
Dissertação. I. Hoffman, Lúcia Vieira. II. Barroso, Paulo Augusto Vianna. III.  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biotecnologia,  
Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. V. Título.

CDD: 630.275

*“Meu delírio é a experiência com coisas reais”*

*Belchior*

Aos meus pais Antonio Sousa e Maria do Socorro Moisés, que  
me conduzem na direção dos caminhos do bem;

Aos meus irmãos Joel, Jailma e Jean Moisés,  
que sempre me entenderam;

A minha esposa Daniela Medeiros, minha eterna companheira;

Dedico...

## AGRADECIMENTOS

- Ao grande jardineiro do universo pelas alegrias e dificuldades que permitiram evoluir;
- Aos meus pais pelos ensinamentos que me conduzem;
- Ao CNPq pelo apoio financeiro;
- A Embrapa Algodão pela oportunidade de realização deste trabalho;
- Em especial a Dra. Lúcia Hoffmann pelos ensinamentos e compreensão;
- Ao Dr. Paulo Barroso pela grande ajuda e pelo seu exemplo de grande pesquisador;
- Aos meus colegas de laboratório pela paciência;
- A Henrique Assunção pelas filosofias bem como pela humildade em ensinar tudo que aprendeu;
- Aos meus amigos Ivandilson Menezes, Uiara Cavalcanti e Milena Ferreira pelo carinho e companheirismo;
- Ao Dr. Marc Giband pelas contribuições;
- A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a superação dos obstáculos durante a minha jornada de estudante.

## RESUMO

Espera-se que hibridações entre plantas transgênicas e espécies próximas ocorram sempre que haja simpatria e não existam barreiras de cruzamento, como é o caso, no Brasil, do algodoeiro contendo o gene *cry1Ac* e a espécie *Gossypium barbadense*. Os barbadenses vêm sendo mantidos em quintais, e é importante sua preservação como recurso genético. Híbridos foram avaliados para caracteres relacionados com a adaptabilidade, inferindo sobre suas chances de sobrevivência e seleção. Para isto, obtiveram-se plantas F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> do cruzamento entre um algodoeiro barbadense coletado no estado de Mato Grosso com as cultivares DP404, contendo *cry1Ac*, e de sua isolinha DP4049. Todos os 37 indivíduos F<sub>1</sub> e 122 dentre 170 indivíduos F<sub>2</sub> avaliados expressaram *cry1Ac*, e apresentaram níveis de resistência às lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*) equivalentes ao parental transgênicos e superiores a isolinha, barbadense e híbridos que não continham o transgene. Não foram observadas diferenças significativas para a porcentagem de germinação ou quantidade de dias para germinação. O florescimento e abertura do primeiro capulho ocorreram mais cedo nos algodoeiros herbáceos e nos híbridos que nas populações F<sub>2</sub> em média; todas as populações apresentaram um número de dias para o florescimento e abertura do primeiro capulho significativamente mais baixo que os barbadenses. As plantas mais altas na maturação eram os barbadenses, e os herbáceos as mais baixas, sendo as populações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> intermediárias. O número de sementes por planta foi superior nos híbridos F<sub>1</sub> e algodoeiros herbáceos, sendo as populações F<sub>2</sub> intermediárias em média, e os barbadenses aqueles que produziram menor número de sementes. A lagarta rosada, principalmente, e também a curuquerê-do-algodoeiro são importantes pragas de *G. barbadense*, portanto o efeito positivo do transgene pode favorecer a seleção de híbridos contendo o transgene, e deste modo favorecer plantas que contêm genoma de *G. hirsutum*, em detrimento da pureza do genoma de barbadense. A seleção deve ser influenciada pelos usos da planta: o fato de os híbridos serem mais baixos pode diferenciá-los dos pais barbadenses aos quais a propriedades medicinais são atribuídas; por outro lado, a produção bem maior de capulhos pode favorecer a manutenção dos híbridos quando se visa confecção de pavios ou ornamentação de quintais e jardins.

Palavras-chave: algodão, adaptabilidade, transgênicos.

## ABSTRACT

Hybrids among transgenic plants and related species are expected to occur if they are sympatric and when there are not crossing barriers; as is the case, in Brazil, of *cry1Ac* transgenic cotton and *Gossypium barbadense*. This species has been maintained as dooryard plants, and should be preserved as a genetic resource. Hybrids were evaluated about traits related to fitness, leading to infer about its chances of survivor and selection. A barbadense genotype collected at the state of Mato Grosso was outcrossed to the variety DP 404, containing the gene *cry1Ac*, and to the isolate DP 404. All the F<sub>1</sub> individuals and 122 among 170 F<sub>2</sub> individuals expressed the toxin, and presented levels of resistance to pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) and cotton leafworm (*Alabama argillacea*) equivalent to the transgenic parent and superior to the isolate, barbadense or non transgenic hybrids. The percentage of germination and number of days to germinate did not differ among genotypes. Anthesis of the first flower and opening of the first cotton boll occurred earlier for herbaceous cotton and F<sub>1</sub> hybrids than F<sub>2</sub> population in average; all the populations presented a number of days to flower and opening of the first boll smaller than barbadense. The highest plants were barbadenses, and herbaceous the smallest, with F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> populations presenting intermediary heights. The number of seeds per plants were superior for F<sub>1</sub> hybrids and herbaceous cotton, F<sub>2</sub> populations were in average intermediary; the barbadense genotype produced the smallest number of seeds per plant. Pink bollworm, mainly, and also cotton leafworm, are important barbadense pests, so the transgene positive effect could favor the selection of hybrids, and hence *G. hirsutum* genome, against the maintenance of pure *G. barbadense* genome. The selection may be influenced by the plant uses: the smaller size of hybrids when compared to the barbadense may lead them to be differentiated from these parents to which medicinal properties are attributed; on the other hand, the greater boll production may favor hybrids maintenance with the purpose of producing lamp wicks, or use as an ornamental or swab.

Keywords: Cotton, fitness, transgenics.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** História filogenética das espécies diplóides e alopoliplóides do gênero *Gossypium*. Baseado em Adams & Wendel (2004) 9
- Figura 2.** Nível de dano correspondente a cada nota usada para estimar o desfolhamento causado por *Alabama argilacea*. Os números dentro dos quadros correspondem às notas atribuídas. 23
- Figura 3.** Freqüência de capulhos atacados por lagarta rosada. Valores acima das barras correspondem à percentagem de capulhos atacados. 27
- Figura 4.** Nível de desfolha, avaliada com escala de notas, causada por *Alabama argillacea* nas populações estudadas. Valor acima das barras corresponde à nota média. 28
- Figura 5.** Adaptabilidade geral. 33

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Diversidade e distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Gossypium</i> .   | 7  |
| <b>Tabela 2.</b> Área de lavouras geneticamente modificadas em 2007.  | 12 |
| <b>Tabela 3.</b> Número de indivíduos expressando e não expressando a toxina Cry1Ac.  | 26 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultado do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) relativo ao estudo dos padrões de herança tendo como base a população F <sub>2</sub> BT. | 26 |
| <b>Tabela 5.</b> Valores médios dos caracteres estudados  | 30 |
| <b>Tabela 6.</b> Adaptabilidades específicas para cada caráter.   | 30 |
| <b>Tabela 7.</b> Adaptabilidades relativas para grupos de caracteres e adaptabilidade geral.  | 32 |

# SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| <b>Lista de figuras</b>   | viii |
| <b>Lista de tabelas</b>   | ix   |
| <br>  |      |
| <b>1. Introdução</b>  | 1    |
| <b>2. Objetivos</b>   | 4    |
| 2.1 Objetivo geral  | 17   |
| 2.2 Objetivos específicos   | 17   |
| <br>  |      |
| <b>3. Revisão de literatura</b>   | 6    |
| 3.1 Algodão: características, origem e evolução.  | 7    |
| 3.2 <i>Gossypium barbadense</i> L.  | 9    |
| 3.3 Algodão Bt  | 10   |
| 3.4 Hibridação  | 13   |
| 3.5 Introgressão  | 14   |
| 3.6 Fluxo gênico  | 15   |
| 3.7 Adaptabilidade, seleção natural e transgênicos  | 16   |
| <br>  |      |
| <b>4. Material e métodos</b>  | 19   |
| 4.1 Material vegetal  | 20   |
| 4.2 Experimentação a Campo  | 20   |
| 4.2.1 Expressão e herança do gene <i>cry1ac</i> em populações<br>interespecíficas   | 21   |
| 4.2.2 Caracteres avaliados  | 21   |
| 4.2.3 Avaliação de dano das lagartas rosada ( <i>Pectinophora<br/>gossypiella</i> ) e curuquerê-do-algodoeiro ( <i>Alabama argillacea</i> ) | 22   |
| 4.2.4 Avaliação da adaptabilidade   | 23   |
| <br>  |      |
| <b>5. Resultados</b>  | 25   |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.1 Expressão e herança do gene <i>cry1ac</i> em populações interespecíficas   | 26        |
| 5.2 Avaliação de dano das lagartas rosada ( <i>Pectinophora gossypiella</i> ) e curuquerê-do-algodoeiro ( <i>Alabama argillacea</i> ). | 26        |
| 5.3 Avaliação da adaptabilidade  | 29        |
| <b>6. Discussões</b>   | <b>34</b> |
| 6.1 Expressão e herança do gene <i>cry1ac</i> em populações interespecíficas   | 35        |
| 6.2 Avaliação de dano das lagartas rosada ( <i>Pectinophora gossypiella</i> ) e curuquerê-do-algodoeiro ( <i>Alabama argillacea</i> ). | 35        |
| 6.3 Avaliação da adaptabilidade  | 37        |
| <b>7. Conclusões</b>   | <b>41</b> |
| <b>8. Referências bibliográficas</b>   | <b>43</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial sofre cada vez mais com as conseqüências produzidas por práticas danosas ao equilíbrio do planeta, cuja contribuição da agricultura é bastante expressiva. Um exemplo é a grande quantidade de inseticidas químicos usados no controle de pragas (EDGE et al., 2000).

A cultura do algodoeiro é atacada por um grande complexo de insetos-praga. O método de controle mais usado é o químico, com a aplicação de inseticidas de diferentes classes, sendo a quantidade usada no Brasil bastante elevada. A busca por metodologias alternativas de controle de insetos-praga comprometidas com a sustentabilidade bem como com a preservação do meio ambiente, tem sido, a cada dia, uma necessidade constante (BOBROWSKI et al., 2003).

Com o advento da transformação genética foi possível desenvolver algodoeiros transgênicos resistentes a lagartas, praga que causa danos econômicos as lavouras. Os algodoeiros e os demais vegetais resistentes a insetos desenvolvidos por meio da engenharia genética se tornaram uma nova e importante alternativa ao uso de inseticidas. Além dos benefícios econômicos e culturais, estes algodoeiros podem reduzir o impacto ambiental da cotonicultura, pois propiciam uma redução na utilização de inseticidas químicos (EDGE et al., 2000).

O primeiro algodoeiro transgênico resistente a insetos cultivado comercialmente é denominado Mon 531 também conhecido como Bollgard ou Bt. Ele contém o gene *cry1Ac*, oriundo da bactéria *Bacillus thuringiensis* e que codifica a síntese da proteína Cry1Ac, de natureza inseticida (PERLAK et al., 1990). Algodoeiros expressando esta toxina são resistentes a quatro de espécies de pragas de insetos da ordem *Lepidopterae* (SUJII et al., 2006).

Apesar dos benefícios econômicos e ambientais que alguns vegetais geneticamente modificados (VGM) podem proporcionar, as incertezas a respeito dos eventuais efeitos adversos é motivo de discussões. As dúvidas existentes sobre os organismos geneticamente modificados levaram muitos países a criar legislações específicas para a experimentação, liberação comercial e cultivo a campo das plantas transgênicas.

Uma das indagações diz respeito à possível ocorrência de efeitos pleiotrópicos. A introdução de um segmento exógeno de DNA no genoma de um

Um dado organismo pode resultar em diversas perturbações do complexo gênico que coordena o armazenamento das informações neste organismo. Essas perturbações podem resultar na inativação de genes ou ativação de genes silenciados, bem como alteração das quantidades de metabólitos necessários a sobrevivência da planta, ou ainda na produção de novos produtos gênicos (KUIPER et al., 2001). Por outro lado, é muito importante destacar que os efeitos, anteriormente apresentados, não são exclusivos de organismos geneticamente modificados, uma vez que os mesmos também podem ser encontrados em indivíduos melhorados mediante a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento (TREWAVAS & LEAVER, 2001; DALE et al., 2002; CONNER et al., 2003; WILKINSON et al., 2003).

Outro fenômeno genético, também relacionado à segurança de organismos geneticamente modificados diz respeito à hibridação entre o organismo transgênico e seu parente selvagem (ELLSTRAND et al., 1999). A ocorrência desse fenômeno pode levar a transferência do transgene, mediante fluxo gênico, da planta geneticamente modificada para seu respectivo parente selvagem, conferindo a esses organismos uma característica inexistente entre os indivíduos de sua espécie (ELLSTRAND & HOLFMAN, 1990). Para Snow et al. (1998), uma consequência direta da hibridação e do fluxo gênico diz respeito à possibilidade do transgene conferir maior ou menor potencial adaptativo, cujos resultados podem alterar equilíbrios existentes e causar danos ambientais e econômicos.

