



Audiência Pública

Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23
WideStrike*
Processo CTNBio nº 01200.005322/2006-55

1. Introdução
2. Algodoeiro no Brasil
3. Aspectos botânicos
4. Importância das pragas na cultura do algodoeiro
5. Elementos genéticos presentes na construção do algodão evento 281-24-236/3006-210-23
6. Desenvolvimento do evento 281-24-236/3006-210-23
7. Eficácia do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23
8. Segurança Alimentar
9. Segurança Ambiental do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23
10. Manejo de Resistência de Insetos (MRI)
11. Benefícios do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 no Brasil
12. Conclusão
13. Referências

1-Introdução

A Dow AgroSciences Industrial Ltda (Dow AgroSciences ou DAS) submeteu uma petição à CTNBio, processo nº 01200.005322/2006-55, para liberação comercial de uma linhagem de algodão com ambos os eventos 281-24-236 (OECD identifier number DAS 24236-5), doravante referido como Cry1F, *Bacillus thuringiensis* (B.t.), Cry1F (synpro), protoxina sintética Cry1F, e 3006-210-23 (OECD identifier number DAS 21023-5), doravante referido como Cry1Ac, *Bacillus thuringiensis* (B.t.), Cry1Ac (synpro), protoxina sintética Cry1Ac.

A Dow AgroSciences desenvolveu plantas de algodão que contêm o gene *cry1F* (synpro), doravante referido como *cry1F* e o gene *cry1Ac* (synpro), doravante referido como *cry1Ac*, genes codificadores de proteínas inseticidas, que incorporados às plantas controlam efetivamente algumas pragas do algodoeiro, como as lagartas da maçã (*Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*), o curuquerê do algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), com controle adicional de outras pragas da ordem Lepidóptera como Lagarta Militar da Beterraba, *Spodoptera exigua* (Hubner); Lagarta Militar do Sul, *Spodoptera eridania* (Stoll); Lagarta do Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith); Curuquerê da Soja, *Pseudoplusia includens* (Walker); e Curuquerê da Couve, *Trichoplusia ni* (Hubner).

Os tecidos dessas plantas de algodão foram geneticamente modificados, via técnicas de DNA recombinante (rDNA), para expressar duas proteínas inseticidas cristalizadas, também referidas como delta-endotoxinas, provenientes de *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* cepa PS811 e de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD73. Dados de segurança obtidos experimentalmente demonstram a ausência de toxidez a humanos e aos animais vertebrados, e ausência de efeitos adversos a organismos não-alvo e ao ambiente.

Além dos genes *cry1F* e *cry1Ac*, o gene *pat*, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT), que confere tolerância ao glufosinato de amônio, também está presente no eventos 281-24-236 e 3006-210-23 como um gene marcador para seleção. O gene *pat* é uma versão sintética baseada no gene *pat* natural de *Streptomyces viridochromogenes*, uma bactéria não patogênica, encontrada no solo. A inclusão do gene *pat* possibilita a seleção de plantas de transformados bem sucedidos que expressam as proteínas Cry1F e Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*. A proteína PAT não confere atividade pesticida e não há efeito adverso conhecido ao ambiente ou ao homem, como toxicidez ou alergenicidade. Os genes *cry1F* e *pat* estão ligados no mesmo vetor de transformação, pAGM281 e os genes *cry1Ac* e *pat* estão ligados no mesmo vetor de transformação, pMYC3006. Ambos foram inseridos nas plantas de algodão via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* desarmado.

Décadas de experimentação testando proteínas B.t. demonstram a ausência de toxidez ao homem e aos animais vertebrados e a ausência de efeitos adversos a organismos não-alvo e ao ambiente. Os eventos de algodão 281-24-236 e 3006-210-23 foram testados a campo em 1999, 2000, 2001, 2002, sendo avaliados até hoje nas principais regiões de cultivo de algodão nos Estados Unidos, em Porto Rico, Argentina, Austrália, México, Espanha e China. Experimentos no Brasil pela Dow AgroSciences foram conduzidos na safra 2005/6 e 2006/7 em suas unidades operativas de Rio Verde-GO, Indianópolis-MG, Jardinópolis-SP e Mogi Mirim-SP.