Uma ferramenta importante capaz de quantificar as possíveis consequências ecológicas da hibridação entre uma planta transgênica e outra não transgênica consiste em estimar a adaptabilidade dos híbridos oriundos desse cruzamento. Essa medida proporciona a criação de um modelo capaz de prever o comportamento adaptativo dos híbridos assim como de suas gerações posteriores em um dado ambiente (MONGELÓ, 2001). Especificamente no caso do algodão Bt, o estudo da adaptabilidade é importante uma vez que existem espécies nativas e naturalizadas no Brasil.



## 2. OBJETIVOS

---

2.1 Geral

2.2 Específicos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Determinar se a presença do gene *cry1Ac* derivado do evento geneticamente modificado Mon 531 propicia maior adaptabilidade a descendentes da hibridação entre *Gossypium hirsutum* r. *latifolium* e *G. barbadense*.

### 2.2 Específicos

- Verificar a expressão e a herança do gene *cry1Ac* em populações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> provenientes do cruzamento interespecífico entre *Gossypium barbadense* e *G. hirsutum* r. *latifolium*;
- Verificar se a proteína expressa nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> conferem resistência às lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê do algodoeiro (*Alabama argillacea*);
- Determinar a adaptabilidade relativa e geral dos genitores e das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

---

3.1 Algodão: características, origem e evolução.

3.2 *Gossypium barbadense*

3.3 Algodão bt

3.4 Adaptabilidade, seleção natural e transgênicos

3.5 Hibridação

3.6 Introgessão

3.7 Fluxo gênico

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Algodão: características, origem e evolução.

O algodão pertence à família Malvaceae, tribo Gossypiae e ao gênero *Gossypium*, com cerca de 50 espécies das quais 45 são diplóides ( $2n = 26$ ) e 5 são alotetraploides ( $2n = 52$ ) (FRYXCELL, 1992).

A tribo Gossypiae é composta por oito gêneros. Desses oito, quatro possuem poucas espécies representantes cuja distribuição geográfica é restrita (FRYXCELL, 1968): o gênero *Lebronnecia* é endêmico das Ilhas Marquesas, o gênero *Cephalohibiscus* é exclusivo da Nova Guiné e Ilhas Salomão, o gênero *Gossypioides* encontrados no leste da África e Madagascar além do gênero *Kokia* encontrado exclusivamente nas Ilhas Havainas. Este último possui quatro espécies sendo que uma dessas já foi extinta (WENDEL & CRONN, 2003).

Em adição a esses quatro gêneros, a tribo Gossypiae possui outros quatro de tamanhos moderados e larga distribuição geográfica: o *Hampea*, composto por 21 espécies, o gênero *Cientuegosia* que inclui 25 espécies encontradas em regiões neotropicais bem como no continente africano e 17 espécies de *Thespesia*, encontradas em todas as regiões tropicais. Por último, o gênero *Gossypium* que possui cerca de 50 espécies (FRYXCELL, 1992) incluindo quatro espécies domesticadas (WENDEL & CRONN, 2003).

Wendel & Cronn (2003), agrupam as espécies pertencentes ao gênero *Gossypium* em nove grupos genômicos A, B, C, D, E, F, G, K e AD, sendo o último grupo alotetraplóide formado a partir da duplicação de cromossomos entre os genomas A e D. O restante dos demais grupos correspondem a espécies diplóides (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diversidade e distribuição geográfica de espécies do gênero *Gossypium*

| grupo genômico | nº de espécies | distribuição geográfica                      |
|----------------|----------------|--|
| A              | 2              | África                                       |
| B              | 3              | África, Ilhas Cabo Verde                     |
| C              | 2              | Austrália                                    |
| D              | 13             | México, Peru, Ilhas Galápagos, EUA (Arizona) |

|    |    |  |
|----|----|--|
| E  | 7  | Península Arábica, Nordeste africano, Sudeste Asiático |
| F  | 1  | Leste africano   |
| G  | 3  | Austrália  |
| K  | 12 | Austrália  |
| AD | 5  | Regiões tropicais e subtropicais                       |

---

Wendel & Cronn (2003).

De acordo com Adams & Wendel (2004) entre cinco a dez milhões de anos atrás, o ancestral comum de todas as espécies do gênero *Gossypium* teria originado os grupos genômicos A e D diplóides. Seguidamente, há cerca de um a dois milhões de anos, um indivíduo portador do genoma A e outro do genoma D sofreram hibridação seguida de duplicação cromossômica e originaram organismos alopoliplóides portando os dois genoma A e D (Figura 1). Dos indivíduos alopoliplóides originais descendem as cinco espécies alotetraplóides conhecidas (WENDEL, 1989; SENCHINA et al., 1999).

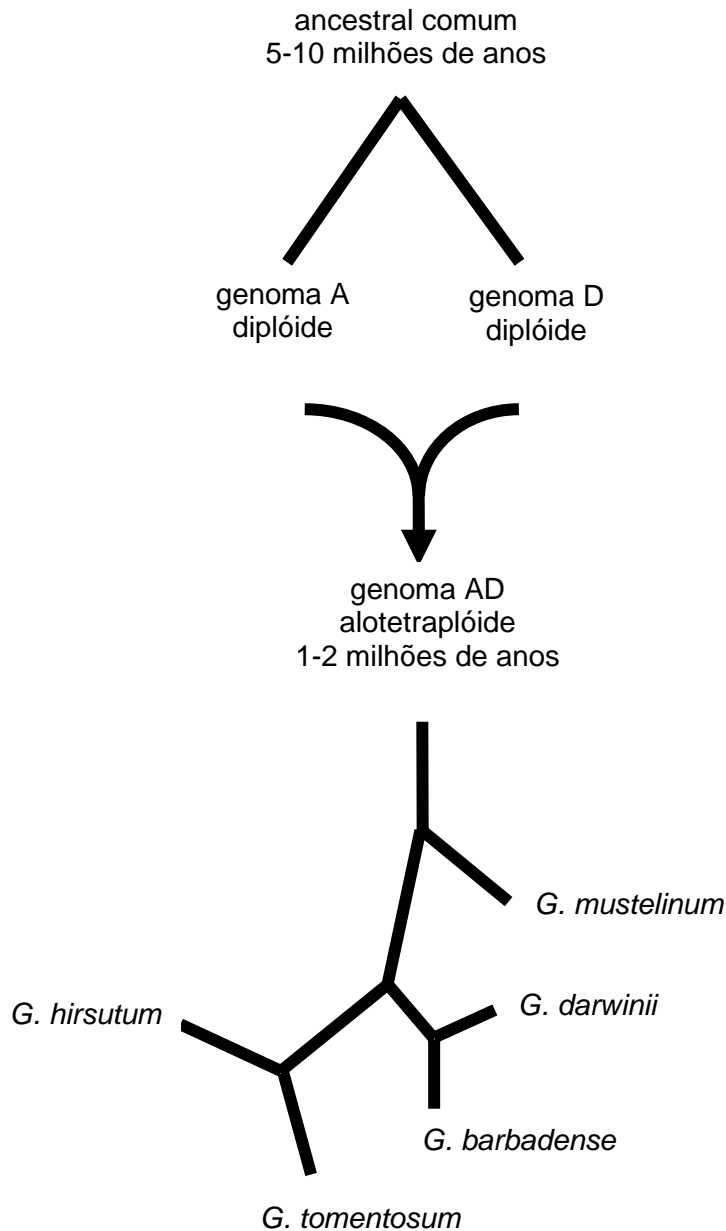
A maioria das espécies do gênero *Gossypium* são silvestres (FREIRE et al., 2000). Alguns representantes desse gênero possuem fibras, pelas quais se produzem fios usados na fabricação de tecidos (JOLY, 1991). Pelo valor comercial apresentados por suas fibras, quatro espécies são cultivadas, duas diplóides, *G. arboreum* e *G. herbaceum* provenientes da África, e duas poliplóides, *G. hirsutum*, originária do México e *G. barbadense*, proveniente do Peru (BOLEK, 2005). As sementes são utilizadas para a fabricação de óleo comestível e produção de torta para o gado (JOLY, 1991).

A taxa de cruzamento natural do algodoeiro tem sido extensamente estudado O algodoeiro é considerado uma planta de sistema

Estudos realizados no Brasil e em vários países tem demonstrado que o algodoeiro é dotado de um sistema misto de reprodução, por apresentar taxa de fecundação cruzada variando entre 5% e 95%. A taxa de cruzamentos medida nesta planta em várias regiões do planeta tem variado entre 0,25 e 100%, enquanto no Brasil essa taxa tem sem mantido entre 3 e 100% (FREIRE et al., 2002).

O sistema de reprodução por alogamia se caracteriza pela fecundação de um gameta de um indivíduo pelo gameta de outro indivíduo, neste tipo de sistema reprodutivo uma flor pode ser fecundada pelo pólen de outra flor da mesma planta. O sistema de reprodução por autogamia se caracteriza pela fecundação de um óvulo

por um grão de pólen da mesma flor. Tal sistema é recorrente em espécies hermafroditas, ainda que em muitas dessas existam mecanismos impeditivos da autofecundação (SOARES, 1993).



**Figura 1.** História filogenética das espécies diploides e aloploplóides do gênero *Gossypium*. Baseado em Adams & Wendel (2004).

### 3.2 *Gossypium barbadense* L.

A espécie *Gossypium barbadense* é uma planta originária da América do Sul, cujo centro de origem é a região situada entre o norte do Peru e o sul do Equador (BRUBAKER et al., 1999). A domesticação ocorreu no Peru. A introdução de *G. barbadense* no Brasil é anterior à colonização portuguesa, e os tipos cultivados na Amazônia parecem diferir daqueles cultivados no local de domesticação, sendo que os Andes devem provavelmente ter servido como uma barreira para o fluxo gênico (STEPHENS, 1973). Para Barroso et al. (2005a), a espécie é encontrada na forma domesticada, podendo estar presente em áreas indígenas ou fundo de quintais.

A dispersão dessas variedades se deu, principalmente, devido a práticas de agricultura (BOULANGER & PINHEIRO, 1972). No Brasil, a espécie possui uma ampla distribuição, podendo ser encontrada em quase todos os estados (ALBRANA, 2009; BARROSO et al., 2005b).

Freire (2000) afirma que no Brasil podem ser encontradas duas variedades: a variedade *G. barbadense* var. *brasiliense*, conhecida como rim-de-boi, com sementes sem línter fortemente coladas umas nas outras; a variedade *G. barbadense* var. *barbadense*, com sementes sem línter e descoladas. Entretanto, quanto a outras características botânicas, essas duas variedades assemelham-se muito, enquanto que, se fossem caracterizadas as características dos barbadenses ao leste ou oeste dos Andes possivelmente as diferenças deveriam ser mais marcantes (STEPHENS, 1973).

Ambas as variedades são arbóreas, perenes e muito similares geneticamente, diferindo, basicamente na característica semente em forma de rim (BRUBAKER et al., 1999).

Para Barroso et al. (2005b), essa espécie deve ter sido introduzida no Brasil por comunidades indígenas, cujas utilidades até hoje são a confecção artesanal de tecidos, uso como pavio de lamparinas e como planta medicinal.

### 3.3 Algodão Bt

O algodão Mon 531 conhecido popularmente como algodão Bollgard® ou Bt, foi produzido pela transferência de genes através do sistema de transformação de

plantas mediado pela *Agrobacterium tumefaciens* (CTNBIO Parecer técnico 513/2005). Tal sistema proporcionou a incorporação do gene *cry1Ac*, oriundo da bactéria *B. thuringiensis*, que codifica uma proteína de natureza inseticida (PERLAK et al., 1990), tornando o algodão Bt resistente a quatro espécies de Lepdoptera: *Alabama argilácea* (Hüber), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) e *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (SUJII et al., 2006).

O algodão Bt foi pioneiramente liberado nos Estados Unidos no ano de 1995, seguido, um ano mais tarde pela Austrália. Em 1997, a África do Sul, México e Japão aprovaram sua liberação, seguidos pela Argentina e demais países, de modo que atualmente, a lista das nações que admitem em seus territórios o plantio do algodão Bt, é composta por 14 países. No Brasil a liberação ocorreu no ano de 2005, após parecer favorável emitido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (AGBIOS, 2009; CTNBIO Parecer técnico 513/2005).

De acordo com o relatório do Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), em 2007 o Brasil assumiu a posição de terceiro lugar no ranking de países produtores de lavouras transgênicas, perdendo apenas para os Estados Unidos e a Argentina. Neste mesmo ano cerca de 15 milhões de hectares foram plantadas com plantas transgênicas das quais 14,5 milhões foi ocupada com soja transgênica e 500.000 hectares com algodão Bt (Bollgard<sup>®</sup>) (Tabela 2).

A integração de DNA exógeno no genoma de uma planta pode ocasionar perturbações nos genes da mesma ou na ativação de genes silenciados, como também pode resultar na formação de novos metabólicos ou ainda alterar o nível dos já existentes (KUIPER et al., 2001).

O conhecimento de genes introduzidos, sua regulação bem como o sítio integração no genoma da planta pode se caracterizar numa informação de grande valia para a avaliação dos riscos desses genes para o ambiente e para a saúde humana (KÖNIG, 2003). É importante ainda enfatizar que a ocorrência desses efeitos não são exclusivos de plantas transgênicas, como também ocorre frequentemente em plantas melhoradas através de técnicas convencionais de melhoramento (TREWAVAS & LEAVER, 2001; DALE et al., 2002; CONNER et al., 2003; WILKINSON et al., 2003).



**Tabela 2.** Área de lavouras geneticamente modificadas em 2007.

| Posição | País          | Área (milhões de hectares) | Lavouras GM   |
|---------|---------------|----------------------------|---|
| 1º      | EUA           | 57,7                       | Soja, milho, algodão, canola, abóbora, papaia, alfafa |
| 2º      | Argentina     | 19,1                       | Soja, milho, algodão                                  |
| 3º      | Brasil        | 15,0                       | Soja, algodão   |
| 4º      | Canadá        | 7,0                        | Canola, milho, soja                                   |
| 5º      | Índia         | 6,2                        | Algodão   |
| 6º      | China         | 3,8                        | algodão, tomate, álamo, petúnias, papaia, pimentão    |
| 7º      | Paraguai      | 2,6                        | Soja  |
| 8º      | África do Sul | 1,8                        | Milho, soja, algodão                                  |
| 9º      | Uruguai       | 0,5                        | Soja, milho   |
| 10º     | Filipinas     | 0,3                        | Milho   |
| 11º     | Austrália     | 0,1                        | Algodão   |
| 12º     | Espanha       | 0,1                        | Milho   |
| 13º     | México        | 0,1                        | Algodão, soja   |
| 14º     | Colômbia      | < 0,1                      | Algodão, cravos                                       |
| 15º     | Chile         | < 0,1                      | Milho, soja, canola                                   |

Fonte: Relatório do Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA). Situação global das lavouras geneticamente modificadas Comercializadas no ano de 2007.

Tais fatos anteriormente descritos podem ser previstos mediante o conhecimento da estrutura básica do funcionamento e função do gene introduzido, como também nas vias metabólicas envolvidas e do sítio de introdução desse gene (GROSSI-DE-SÁ et al., 2006).

No algodão Bt, o loco que contem o transgene é composto pelos genes *cry1Ac*, que expressa a proteína Cry1Ac, e o *nptII*, que codifica a enzima neomicina

fosfotransferase II, usada como marcador de seleção durante a transformação, além de um segundo fragmento incompleto e inativo do gene *cry1Ac*. Os dois primeiros estão ligados e segregam-se como um único loco (AGBIOS, 2009).

A caracterização do loco transgênico é de grande importância pois fornece a informação da composição, integridade e número do cópias do DNA inserido como também de possíveis alterações no DNA genômico (GROSSI-DE-SÁ et al., 2009).

Quanto ao padrão de expressão da proteína Cry1Ac estudos tem demonstrado que a mesma não se expressa de forma homogênea na planta, podendo variar em diferentes anos, de acordo com as condições ambientais como também ao longo dos tecidos da planta (AKIN et al., 2002).

### 3.4 Hibridação

Hibridação interespecífica é definida como o cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes. Tal fenômeno pode ser natural, quando ocorre de forma espontânea em ambientes naturais, ou ainda artificial quando realizada pelas mãos humanas (STEWART et al., 2003).

Sabe-se que a hibridação natural pode contribuir consideravelmente para o processo adaptativo ou ainda para o surgimento de novas espécies. Uma forma de contribuição refere-se ao efeito combinatório da hibridação com a introgressão, uma vez que após a ocorrência da hibridação os indivíduos podem ser submetidos à introgressão, podendo dessa forma ocorrer transferência de caracteres de um táxon a outro e com isso conferir um maior ou menor potencial adaptativo aos híbridos em questão. A hibridação pode ainda proporcionar o surgimento de novas espécies portadoras de características importantes para a sobrevivência das mesmas em seu habitat (RIESENBERG, 1997). A mesma ocorre frequentemente em um grande número de espécies vegetais e pode influenciar consideravelmente os processos evolutivos proporcionando vantagens adaptativas (ELLSTRAND et al., 1999).

A hibridação produz um vasto arranjo de genótipos híbridos recombinantes que serão submetidos às forças evolutivas da seleção natural, de modo que alguns desses genótipos podem apresentar um potencial adaptativo mais elevado que seus pais (BURKE & ARNOLD, 2001)

Sabe-se atualmente que muitas das variedades de plantas melhoradas são capazes de hibridizarem com espécies selvagens. Ellstrand (2003) lista uma série de variedades cultivadas de importante valor econômico, dentre eles podemos citar: a banana (*Musa acuminata*), o café (*Coffea arabica*), o algodão (*Gossypium hirsutum* e *G. barbadense*), o milho (*Zea mays*), a batata (*Solanum tuberosum* e *S. stenotomum*), além do arroz (*Oryza sativa* e *O. glaberrima*) e da soja (*Glycine max*).

*G. barbadense* é sexualmente compatível e produz descendentes férteis quando cruzados com *G. hirsutum*. A maioria dos genes transmitidos de *G. hirsutum* se expressa mendelianamente em *G. barbadense* (Jiang et al., 2000; Ulloa et al., 2001).

### 3.5 Introgessão

Atualmente o conceito de introgessão é bastante controverso, pois ainda não se chegou a um conceito que satisfaça todos as questões biológicas e filosóficas envolvidas nesse fenômeno. Entretanto, para Stewart et al. (2003), a introgessão é a incorporação permanente de genes via hibridação.

Para Stebbin (1958) em ambientes naturais, o número de espécies que sofrem introgessão é muito discreto. Riesenbergs & Wendel (1993) listam 165 casos desse fenômeno, porém apenas 65 puderam ser comprovados através de experimentos.

O estudo da introgessão em plantas é tratado com muita atenção pelos pesquisadores por se tratar de um valioso fator evolucionário (ANDERSON, 1949). Dessa forma, as conseqüências evolutivas desse fenômeno em condições naturais incluem aumento da diversidade genética, transferência e origem de adaptações, surgimento de novas espécies, quebras e reforços de barreiras isolantes e a promoção da colonização e dispersão (RIESENBERG & WENDEL, 1993; ABBOT, 1992;).

A introgessão de um transgene em uma população não-transgênica é um processo dinâmico e exige um tempo considerável, assim como muitas gerações para sua fixação. Entretanto, se a seleção for persistente ou o tamanho da população for pequena, a fixação pode ocorrer rapidamente (STEWART et. al., 2003).

Um fator capaz de influenciar na probabilidade do escape do transgene consiste na localização física desse transgene no genoma do hospedeiro, pois determinadas regiões do genoma apresentam taxas de introgressão diferentes. Dessa forma, se a incorporação ocorrer nas proximidades de um determinado gene constitutivo, a incorporação terá uma chance maior de persistir na espécie (BORÉM, 2002).

### 3.6 Fluxo gênico

Fluxo gênico pode ser definido como o processo migratório de alelos entre populações (STEWART et al., 2003). Este fenômeno tem sido atualmente muito discutido em virtude da possibilidade de sua ocorrência entre culturas transgênicas e não-transgênicas (MESSENGUER et al., 2001).

De acordo com Freire et al. (2002), o fluxo gênico pode ocorrer por meio da dispersão de pólen ou de sementes. O fluxo gênico quando ocorrer por hibridação, o que portanto só é possível entre indivíduos de uma mesma espécie ou espécies próximas, pode ser chamado de fluxo gênico vertical. O fluxo gênico via dispersão do grão de pólen ocorre geralmente em pequena escala na natureza (ARIAS & RIESEBERG, 1994), por outro lado, esse mesmo fenômeno via dispersão de sementes, é de maneira geral, mais observado (COLBACH, et. al., 2004).

As conseqüências geradas pelo fluxo gênico na estrutura genética das populações dependem de vários fatores, tais como: tamanho da população (FARRIS & MITTON, 1984), distância física entre as populações envolvidas (MATUS-CÁDIZ, et. al., 2004) e duração do fluxo gênico (KLINGER & ELLSTRAND, 1999).

O fluxo gênico entre variedades melhoradas e seus parentes selvagens podem levar ao surgimento de novos indivíduos com características de plantas daninhas ou ainda a novas espécies com alto poder invasivo (ELLSTRAND & SCHIERENBECK, 2000).

Para Ellstrand (2003), o fluxo gênico entre plantas cultivadas e seus parentes selvagens pode implicar no aumento da probabilidade de extinção das espécies selvagens, pois os novos indivíduos podem ser portadores de caracteres importantes a sobrevivência em seu habitat, confirmando assim sua superioridade em relação a seus parentes selvagens. Em trabalhos realizados com arroz, Kiang et

al. (1979) concluíram que a hibridação entre arroz cultivado e seu parente selvagem *Oryza rufipogon* ssp *formosana* quase levou a extinção desse último grupo de indivíduos.

Entretanto o fluxo gênico pode ser uma importante força evolutiva, quando ocorre entre populações que diferem bastante entre si; e mesmo consistir na principal fonte de evolução. De acordo com Ellstrand (1999), isto ocorre quando os níveis de hibridação são elevados e as taxas de introgressão superam as taxas de mutação. Dessa forma, o fluxo de genes pode ter um papel criativo na evolução ao introduzir novos caracteres, portanto aumentando a variabilidade genética dentro de uma população (HENDRICK, 2005).

Sabe-se que muitas espécies de vegetais melhoradas ou geneticamente modificadas são capazes de cruzarem com seus parentes selvagens e com isso ocorrer fluxo gênico dessas populações em direção as espécies não melhoras ou não-transgênicas (ELLSTRAND, 1999; BURKE & RIESEBERG, 2003).

Diante dessas possibilidades, quais seriam as conseqüências ecológicas da ocorrência dessa hibridação? Como se comportariam esses híbridos portando um gene, no caso dos transgênicos, capaz de conferir uma característica inexistente neste ambiente e que nenhum dos indivíduos dessa população selvagem possuía?

### **3.7 Adaptabilidade, seleção natural e transgênicos**

O termo Seleção Natural foi pioneiramente utilizado por Charles Darwin para se referir ao fenômeno evolutivo que proporciona a sobrevivência dos indivíduos mais aptos de uma população em um determinado ambiente. Tal fenômeno permite a transmissão de alelos que viabilizam a melhor interação com o meio em que vive para gerações posteriores (MONJELÓ, 2001).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e posterior desenvolvimento dos organismos geneticamente modificados (GMO), importantes questionamentos relacionados à hibridação vêm preocupando não só pesquisadores como também ambientalistas e a população em geral. Qual o potencial efeito ecológico do surgimento de híbridos viáveis em ambientes naturais oriundos do cruzamento entre organismos geneticamente modificados e seu parentes selvagens?

A ocorrência da hibridação entre as populações em questão, ocasiona a ocorrência de fluxo gênico entre as mesmas. Basicamente duas conseqüências do fluxo de genes entre os tipos de organismos acima mencionados são possíveis. Inicialmente os híbridos podem não apresentar nenhum efeito ecológico danoso ao equilíbrio das espécies, denominado assim efeito neutro. Entretanto, um outro possível efeito diz respeito ao surgimento de híbridos portadores de caracteres de alto potencial adaptativo, ocasionando a proliferação do mesmo podendo acarretar na extinção de seus respectivos parentes selvagens (ELLSTRAND & SCHIERENBECK, 2000).

Alelos que conferem vantagem competitiva devem causar um grande impacto, visto que haverá pressão seletiva atuando no sentido de aumentar suas freqüências (WRIGHT, 1969).

Uma ferramenta importante capaz de verificar as possíveis conseqüências ecológicas da hibridação e fluxo gênico entre uma planta transgênica e outra não transgênica consiste em estimar a adaptabilidade dos híbridos oriundos desse cruzamento. A adaptabilidade pode ser definida como uma medida matemática capaz de quantificar a atuação momentânea da seleção natural nos indivíduos de uma população em um dado ambiente (SOBER, 2001). Para Mongeló (2001) essa medida proporciona a criação de um modelo capaz de prever o comportamento adaptativo dos híbridos assim como de suas gerações posteriores em um dado ambiente.

A adaptabilidade pode ser expressa de forma geral ( $W$ ) ou relativa ( $w$ ). A adaptabilidade relativa corresponde ao desempenho adaptativo apresentado por uma população ou genótipo em um determinado ambiente quando comparada aquela de uma outra população ou genótipo neste mesmo ambiente, de acordo com os caracteres escolhidos para comparação. Esses caracteres são muito importantes e devem está associados com o crescimento vegetativo e a reprodução, pois os mesmos podem revelar o potencial competitivo e reprodutivo dos indivíduos em questão (ARRIOLA & ELLSTRAND, 1997). Assim para um genótipo, o ótimo  $w$  será sempre igual a 1 e para os demais genótipos, este valor irá variar entre 0 e 1 (MONGELO, 2001). Já a adaptabilidade geral pode ser definida como o somatório das adaptabilidades relativas de todas as populações em todos os caracteres avaliados.

Com a ocorrência da hibridação e de fluxo gênico outro fenômeno também relacionado à adaptabilidade é a introgressão. Em estudos realizados com híbridos gerados pelo cruzamento entre *Brassica rapus* convencional e uma variedade transgênica da mesma espécie, Warwick et al., (2007) demonstrou que a adaptabilidade influencia diretamente na introgressão do transgene. Dessa forma, quando os híbridos apresentam altas taxas de adaptabilidade os mesmos podem apresentar elevadas taxas de introgressão.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

4.1 Material vegetal

4.2 Expressão e herança do gene *cry1ac* em populações interespecíficas

4.3 Experimentação a Campo

4.4 Avaliação da adaptabilidade



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Sete tipos de materiais genéticos foram usados: a cultivar DP 404 BG, da espécie *G. hirsutum* portadora do gene exógeno *cry1Ac*, que codifica a proteína Cry1Ac, conferindo resistência a quatro espécies de lagartas-pragas da cultura do algodão (AGBIOS, 2009); a cultivar DP 4049, isolinha não transgênica da cultivar DP 404 BG; acesso MT 05 41, da espécie *G. barbadense*, com fibra marrom e demais caracteres semelhantes espécimes típicas da espécie. Este acesso foi usado como genitor feminino. Os híbridos F<sub>1</sub> foram autofecundados e obteve-se a geração F<sub>2</sub>.

### 4.2 Experimentação a Campo

O experimento a campo foi realizado em Itatuba, PB (7°23'02,8" S; 35°32'38,7" O). O plantio dos materiais ocorreu no dia 11/09/2007 tendo se encerrado no dia 20 de Março de 2008. O clima do município é do tipo tropical semi-úmido, com pluviometria anual média de 431,8 mm. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, sendo cada parcela composta por uma cova com uma planta. O número de repetições variou segundo a geração, sendo 20 para cada genótipo parental (DP 404 BG, DP 4049 e MT-04-41), 34 para cada geração F<sub>1</sub> (F<sub>1</sub> BT e F<sub>1</sub> ISOL) e 84 para cada geração F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub> BT e F<sub>2</sub> ISOL).

Foram plantadas três sementes por cova em espaçamento 1,5 x 1,5 cm, sendo realizado desbaste para uma planta por cova aos 20 dias após a instalação do experimento. O desbaste das plantas DP 404 BG, F<sub>1</sub> (DP 404 BG vs MT-05-41) e F<sub>2</sub> (DP 404 BG vs MT-05-41) foi realizado após o teste sorológico com o kit *SeedChek Bt1Ac Test Strips* (Strategic Diagnostics Inc., USA), sendo mantidas apenas plantas que expressavam a proteína Cry1Ac.

#### 4.2.1 Expressão e herança do gene *cry1ac* em populações interespecíficas

A análise da expressão do transgene oriundo da bactéria *Bacillus thuringiensis* foi realizado utilizando o kit *SeedChek Bt1Ac Test Strips* (Strategic Diagnostics Inc., USA). O kit realiza detecção qualitativa da proteína Cry1Ac baseado em teste sorológico.

O teste foi aplicado em 17 indivíduos DP 404 BG, 37 indivíduos F<sub>1</sub> (DP 404 BG vs MT-05-41) e em 170 indivíduos F<sub>2</sub> (DP 404 BG vs MT-05-41). Utilizou-se como controles negativos plantas da isolinha DP4049. De cada planta foi coletado uma pequena amostra de tecido foliar fresco correspondente a dois discos de microtubos de 1,5 ml (diâmetros de cerca de 10mm). As amostras foram maceradas com pistilo e em seguida adicionou-se tampão de extração de proteínas (fornecido junto com o kit, onde a composição do tampão não foi descrita) e procedeu-se o teste de acordo com as instruções do fabricante.

Os resultados obtidos quanto à presença da proteína Cry1Ac na geração F<sub>2</sub> (DP 404 BG vs MT 05 41) foram submetidos ao teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) para verificação do padrão de segregação do gene *cry1Ac*.

#### 4.2.2 Caracteres avaliados

Foram avaliados os seguintes caracteres: a) dias para a germinação: número de dias entre o plantio e a emergência das plântulas; b) taxa de germinação, proporção de plântulas emergidas até o 15º dia após o plantio; c) dias para a floração: número de dias entre o plantio e a abertura da primeira flor; d) dias para o aparecimento do primeiro capulho: número de dias entre o plantio e a abertura do primeiro capulho; e) altura na maturação: altura, em centímetros, das plantas ao final do ciclo, cuja medição foi realizada aos 160 dias após o plantio; f) número de capulhos por planta: todos os capulhos foram colhidos em sacos individuais por planta e posteriormente contados; g) número de sementes por capulho: estimados em amostra de três capulhos tomados 1 em cada terço inferior, médio e superior da planta; h) número de sementes por planta: número total de sementes produzido por cada planta, estimado pela multiplicação do número de capulhos e número de sementes por capulho.

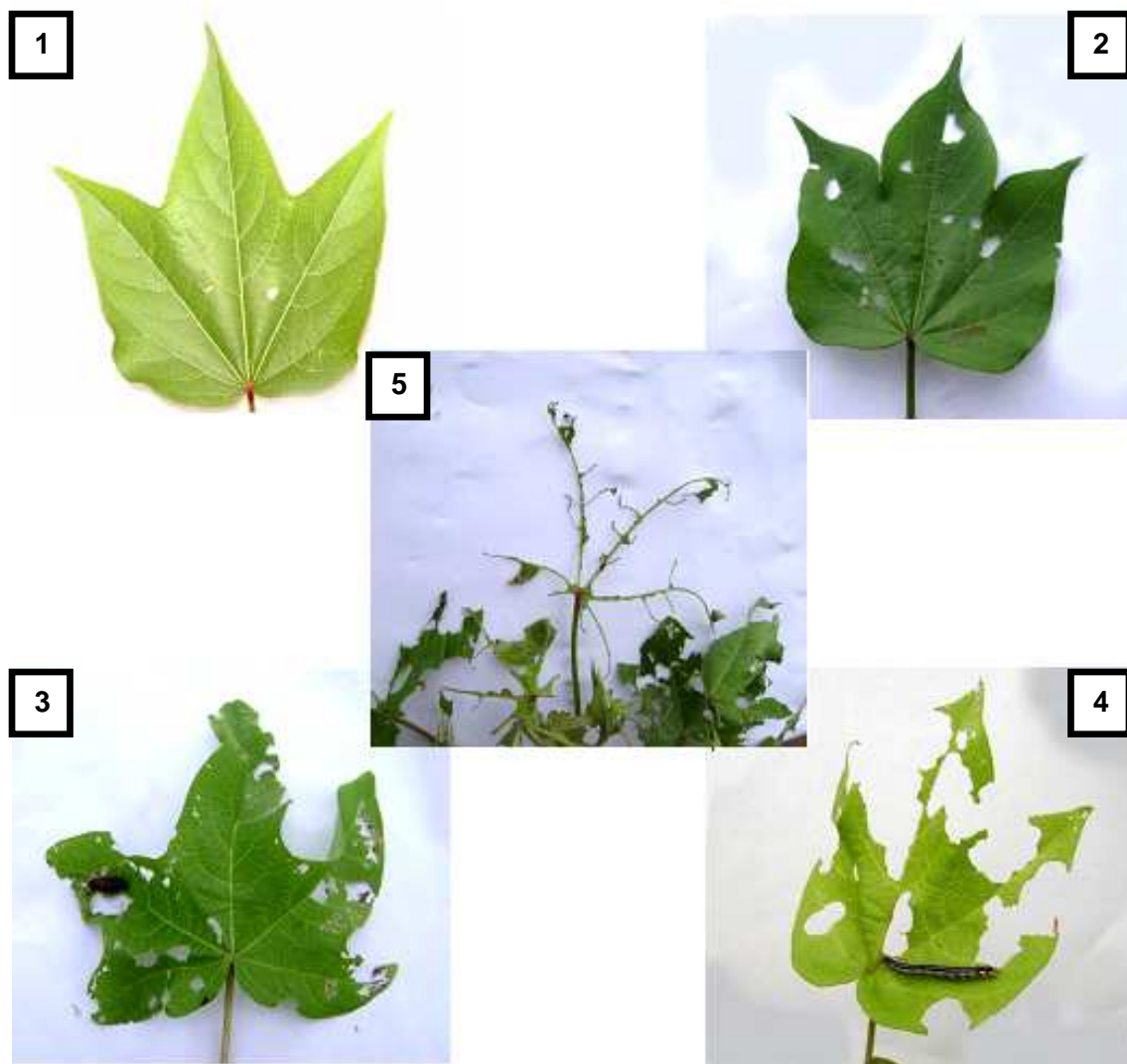
Não foi realizado nenhum tipo de controle para lagartas. Entretanto realizou-se uma aplicação de betacyfluthrin (Bulldock 125 SC), na dose de 80ml/ha, para o controle de um surto de bicudo (*Anthonomus grandis*), no início da formação dos botões.

#### **4.2.3 Avaliação de dano das lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*).**

Avaliou-se ainda o dano causado pela lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê do algodoeiro (*Alabama argillacea*). A infestação de ambas as lagartas foi natural.

Os danos causados pela lagarta rosada foram estimados com base na proporção de capulhos atacados. Para obter as estimativas foram amostrados ao acaso 30 capulhos de cada planta após o fechamento do ciclo. No caso de *G. barbadense* que apresentaram menos de 30 capulhos, foram avaliados todos os capulhos da planta. Foram considerados atacados aqueles capulhos que apresentaram lagartas rosadas em seu interior ou sintomas de danos causados pela praga.

A avaliação da desfolha causada pelo curuquerê foi avaliada na única revoada da praga durante o experimento, ocorrida em fevereiro de 2008. Foi utilizada escala de notas que variou de 1 a 5. A nota 1 foi atribuída aos indivíduos que possuíam folhas sem danos significativos enquanto a nota 5 àqueles que apresentaram folhas com danos muito severos, com a destruição de quase todo o limbo foliar. Danos intermediários foram quantificados com notas entre os valores anteriormente descritos. Folhas típicas de cada uma das notas podem ser observadas na figura 2.



**Figura 2.** Nível de dano correspondente a cada nota usada para estimar o desfolhamento causado por *Alabama argillacea*. Os números dentro dos quadros correspondem às notas atribuídas.

Como os resultados para a maioria dos caracteres avaliados não apresentavam distribuição normal e tampouco homocedastia, empregou-se o teste não-paramétrico da mediana conforme metodologia descrita por Vieira (2003).

#### 4.2.4 Avaliação da adaptabilidade

A adaptabilidade relativa ( $w$ ) foi estimada a partir de cada característica conforme descrito por Song et al. (2004). A parcela que apresentou o maior desempenho adaptativo em cada característica estudada, foi atribuído um valor 1,0.

Para os demais se atribuiu valor de 0,0 a 1,0, de acordo com sua proporção em relação ao valor mais alto.

Para estimar a adaptabilidade por estágio de desenvolvimento as características foram classificadas em três grupos: a) germinação: dias para a germinação e taxa de germinação; b) Morfológica/fenológica: dias para a floração, dias para o aparecimento do primeiro capulho; altura na maturação; c) reprodutivo: número de capulhos por planta, número de sementes por capulho e número de sementes por planta. A adaptabilidade por estágio também foi estimada para cada parcela, sendo obtida pela por meio da média da adaptabilidade relativa para as características de cada grupo.

A adaptabilidade geral (W) foi estimada para cada parcela como a média das três adaptabilidades por estágio.

Da mesma forma que para os dados originais, devido a ausência de homocedastia e distribuição normal foram usados as comparações entre as populações foram realizadas por meio do teste de mediana (VIEIRA, 2003).

## 5. RESULTADOS

---

5.1 Expressão e herança do gene *cry1ac* nas populações interespecíficas

5.2 Avaliação de dano das lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*).

5.3 Avaliação da adaptabilidade

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expressão e herança do gene *cry1ac* nas populações interespecíficas

A análise da expressão do gene *cry1ac* pelo kit SeedChek Bt1Ac Test Strips (Strategic Diagnostics Inc., USA) permitiu verificar que todos os indivíduos do genótipo DP 404 BG e da geração F<sub>1</sub> (DP 404 BG vs MT-05-41) expressavam a proteína Cry1ac (Tabela 3). Este fato demonstra a pureza genética quanto a este loco das sementes deste genótipo. A geração F<sub>2</sub> segregou para a expressão da toxina. O teste de qui-quadrado ( $X^2$ ), apresentado na tabela 4, forneceu valor de 0,86 ( $p > 0,35$ ; 1 GL), demonstrando que a expressão do gene *cry1Ac* foi dominante e segregou na proporção de 3:1.

**Tabela 3.** Número de indivíduos expressando e não expressando a toxina Cry1Ac.

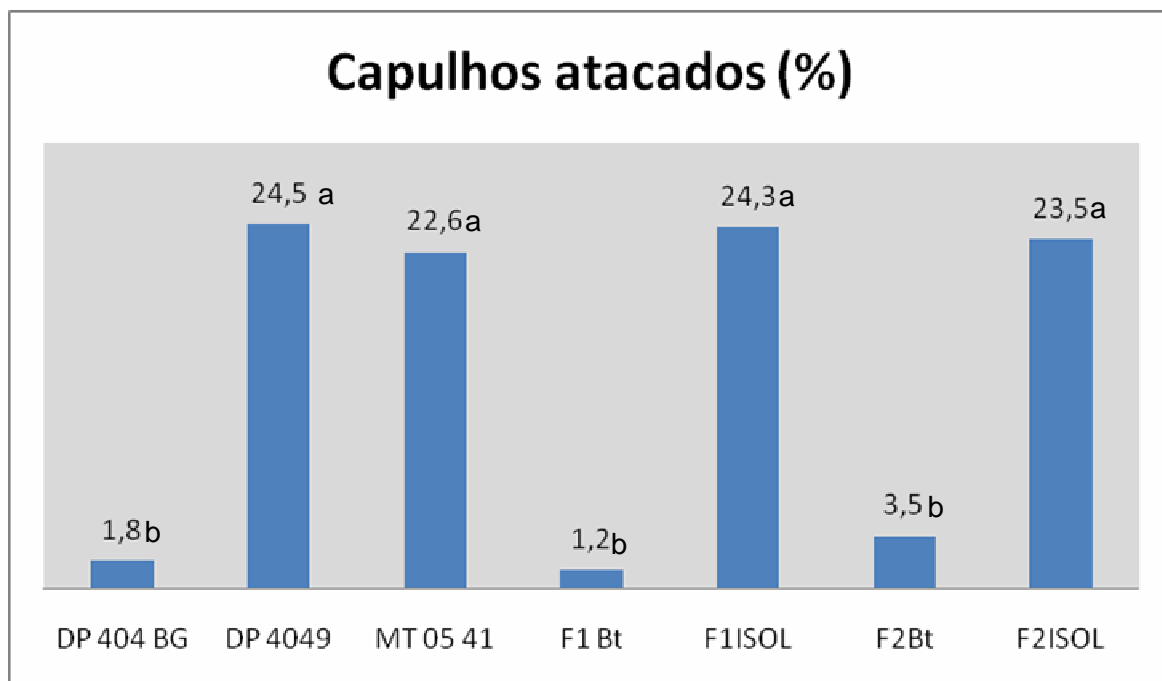
| População | Total | Positivo | Negativo |
|-----------|-------|----------|----------|
| DP 404 BG | 17    | 17       | 0        |
| F1 Bt     | 37    | 37       | 0        |
| F2 Bt     | 170   | 122      | 48       |

**Tabela 4.** Resultado do teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) relativo ao estudo dos padrões de herança tendo como base a população F<sub>2</sub>BT.

| Fenótipo | FO  | FE  | (FO-FE) <sup>2</sup> | $X^2 = (FO-FE)^2 / FE$ |
|----------|-----|-----|----------------------|------------------------|
| Positivo | 122 | 128 | 25                   | 0,28                   |
| Negativo | 48  | 43  | 36                   | 0,58                   |
|          |     |     | $X^2$                | 0,86                   |

### 5.2 Avaliação de dano das lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*).

Notou-se a ocorrência natural de lagarta rosada a aproximadamente 55 dias do plantio, sendo possível então avaliar o número de capulhos atacados. As plantas transgênicas contendo o gene *cry1Ac* apresentaram entre 1,2%(F1) a 3,5% (F2) de capulhos atacados (Figura 3) e as plantas convencionais 22% (MT 05 41) a 24% (DP 404 isolinha) de capulhos atacados. O teste da mediana separou as populações em dois grupos, sendo primeiro com menor incidência contendo todas as plantas que expressam a proteína transgênica e o segundo formado pelas plantas convencionais. As diferenças entre as plantas transgênicas e convencionais foram muito elevadas e indicam forte expressão da toxina Cry1Ac nos frutos de todas as populações transgênicas estudadas. Embora não tenha sido quantificado, a intensidade de dano causado pela lagarta rosada em cada capulho era visivelmente inferior naqueles colhidos de plantas transgênicas. A efetividade de controle da lagarta rosada foi similar, independente da participação de *G. barbadense* na síntese da população. Portanto, além de expressar a toxina, as plantas F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> de *G. barbadense* contendo o gene *cry1Ac* são resistentes à lagarta rosada.



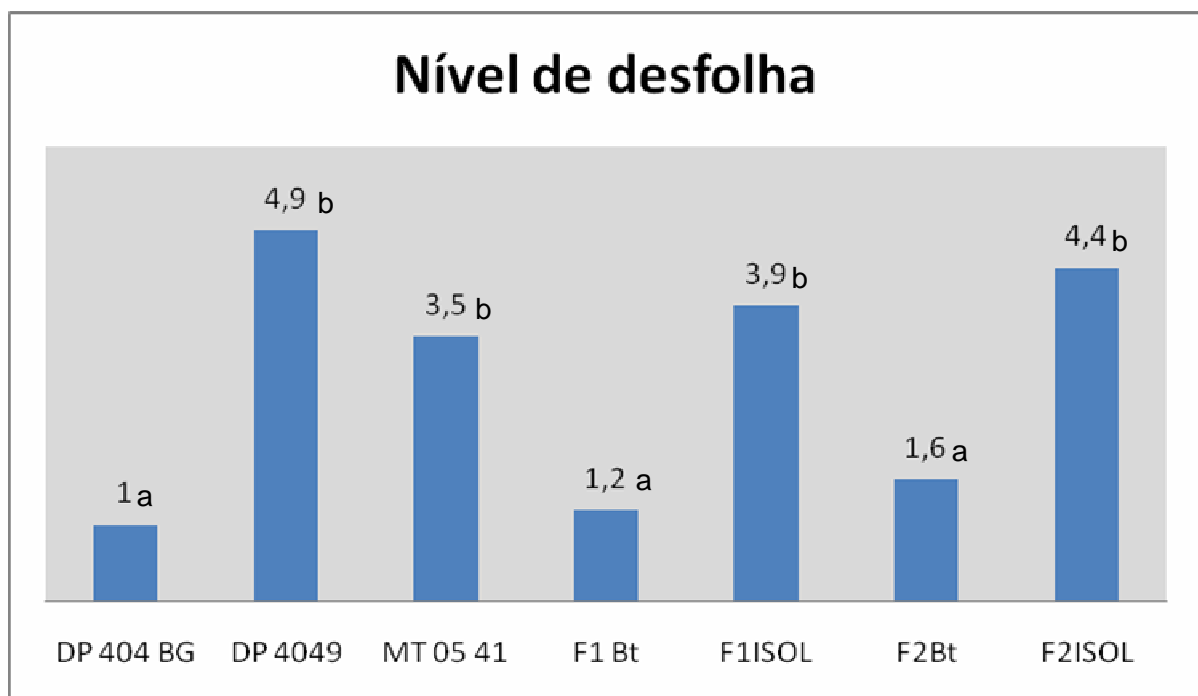
**Figura 3.** Frequência de capulhos atacados por lagarta rosada. Valores acima das barras correspondem à percentagem de capulhos atacados. Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram entre si de acordo com o teste da mediana.



A lagarta curuquerê-do-algodoeiro apresentou forte incidência a aproximadamente 130 dias do plantio (Figura 2).

A desfolha causada pela curuquerê-do algodoeiro foi menor nas plantas transgênicas do que nas plantas convencionais (Figura 4), segundo o teste da mediana ( $p < 0,01$ ). Este resultado indica que a toxina estava se expressando em níveis suficientes nas folhas para conferir resistência ao curuquerê. Entre as populações geneticamente modificadas, apenas no caso dos genótipos DP 404 BG todos os indivíduos apresentaram nota 1 (danos inexistentes ou muito pequenos). Para os demais transgênicos, embora a nota 1 tenha sido a mais freqüente, alguns indivíduos foram avaliados com valores mais altos.

Considerando as duas pragas, verificou-se que descendentes de *G. barbadense* não melhorados expressaram a toxina em níveis suficientes para o controle de ambas as lagartas, mesmo em condições de elevada infestação.



**Figura 4.** Nível de desfolha, avaliada com escala de notas, causada por *Alabama argillacea* nas populações estudadas. Valor acima das barras corresponde à nota média. Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram entre si de acordo com o teste da mediana.

### 5.3 Avaliação da adaptabilidade

De acordo com a tabela 5, não foram observadas diferenças significativas para a quantidade de dias para germinação. De acordo com trabalhos realizados na Embrapa Algodão, alguns acessos de *G. barbadense* coletados no Brasil possuem sementes duras, que retardam a absorção de água para iniciar o processo de germinação (Paulo A. V. Barroso, comunicação pessoal). Entretanto, este não é o caso da população MT 05 41 usada neste estudo. Sendo assim, a tabela 5 demonstra que o grau de dormência das sementes é muito baixo em todas as populações. Em relação a quantidade de sementes germinadas por cova, pode ser observado que a população MT 05 41 apresentou as maiores quantidades médias de sementes germinadas por cova, e por essa razão os maiores valores adaptativos.

Tabela 5. Valores médios dos caracteres estudados.

|                  | DG   | SG                  | DF      | DC       | AM       | CP      | SC    | SP       |
|------------------|------|---------------------|---------|----------|----------|---------|-------|----------|
| <b>DP 404 BG</b> | 5.45 | 2.35ab <sup>1</sup> | 52.50a  | 100.85a  | 104.9cd  | 71.55bc | 33.4a | 2384.7ab |
| <b>DP 4049</b>   | 5.60 | 2.30ab              | 57.60ab | 96.85a   | 77.90d   | 57.10cd | 30.0a | 1663.1bc |
| <b>MT 05 41</b>  | 5.50 | 2.75a               | 113.45c | 158.65d  | 218.90a  | 18.95d  | 7.9d  | 147.4d   |
| <b>F1 Bt</b>     | 6.29 | 2.29ab              | 53.65a  | 102.06ab | 155.59b  | 137.74a | 21.7b | 3018.2a  |
| <b>F1 ISOL</b>   | 6.26 | 2.53ab              | 52.97a  | 100.41ab | 151.32b  | 97.79ab | 21.1b | 2074.6ab |
| <b>F2 Bt</b>     | 6.15 | 2.23ab              | 59.48b  | 108.63c  | 126.93bc | 91.10b  | 16.0c | 1451.9c  |
| <b>F2 ISOL</b>   | 5.95 | 2.02b               | 59.96 b | 104.82bc | 141.43bc | 72.70bc | 14.8c | 1111.9c  |

<sup>1</sup> Valores seguidos por letras distintas foram diferentes segundo o teste da mediana ( $p < 0,05$ )

DG – Dias para a germinação; SG – número médio de sementes germinadas por cova com 3 sementes; DF – dias para o florescimento; DC – dias para a abertura do primeiro capulho; AM – altura na maturação; CP – capulhos por planta; SC – sementes por capulho; SP – sementes por planta.

Tabela 6. Adaptabilidades específicas para cada caráter.

|                  | DG*  | SG     | DF     | DC      | AM     | CP     | SC     | SP     |
|------------------|------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| <b>DP 404 BG</b> | 0.93 | 0.78ab | 0.90a  | 0.89 ab | 0.41cd | 0.25bc | 0.53ab | 0.51ab |
| <b>DP 4049</b>   | 0.90 | 0.77ab | 0.83ab | 0.92a   | 0.31d  | 0.20c  | 0.37bc | 0.36bc |
| <b>MT 05 41</b>  | 0.92 | 0.92a  | 0.43c  | 0.58c   | 0.87a  | 0.07d  | 0.03d  | 0.03d  |
| <b>F1 Bt</b>     | 0.83 | 0.76ab | 0.86a  | 0.87ab  | 0.61b  | 0.49a  | 0.67a  | 0.64a  |
| <b>F1 ISOL</b>   | 0.83 | 0.84ab | 0.88a  | 0.89ab  | 0.60b  | 0.35ab | 0.46ab | 0.44ab |
| <b>F2 Bt</b>     | 0.84 | 0.74ab | 0.78b  | 0.82b   | 0.50c  | 0.32b  | 0.32c  | 0.31c  |
| <b>F2 ISOL</b>   | 0.87 | 0.67b  | 0.78b  | 0.85b   | 0.56bc | 0.26bc | 0.25c  | 0.24c  |

<sup>1</sup> Valores seguidos por letras distintas foram diferentes segundo o teste da mediana ( $p < 0,05$ )

DG – Dias para a germinação; SG – número de sementes germinadas por cova; DF – dias para o florescimento; DC – dias para a abertura do primeiro capulho; AM – altura na maturação; CP – capulhos por planta; SC – sementes por capulho; SP – sementes por planta.

Como o período de chuvas no semi-árido é curto e irregular, os indivíduos mais adaptados são aqueles que florescem ou abrem seus capulhos mais precocemente. O florescimento ocorreu mais cedo nos algodoeiros herbáceos, DP 404 BG (53 dias) e DP 4049 (58 dias), e nos híbridos  $F_1$  (53 a 54 dias), que nas populações  $F_2$  em média (59 ou 60 dias); todas as populações apresentaram um número de dias para o florescimento significativamente mais baixo que os barbadenses, que floresceram aos cerca de 113 dias (Tabela 5). Da mesma forma, quando comparadas as adaptabilidades médias (Tabela 6), os herbáceos e híbridos apresentaram valores maiores que as  $F_2$ , e estas que os barbadenses.

Em relação ao número de dias para abertura do primeiro capulho (Tabelas 5 e 6), os indivíduos herbáceos foram os que apresentaram as maiores taxas de adaptabilidade relativa, quando comparados com as adaptabilidades médias das populações  $F_2$  derivadas dos cruzamentos com DP 404 BG ou DP 4049, que por sua vez foram mais precoces que os barbadenses. As duas populações de híbridos  $F_1$  foram intermediários quanto ao número de dias para abertura do primeiro capulho entre herbáceos e as médias obtidas pelas populações  $F_2$ ; entretanto, capulhos dos híbridos  $F_1$  abriram mais cedo (Tabela 5) e com maiores valores de adaptabilidade (Tabela 6) que os barbadenses. Aparentemente há efeito de dominância dos locos que controlam o número de dias para o florescimento e abertura do primeiro capulho, sendo precocidade dominante.

As plantas mais altas na maturação eram os barbadenses (com aproximadamente 2,2m), como mostrados na Tabela 5. As populações  $F_1$  foram significativamente mais baixas (com 1,6m e 1,5m), que não diferenciaram-se das médias das alturas das populações  $F_2$  (1,3m e 1,4m). Os algodoeiros herbáceos foram os mais baixos, com 1,0m o DP 404 BG e 0,7m o DP 4049. Ainda que para o cultivo o porte baixo seja considerado vantajoso, principalmente por facilitar a colheita, o algodoeiro barbadense vem sendo mantido principalmente em quintais (ALMEIDA, 2007). Para esta finalidade, espera-se que o porte alto seja considerado vantajoso, por caracterizar melhor a espécie barbadense, à qual são atribuídas propriedades medicinais; por isso considerou-se a altura maior uma vantagem adaptativa, atribuindo a ela o maior valor, como mostra a Tabela 6.

A quantidade de capulhos produzidos por um indivíduo é um importante componente de produção, por esta razão os maiores valores indicam maiores adaptabilidades. Os híbridos  $F_1$  produziram mais capulhos (médias de 98 e 138,

Tabela 5) que os parentais herbáceos (72 ou 58 capulhos por planta) ou o parental barbadense (19 capulhos por planta). A média do número de capulhos por planta da população  $F_2$  foi ligeiramente menor que  $F_1$  e maior que os pais.

O número de sementes por capulho foi máximo nos algodoeiros herbáceos e mínimo em MT 05 41. As duas populações  $F_2$  foram similares e produziram menos sementes por capulho que os  $F_1$ . O número de sementes por planta é o outro componente de produção de sementes em algodão e por isso, valores mais elevados aumentam a adaptabilidade. Assim, os algodoeiros herbáceos e o genitor MT 05 41 apresentaram os maiores e menores valores de adaptabilidade relativa (Tabelas 5 e 6).

Considerando que a população MT 05 41 é perene e que no primeiro ano a mesma tende a priorizar o crescimento vegetativo, é de se esperar que em anos posteriores haja um aumento na produção de sementes e capulhos assim como na adaptabilidade relativa.

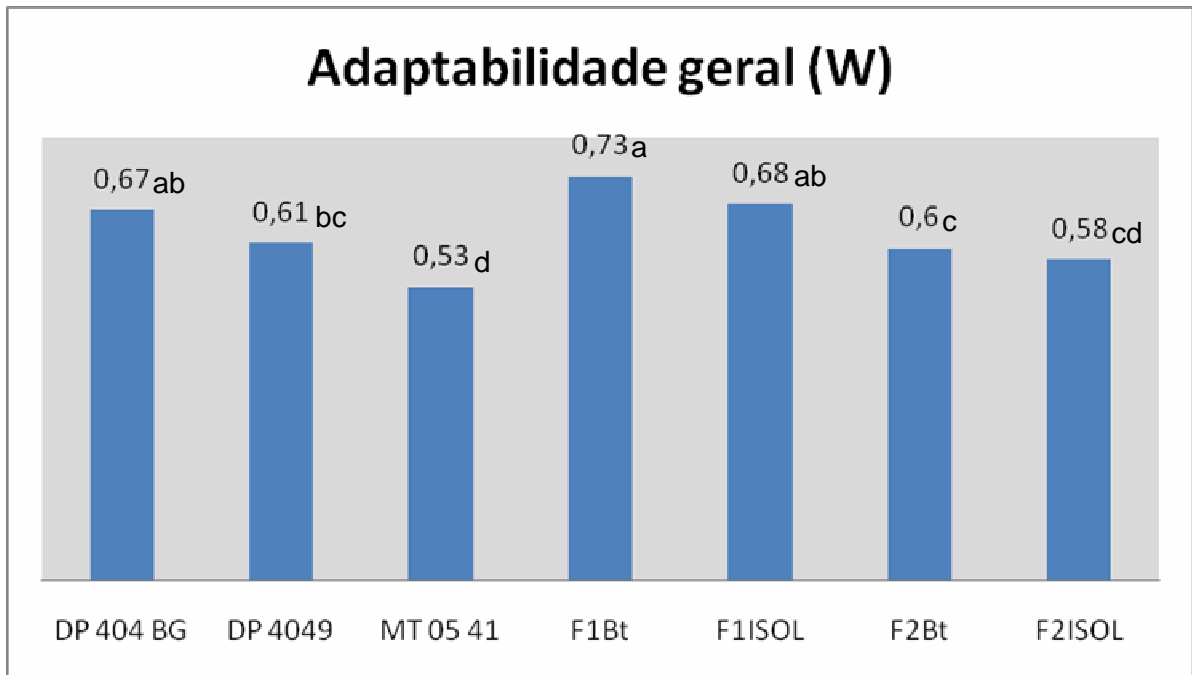
**Tabela 7.** Adaptabilidades relativas para grupos de caracteres e adaptabilidade geral.

|                  | <b>Germinação</b> | <b>Fenologia<br/>Morfologia</b> | <b>Reprodutiva</b> | <b>Geral</b> |
|------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|--------------|
| <b>DP 404 BG</b> | 0.86ab            | 0.73ab                          | 0.43a              | 0.67ab       |
| <b>DP 4049</b>   | 0.84ab            | 0.69bc                          | 0.31bc             | 0.61bc       |
| <b>MT 05 41</b>  | 0.92a             | 0.63c                           | 0.04d              | 0.53d        |
| <b>F1 Bt</b>     | 0.79b             | 0.78a                           | 0.60a              | 0.73a        |
| <b>F1 ISOL</b>   | 0.83ab            | 0.79a                           | 0.42ab             | 0.68ab       |
| <b>F2 Bt</b>     | 0.79b             | 0.70bc                          | 0.32bc             | 0.60c        |
| <b>F2 ISOL</b>   | 0.77b             | 0.73b                           | 0.25c              | 0.58cd       |

<sup>1</sup> Valores seguidos por letras distintas foram diferentes segundo o teste da mediana ( $p < 0,05$ )

A adaptabilidade de MT 05 41 foi a mais alta apenas nos caracteres relacionados à germinação (Tabela 7). Em todos os demais, ela foi mais baixa que os demais. A geração  $F_1$  foi aquela que apresentou as maiores adaptabilidades. A geração  $F_2$  e os algodoeiros herbáceos apresentaram desempenho adaptativo similar.

Os resultados referentes à adaptabilidade geral, apresentados na figura 5 e calculado com base no somatório das adaptabilidades relativas demonstrados na tabela 6, mostram que as populações híbridas  $F_1$  manifestaram valores superiores, porém sem diferenças significativas, em relação as demais populações.



**Figura 5.** Adaptabilidade geral. Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram entre si de acordo com o teste da mediana.

A presença do transgene não afetou o comportamento de nenhuma das gerações. Isto significa que a introgressão do transgene causará pouco impacto na adaptabilidade nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> derivadas de cruzamentos interespecíficos.

## 6. DISCUSSÕES

---

- 6.1 Expressão e herança do gene *cry1ac* em populações interespecíficas
- 6.2 Avaliação de dano das lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*).
- 6.3 Avaliação da adaptabilidade

## 6. DISCUSSÕES

### 6.1 Expressão e herança do gene *cry1Ac* em populações interespecíficas

De acordo como os dados expostos na tabela 4, o gene *cry1Ac* segregou-se mediante Leis Mendelianas de acordo com a proporção 3:1. Tal fato confirma a integração deste gene no genoma nuclear do algodão Bt.

A inserção de um transgene em uma célula pode ocorrer tanto no genoma nuclear quanto nas organelas que portam seu próprio material genético (DANIELL et al., 1998). Caso os eventos de integração do transgene ocorram em um único loco no genoma nuclear, o padrão de herança genético apresentado por este gene, na geração F<sub>2</sub>, obedecerá à segregação mendeliana (SRISTAVA et al., 1996; FELDMANN, et al., 1997). Entretanto, se a integração gênica ocorrer nas mitocôndrias ou nos cloroplastos, o mesmo apenas apresentará herança materna (DANIELL et al., 1998).

A segregação de genes *cry1Ac* em algodão Bt na geração F<sub>2</sub> é um fato normalmente observado, inclusive com o surgimento de possíveis mutantes deletérios (FREIRE, 2002). Para este mesmo autor, cerca de 1,2 a 4,6% da geração F<sub>2</sub> apresentam mutantes deletérios *corky*, fato muito comum em cruzamentos entre *G. hirsutum* e *G. barbadense*. Entretanto, este fato anteriormente descrito esteve ausente neste trabalho. O *corky* teria conferido valores baixos de adaptabilidade caso tivesse ocorrido, mas seria em pequena porcentagem dos genótipos.

Entretanto, como a adaptabilidade é definida como um modelo de previsão capaz de estimar o destino dos híbridos no ambiente (SOBER, 2001), a determinação do padrão de herança do gene *cry1Ac* fornece subsídios valiosos para a compreensão do comportamento dessas populações.

### 6.2 Avaliação de dano das lagartas rosada (*Pectinophora gossypiella*) e curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*).

Os argumentos em favor do algodão Bt, incluem: eficiência no controle de pragas de insetos da ordem Lepdoptera, não causa danos a saúde das pessoas que



cuidam da lavoura, benéfico ao meio ambiente pela redução no uso de defensivos agrícolas tóxicos assim como na preservação da população de artrópodes importantes a esta cultura (GIANESSI & CARPETER, 1999; TABASHINIK et al., 2002).

Diversos fatores ambientais afetam a eficácia do algodão Bt: variações na disponibilidade de nitrogênio (COVIELLA et al., 2002), em temperaturas acima de 37°C (CHEN, et al., 2005), nas concentrações de NaCl (JIANG et al., 2006) e na deficiência ou excesso de água no solo (BENEDICT et al., 1996). Dessa forma, a eficácia do algodão Bt depende dos níveis da expressão dos genes *cry1Ac* e posterior síntese da proteína inseticida (RAO, 2005, GUTIERREZ et al., 2006).

Entretanto, a expressão do gene *cry1Ac* foi suficiente para combater a lagarta rosada e o curuquerê-do-algodoeiro nas populações híbridas, mesmo em face a todos os questionamentos expostos nos parágrafos anteriores. Assim, as oscilações de solo e clima que existiram no local da instalação do experimento permitiram a expressão do gene.

Os híbridos F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> também apresentaram satisfatório controle da praga quando continham o transgene, demonstrando que mesmo na interação com o *background* genético de barbadense, o nível de controle da praga ocorre em mesma intensidade.

Para Dong et al. (2006), o uso extensivo do algodão Bt não demonstrou falhas no controle das pragas alvo nos EUA e China. Entretanto, a eficácia no controle de pragas de Lepdoptera é variável (DONG & LI, 2007). Esta variação está diretamente relacionada ao estágio de vida planta (ADAMCZYK & SUMERFORD, 2001; OLSEN et al., 2005; ABEL & ADAMCZYK, 2004), o tipo e o local do transgene inserido (GORE et al., 2001; GORE & ADAMCZYK, 2004; JACKSON, et al., 2004) e de acordo com determinadas condições ambientais (MAHON et al., 2002).

Embora as plantas geneticamente modificadas tenham se mostrado resistentes, alguns capulhos foram atacados pela praga. Um pequeno dano causado por *Alabama argillacea* também ocorre em plantas Bt a campo, pois presença de estruturas reprodutivas de plantas geneticamente modificadas contendo o gene *cry1Ac* atacadas por lagarta rosada foi descrita por diversos autores (WAN et al., 2004; HENNEBERRY et al., 2003; SANTOS, 2002). Os níveis de ataque relatados tanto nas plantas convencionais sem o tratamento com inseticida quanto nas

transgênicas foram similares aos observados no presente estudo, e os danos que ocorrem podem não causar qualquer tipo de queda na produção.

Em expedições realizadas pela Embrapa Algodão, visando a caracterização *in situ* de populações de *G. barbadense* no estados de Mato Grosso, constatou-se que o maior problema fitossanitário observado foi a infestação por lagarta rosada, *Pectinophora gossypiella*, visto que muitas plantas apresentaram a maioria das sementes danificadas (BARROSO et al., 2005a).

Todas as populações contendo o gene foram resistentes à lagarta, mas não os controles, demonstrando claramente a natureza da ação do gene *cry1Ac*, que apesar do ataque dessa praga às plantas transgênicas, o mesmo se deu de forma incipiente.

Considerando que o surto de curuquerê ocorreu no final do ciclo e que a literatura descreve que os níveis da toxina são menores neste período (ADAMCZYK & SUMERFORD, 2001) é provável que as plantas sejam resistentes durante todas as fases do seu desenvolvimento.

As diferenças entre a cultivar transgênica (DP 404 BG) e a isolinha (DP 4049) podem dever-se mais a diferenças genéticas entre elas que aos transgene em si, uma vez que a transgenia foi obtida pela transformação da variedade Coker 312, que é mais adaptável a cultura de tecidos, e o evento introduzido por retrocruzamentos para a cultivar promissora para plantio (ANDOW et al., 2006).

### 6.3 Avaliação da adaptabilidade

A introdução de organismos transgênicos em diferentes países trouxe como uma das principais questões de biossegurança a presença de parentes silvestres de seu *pool* gênico primário, para os quais não haja barreiras de cruzamento. Se a hibridação pode ocorrer, é provável que ocorra (ELLSTRAND, 1999), trazendo o risco de os híbridos ou seus descendentes, com introgressão do transgene, superem seus pais. Em um trabalho desenvolvido com duas espécies de *Raphanus* na Califórnia, embora não envolvendo transgenes, demonstrou-se que híbridos com capacidade adaptativa maior que seus pais podem competir com estes inclusive extinguindo-os (HEDGE et al., 2006). Assim, a mensuração da adaptabilidade de híbridos interespecíficos é extremamente valiosa, pois permite prever o destino

desses híbridos em seu ambiente natural, e permite a inclusão de questões de biossegurança quando envolve o efeito da hibridação com organismos transgênicos (ARRIOLA & ELLSTRAND, 1996).

Para estimar a adaptabilidade é muito importante a seleção de características associadas com o crescimento vegetativo e a reprodução, pois as mesmas podem revelar o potencial competitivo e reprodutivo dos indivíduos em questão (ARRIOLA & ELLSTRAND, 1997). *Gossypium barbadense* não ocorre em ambientes naturais, sendo mais frequentemente encontrado em plantios em quintais, devido a seu valor medicinal (ALBRANA, 2009; ALMEIDA, 2007; BARROSO et al., 2005a).

Neste trabalho com algodão, selecionaram-se a altura da planta como característica morfológica, que pode estar mais relacionada à competição, sendo a área radicular muito difícil de avaliar em um trabalho de campo. A precocidade de floração e maturação dos capulhos são importantes habilidades, pois plantas mais precoces têm maior chance de produzir sementes em caso de posterior situação ambiental adversa, sendo as mais importantes a falta de água e presença de pragas.

A dormência é uma importante ferramenta adaptativa influenciando assim a adaptabilidade dos genótipos no seu habitat (OARD et al., 2000; SONG et al., 2004). Os algodoeiros herbáceos e barbadenses não diferiram entre si quanto às taxas de germinação ou dias para germinação, tampouco os híbridos.

Em relação à quantidade de sementes produzidas por planta, ambas os híbridos  $F_1$  foram superiores aos seus respectivos pais. Portanto, podem produzir o maior número de descendentes, aumentando com isso suas condições de propagação no ambiente. A grande quantidade de sementes assim como as maiores taxas de adaptabilidade relativa apresentadas pelos dois híbridos  $F_1$  demonstra a fragilidade das barreiras para a introgressão dos genes parentais nos híbridos  $F_1$  (BURKE & ARNOLD, 2001). Este último fato foi também observado em outros estudos semelhantes, porém com outras espécies, como arroz (SONG et al., 2004) e girassol (SNOW et al., 1998). Tal fato é ainda sustentado pela superior adaptabilidade relativa apresentada pela geração  $F_1$  em relação ao parâmetro quantidade de capulhos por planta, uma vez que os híbridos em questão demonstraram adaptabilidade relativa superior a seus respectivos pais.

Existe um efeito de adaptabilidade dos híbridos devido a interação dos genomas das duas diferentes espécies. Quanto aos caracteres reprodutivos os

híbridos superam ambos os pais, o que faz com que haja maior risco de serem selecionados em detrimento dos barbadenses pelas pessoas que os cultivam em quintais. Estratégias adequadas para a manutenção da pureza genética *in situ* não podem abranger apenas medidas que restrinjam as fecundações cruzadas com algodoeiros geneticamente modificados resistentes a lagartas. As medidas só serão efetivas caso o cruzamento com quaisquer genótipos de algodoeiro forem restringidos.

A razão para a baixa adaptabilidade de *G. barbadense* verificada decorre de suas características genéticas em interação com o ambiente onde foi realizado o experimento. O clima semi-árido sob irrigação, como foi feito neste experimento e frequentemente é praticado em quintais, parece ser bastante adequado para o experimento. Plantas de *G. barbadense* são mantidas em fundos de quintal por todo o Semi-Árido do Nordeste brasileiro (ALBRANA, 2009)

Embora o algodoeiro herbáceo seja cultivado como planta anual, ele, como o barbadense, é uma planta perene (SMITH & COTHREN, 1999). No experimento aqui relatado, após a total maturação e aberturas dos capulhos do algodoeiro herbáceo, um período de chuva fez com que aparecessem novas folhas. O fato de o algodão ser perene faz com que seja necessário definir um período em que se mensura o número de sementes produzidas, e a produção de fibra no primeiro ano parece ser importante para a escolha da planta como ornamental ou para uso para pavo de lamparina. Pouco menos que 40% das plantas de barbadense localizadas no Pará e no Amapá tinham até um ano de idade (ALMEIDA, 2007).

Os resultados e conclusões somente devem ser válidos para localidades com condições ambientais e nível de infestação com insetos alvo do gene *cry1Ac* forem similares às existentes.

A adaptabilidade geral, calculada com base em todos os caracteres avaliados, exceto resistência a lagartas, mostrou que as populações híbridas F<sub>1</sub> manifestaram valores superiores, porém sem diferenças significativas, em relação aos pais. Considerando o papel criativo do fluxo gênico em introduzir novos caracteres, aumentando a variabilidade genética dos indivíduos dentro de uma população (HENDRICK, 2005), pode-se afirmar que, em condições de clima, solo, e pressão de seleção semelhantes aos apresentados neste trabalho, o transgene não alterou significativamente o potencial adaptativo das plantas transgênicas. Nas primeiras gerações, a hibridação introduz um número muito maior de genes, o que reflete em

efeitos de adaptação também maiores. Outros estudos semelhantes de adaptabilidade afirmam que os híbridos não demonstram inferioridade ou superioridade em comparação com suas espécies parentais (SONG et al., 2004; ARNOLD & HODGES, 1995).

## **7. CONCLUSÕES**

---

## 7. CONCLUSÕES

O gene *cry1Ac* integrado ao genoma da população F<sub>2</sub> de *G. barbadense* se expressou de modo estável e mendelianamente;

A eficácia da proteína Cry1Ac se manteve dentro do esperado mediante dados de literatura competente em híbridos F<sub>1</sub> e população F<sub>2</sub> de *G. barbadense*;

A presença do gene *cry1Ac* não alterou significativamente a adaptabilidade dos híbridos F<sub>1</sub> e da população F<sub>2</sub> de *G. barbadense* sob as condições ambientais e evolutivas manifestadas;

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abbott, R. J.** (1992) Plant invasion, interspecific hybridization and the evolution of plant taxa. *Trends in Ecology & Evolution*, 7: 401-405.

**Abel, C. A. & Adamczyk, J. J.** (2004) Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera Crambidae) on maize whorl leaf profiles. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1737-1744.

**Adams, K.L. & Wendel, J.F.** (2004). Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 573-581.

**Adamczyk, J. J. & Sumerford, D. V.** (2001) Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard cotton. *Journal of Insect Science*, 1: 1-6.

**Agbios** (2009). Banco de dados: MONØØ531-6, MONØØ757-7 (MON531/757/1-76). Essential biosafety crop data base, Agbios, Merrickville, Canada. <http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=15>. Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

**Akin, D.S.; Steward, S.D.; Kinghten, K.S. & Adamczyk, J.J.** (2002) Quantification of toxin levels in cotton expressing one and two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the 2002 Beltwide Cotton Conferences. National Cotton Council, Memphis, Tennessee. Disponível em <http://www.cotton.org/beltwide>. Acesso em Novembro de 2008.

**Almeida, V.C.** (2007) Caracterização genética e *in situ* de *Gossypium barbadense* na região norte do Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

**Albrana – Algodoeiros Brasileiros Nativos e Naturalizados** (2009). Disponível em <https://www.cnpa.embrapa.br/albrana/>. Acesso em Fevereiro de 2009.

**Anderson, E.** (1949) Introgressive hybridization. Wiley & Sons, New York.

**Andow D.A.; Barroso, P.A.V.; Fontes, E.M.G.; Grossi-de Sá, M.F.; Hilbeck, A. & Fitt, G.P.** (2006) Improving the scientific basis for environmental risk assessment through the case study of Bt cotton in Brazil. In: Environmental risks assessment of genetically modified organisms (Hilbeck, A., Andow, D.A. & Fontes, E.M.G. Eds). Vol2: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. CAB International, Wallingford, Uk, pp 1-20.

**Arriola P.E. & Ellstrand N.C.** (1996) Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halapense*, and crop sorghum, *S. bicolor*. *American Journal of Botany* 83:1153-1160.

**Arriola P.E & Ellstrand N.C.** (1997) Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: persistence of crop genes in wild populations. *Ecological Applications* 7: 521-528.

**Arias, D.M., & L.H. Rieseberg.** (1994) Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theoretical and Applied Genetics*, 89:655-660.

**Arnold, M.L. & Hodes, S.A.** (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their hybrids?. *Trends in Ecology and Evolution*, 10:67-71.

**Barroso, P.A.V.; Costa, J.N.; Ciampi, A. Y, Rangel, L.P. & Hoffmann, L.V.** (2005a) Caracterização *in situ* de populações de *Gossypium barbadense* do estado do Mato Grosso. Embrapa Algodão. Campina Grande. 8p (Comunicado Técnico nº 244)

**Barroso, P.A.V; Freire, E.C.; Amaral, J.A.B. & Silva, T.A.** (2005b) Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas. Embrapa Algodão. Campina Grande, 7p (Comunicado Técnico nº 242).

**Benedict, J. H.; Sachs, E. S.; Altman, D. W.; Deaton, W. R.; Kohel, R. J. & Berberich, S. A.** (1996) Field performance of cottons expressing transgenic Cry1A insecticidal proteins for resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 89:230-238.

**Bobrowski, V.L., Fiuza, L.M., Pasquali, G. & Bodanese-Zanettini, M.A.** (2003) Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, 34(1): 834-850.

**Borem, A.** (2002) Escape gênico & transgênicos. Editora Suprema, Viçosa. V. 1, pp 206.

**Boulanger, J. & Pinheiro, D.** (1972) Consequências genéticas da evolução da cultura algodoeira do nordeste do Brasil. *Pesquisa Agropecuária no Nordeste*, 4: 45-52

**Brubaker, C. L.; Bourland, F. M. & Wendel, J. F.** (1999) The origin and domestication of cotton. In: *Origin, history, technology and production* (Smith, C.W.; Cothen, J.T.eds). John Wiley e Sons, New York, pp.23-32.

**Burke, J. M. & Arnold, M. L.** (2001). Genetics and fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics*. 35: 31-52.

**Burke J.M. & Rieseberg L.H.** (2003) Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300: 1250.

**Chen, D.; Ye, G.; Yang, C.; Chen, Y. & Wu, Y.** (2005) The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. *Environmental and Experimental Botany*. 53:333-340.

**Conner, A.J., Glare, T.R. & Nap, J.P.** (2003). The release of genetically modified crops into environment. Part II. Overview of ecological risks assessment. *The Plant Journal*, 33(1): 19-46.

**Colbach, N., Molinari, N. & Clermont-Dauphin, C.** (2004) Sensitivity analyses for a mode simulation demography and genotype evolutions with time. *Ecological Modeling*, 179: 91-113.

**Coviella, C. E.; Stipanovic, R. D. & Trumble, J. T.** (2002) Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen in transgenic cotton plants. *Journal of Experimental Botany*, 53:323-331.

**Dale, P., Clarke, B. & Fontes, E.** (2002). Potential for environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology*, 20: 567-574.

**Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S & Lee, S.B.** (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology*, 16:345-348.

**Dong, H. Z.; Li, W. J.; Zhang, D. M.; Tang, W.; Zhang, D. M. & Li, Z. H.** (2006) Effects of genotypes and variability in Bt Cotton Efficacy 27 plant density on yield, yield components and photosynthesis in Bt transgenic cotton. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 192:132-139.

**Dong, H. Z. & Li, W. J.** (2007) Variability of Endotoxin Expression in Bt Transgenic Cotton. *Journal of Agronomy & Crop Science* 193, 21-29.

**Edge, J.M., Benedict, J.H. & Carroll, J.C.** (2000) Bollgard® cotton: An assessment of global economic; environmental, and social benefits. Report Fleisman-Hilland Inc. Kansas City, pp 24.

**Ellstrand N.C., Prentice, H.C. & Hancock, J.F.** (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 30: 539-563.

**Ellstrand, N.C.** (2003) Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 358: 1163-1170.

**Ellstrand N.C & Holfman, C.A.** (1990). Hybridization as an avenue of scape for engineered genes. *BioScience*. 40: 438-442.

**Ellstrand, N.C. & Schierenbeck, K.A.** (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97: 7043-7078.

**Feldmann, K.A., Cory, D.A. & Christianson, M.L.** (1997) Exceptional segregation of a selectable marker (KanR) in *Arabidopsis* identifies genes important for gametophytic growth and development. *Genetics*, 147: 1411-1422.

**Ferreira Filho, J.B.S. & Gameiro, A. H.** (2002) Avaliação econômica do algodão Bollgard® no Brasil. XL Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 28 a 31 de Julho 2002, Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, Passo Fundo, RS, Brasil, 1-20.

**Ferris, M. A. & Milton, J. B.** (1984). Population density, outcrossing rate and heterozygote superiority in *Ponderosa pina*. *Evolution*. 38: 1551-1554.

**Freire, E. C.**(2000). Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, (Comunicado Técnico: 78).

**Freire, E. C., Barroso, P. A. V., Penna, J. C. V. & Borém, A.**( 2002). Fluxo Gênico: Análise do caso de Algodão no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 29: 104-113. Disponível na Internet. [www.biotecnologia.com.br](http://www.biotecnologia.com.br). Acesso em Outubro de 2007.

**Freire, E.C.** (2002) Viabilidade de cruzamentos entre algodoeiros transgênicos e comerciais silvestres do Brasil. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, 6(1): 465-470.

**Fryxcell, P.A.** (1968). A redefinition of tribe Gossypieae. *Botanical Gazette*, 129: 296-308.

**Fryxcell, P.A.** (1992). A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rhedeia*, 2: 108-165.

**Gianessi, L.P. & Carpeter. J.E.** (1999) Agricultural biotechnology: Insect control benefits. National Center for Agricultural Policy, Washington DC.

**Gore, J.; Leonard, B. & Adamczyk, J. J.**(2001) Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) survival on Bollgard and Bollgard II cotton flower bud and flower components. *Journal of Economic Entomology*, 94:1445-1451.

**Gore, J. & Adamczyk, J. J.** (2004) Impact of bollworm, *Helicoverpa Zea* (Boddie), on maturity and yields of Bollgard and Bollgard II cottons. *Journal of Cotton Science*, 8:223-229.

**Grossi-de-Sá, M.F., Lucena, W., Souza, M.L., Nepomuceno, A.L., Osir, E.O., Amugune, N., Hoa, T.T.C., Hai, T.N.H., Somers, D.A. & Romano, E.** (2006). Transgene expression and locus structure of Bt cotton. In: Environmental risks assessment of genetically modified organisms (Hilbeck, A., Andow, D.A. & Fontes, E.M.G. Eds). Vol2: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. CAB International, Wallingford, UK, pp. 93-107.

**Gutierrez, A. P.; Adamczyk, J. J.; Ponsard, S. & Ellis, C. K.** (2006) Physiologically based demographics of Bt cotton-pest interactions II. Temporal refuges, natural enemy interactions. *Ecological Modeling*, 191:360-382.

**Hedge, S.G; Nason, J.D.; Clegg, J.M. & Ellstrand, N.C.** (2006). The evolution of California wild radish has resulted in the extinction of its progenitors. *Evolution*, 60(6): 1187-1197.

**Hedrick, P.W.** (2005) Genetics of populations. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.

**Henneberry, T. J.; Forlow Jech, L.; de la Torre, T.; Maurer, J.** (2002) Cry1Ac Toxic Protein in Overwintered Volunteer and Annual Seeded NUCOTN 33B7 (Bt) and Deltapine (DPL) 5415 Cottons: Effects on Pink Bollworm (PBW) and Tobacco Budworm (TBW) Larval Mortalities. 2003 Arizona Cotton Report, The University of Arizona College of Agriculture and Life Sciences, (disponível em <http://cals.arizona.edu/pubs/crops/az1312> acesso em janeiro de 2009)

**Hoofman, D. A. P.; Oostermeijer, J. G. B.; Jacobs, M. M. J.; Den Nijs, H. C. M.** (2005) Demographic vital rates determine the performance advantage of crop-wild hybrids in lettuce. *Journal of Applied Ecology*, 42:1086-1095.

**Jackson, R. E.; Bradley Jr, J. R.; Van Duyn, J. W. & F. Gould, F.** (2004) Comparative production of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) from transgenic cotton expressing either one or two *Bacillus thuringiensis* proteins with and without insecticide oversprays. *Journal of Economic Entomology*, 97:1719-1725.

**Jiang, C. X.; Chee, P.W.; Draye, X. Morrell, P.L. C.; Smith, C. W. & Paterson, A. H.** (2000) Multilocus interactions restrict gene introgression in interspecific populations of polyploid *Gossypium* (cotton). *Evolution*, 54(3): 798-814.

**Jiang, L.; Duan, L.; Tian, X.; Wang, B.; Zhang, H. & Li, Z.** (2006) NaCl salinity stress decreased *Bacillus thuringiensis* (Bt) protein content of transgenic Bt cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 55:315-320.

**Joly, A.B.** (1991) Botânica: introdução a taxonomia vegetal. 10ª Ed. Editora Nacional, São Paulo.

**Kiang, Y. T., Antonovics, J. & Wu, L.** (1979) The extinction of wild rice (*Oryza perennis formosana*) in Taiwan. *Journal of Asian Ecology*, 1: 1-9.

**Klinger, T. & Ellstrand, N. C.** (1999). Transgenic movement via gene flow: Recommendations for improved biosafety assessment. In: Methods for risk assessment of transgenic plants III (Ammann, K, et. al. ed). Birkhäuser Verlag, Basel, pp 129-140.

**Köning, A.,** (2003). A framework for designing transgenic crops-science, safety, and citizens concerns. *Nature Biotechnology*, 21: 1274-1279  
**Manasse, R. S.** (1992). Ecological risks of transgenic plants: Effects of spatial dispersion on gene flow. *Ecological Applications*, 2: 431-438.

**Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Noteborn, H.P.J. & Kok, E.J.** (2001). Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*, 27: 503-528.

**Mahon, R.; Finnergan, J.; Olsen, K. & Lawrence, L.** (2002) Environmental stress and the efficacy of Bt cotton. *Australian Cottongrower* 22:18-21.

• **Matus-Cádiz, M. A.; Hucl, P.; Horak, M. J. & Blomquist, L. K.** (2004) Gene flow in wheat at the field scale. *Crop Science*, 44: 718-727.

**Messeguer J.; Fogher, C.; Guiderdoni, E.; Marfa V.; Catala, M.M.; Baldi, G. & Mele, E.** (2001) Field assessment of gene flow from transgenic to cultivated rices (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance genes as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1151–1159.

**Mongeló, L.A.S.** (2001) *Genética de populações*. Ed. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

**Moresco, E.R.** (2003). *Progresso genético no melhoramento do algodoeiro no estado do Mato Grosso*. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 91p.

**Oard, J.; Cohn, M.A.; Linscombe, S.; Gearly, D. & Gravois, K.** (2000) Field evaluation of seed production, shattering and dormancy in hybrids populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). *Plant science*, 157:13-22.

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

**CTNBio** (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) (2005) Extrato de parecer técnico nº 513/2005.

**Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, G.T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greeplate, J.T. & Fischhoff, D.A.** (1990). Insert resistant cotton plants. *Biotechnology*, 8: 939-943.

**Rao, C. K.** (2005) *Transgenic Bt Technology: 3. Expression of Transgenes*. Disponível em: <http://www.monsanto.co.uk/news/ukshowlib.phtml?uid=9304> (Acesso em novembro de 2007).

**Riesenberg, L.H.** (1997). Hybrid origin of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 28: 358-389.

**Rieseberg, L. H. & Wendel, J. F.** (1993). *Hybrid zones and the evolutionary processes*. Oxford University Press, New York.

**Santos, W.J.** (2002) Estudo da eficiência do algodão Bollgard para o controle do curuquerê (*Alabama argillacea*), lagarta das maçãs (*Heliothis virescens*) e lagarta

rosada (*Pectinophora gossypiella*). Anais do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia.

**Senchina, D.S., Alvarez, I., Cronn, R.C., Liu, B., Rong, I., Noyes, R.D., Peterson, A.H., Wing, R.A. & Wendel, J.F.** (1999). Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. *Molecular Biology and Evolution*, 20:633-643.

**Smith, C.W. & Cothren, J.T.** (1999) COTTON Origin, History, Technology, and Production. John Wiley & c Sons, New York.

**Snow, A.A.; Norah-Palma, P.; Rieseberg, L.H.; Wszelaki, A. & Seiler, G.L.** (1998) Fecundity, phenology and seed dormancy of F<sub>1</sub> wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *American Journal of Botany*, 85:794-801.

**Soares, J.L.** (1993) Dicionário etimológico e circunstanciado de biologia. Editora Scipione, São Paulo.

**Sober, E.** (2001) The two faces of fitness. In: Thinking about Evolution: Historical, Philosophical, and Political Perspectives (Singh, R.; Paul, D.; Krimbas, C. & J. Beatty eds.) Cambridge University Press, Cambridge.

**Song, Z. P., LU, B., Wang, B & Chen, J.K.** (2004) Fitness estimation through performance comparison of F<sub>1</sub> Hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Annals of Botany*, 93: 311-316.

**Sristava, V., Vasil, V & Vasil, I.K.** (1996) Molecular characterization of the fate transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 1031-1037.

**Stebbins, G.L.** (1958) Inviability, weakness and sterility of interespecific of hybrids. *Advances in Genetics*, 9: 147-215.

**Stephens, S. C.** (1973) Geographical distribution of cultivated cotton relative to probable centers of domestication in the new world. In: Genes, enzymes, and populations (Adrian, M.S. ed). Plenum Press, New York, pp 239-254.

**Stewart, C.N., Halfhill, M.D & Warwick, S.I.** (2003). Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature*. 4: 806-817.

**Sujji, E.R., Lövei, G.L., Sétamou, M., Silvie, P., Fernandes, M.G., Dubois, G.S.J & Almeida, R.P.** (2006). Non-target and biodiversity impact on non-target herbivorous pests. In: Environmental risks Assessment of genetically modified organisms (Hilbeck, A., Andow, D.A. & Fontes E.M.G. eds). Vol2: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. CAB Internatinal, Wallingford, UK, pp. 133-154.

**Tabashnik, B. E.; Dennehy, T. J.; Sims, M. A.; Larkin, K.; Head, G. P.; Moar, W. J. & Carriere, Y.** (2002) Control of resistant pink bollworm that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3790-3794.

**Trewavas, A., & Leaver, C.** (2001). Is opposition to GM crops science or politics? An investigation into arguments that GM crops pose a particular threat to the environment. *European Molecular Biology Organization Reports*, 2: 455-459.

**Ulloa, M.; Meredith Jr, W.R. & Shappley, Z.W.** (2002) RFLP genetic linkage maps from four F2.3 populations and a joinmap of *Gossypium hirsutum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 200-208.

**Vieira, S.** (2003) *Bioestatística: tópicos avançados*. Editora Campus, Rio de Janeiro.

**Wan, P., Wu, K., Huang, M., Wu, J.** (2004) Seasonal pattern of infestation by pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) in field plots of Bt transgenic cotton in the Yangtze River valley of China. *Crop Protection*, 23: 463–467

**Warwick, S.I., Légère, A., Simard, M.J. & James, T.** (2007) Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology*.

**Wendel JF.** (1989) New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 4132–4136.

**Wendel, J.F. & Cronn, R.C.** (2003). Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Advances in Agronomy*, 78: 139-186.

**Wilkinson, M.J., Sweet, J. & Poppy, G.M.** (2003). Risks assessment of GM plants: avoiding gridlock? *Trends in Plant Science*, 8: 208-212.