O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 teve nos EUA o registro aprovado para cultivo em 2004. No México teve a aprovação para importação como alimento em 2004. No Canadá a importação para alimento e alimentação animal foram aprovadas em 2005. No Japão a importação foi aprovada em 2006 para alimento, alimentação animal e para o meio ambiente. Para a Coreia e Austrália a importação aprovada para alimento ocorreu em 2005.

Dados e informações relacionadas com características agronômicas, características de resistência a pragas e doenças foram coletadas durante esses testes e, são aqui apresentados, juntamente com análises de laboratório, relatos e referências da literatura. Estas informações e dados experimentais obtidos demonstram que os eventos 281-24-236 e 3006-210-23 não exibem propriedades patogênicas às plantas e não é provável que prejudiquem outros insetos que são benéficos à agricultura. Não se tem nenhuma evidência ou indicação que as proteínas Cry1F e Cry1Ac de B.t. aumentem o potencial do algodoeiro transformado atuar como planta invasora, uma vez que a sua fenologia, morfologia, além de vários outros aspectos agronômicos não foram alterados no algodão transformado. Em resumo, não se tem evidências que plantas de algodão com os eventos 281-24-236 e 3006-210-23 possam se tornar plantas daninhas da agricultura ou invasoras de habitats naturais, tenham efeito adverso sobre espécies não-alvo, incluindo o homem e tenham efeito adverso sobre a biodiversidade

O foco desta petição são os eventos de transformação 281-24-236 e 3006-210-23 que foram reunidos (piramidados) por meio do melhoramento, para produzir linhagens de valor agronômico e industrial com sucesso. Tanto o evento Cry1F, 281-24-236, como o evento Cry1Ac, 3006-210-23, se aprovados, serão comercializados como um produto combinado cujos genes *cry1Ac* e *cry1F* foram colocados juntos por meio do método de retrocruzamentos num programa de melhoramento convencional. Cultivares de algodão contendo as duas proteínas, Cry1Ac e Cry1F são comercializados nos EUA como WideStrike[®], marca registrada da Dow AgroSciences LLC.

A liberação do produto combinando as proteínas Cry1Ac e Cry1F, juntamente com as práticas de manejo de resistência a insetos, reduzirão a pressão de seleção para desenvolvimento de resistência a inseticidas e ajudarão a manter uma gama de opções efetivas de controle de lepidópteros à disposição dos produtores de algodão do Brasil.

O presente documento trata dos principais pontos de biossegurança do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23, complementado com novos dados de pesquisas coletados nas unidades operativas da Dow AgroSciences no Brasil.

2-Algodoeiro no Brasil

- **Importância econômica**

Os algodoeiros são plantas notáveis em seus aspectos utilitários os quais incluem fibras fiáveis e sementes oleaginosas e protéicas usadas na alimentação animal e humana. Suas espécies foram melhoradas pelo homem desde a antiguidade tanto no Velho quanto no Novo Mundo e na atualidade grandes progressos foram alcançados pelo melhoramento genético. O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), é uma das quatro espécies cultivadas no mundo para a produção da fibra de algodão (Penna, 2005) e é explorada economicamente numa ampla faixa tropical e em algumas regiões subtropicais,

estendendo-se o seu cultivo entre 47° N (Ucrânia, Cazaquistão e Uzbesquistão) e 32° S (Austrália e Argentina) (Penna, 2005). Atualmente a produção mundial está estimada em aproximadamente 114 milhões de fardos (2005/2006) e o consumo de aproximadamente 116 milhões de fardos (King Cotton Magazine, 2005). No ano 2000, o consumo mundial de fibras, era assim distribuído: fibra natural: 45% e fibra artificial: 55%. O algodão representa uma das grandes fontes de divisas para o Brasil. Na comercialização da produção atual de algodão em pluma estão envolvidos mais de 4 bilhões de reais, apenas com a pluma, O valor do caroço correspondente é de 700 milhões de reais, totalizando aproximadamente 3,7 bilhões de reais. A cultura do algodão é, dentre as anuais, a que mais emprega mão-de-obra. Nas usinas de beneficiamentos e na indústria de fiação e tecelagem são criados milhares de empregos diretos e indiretos. Estima-se que a cadeia produtiva da cultura empregue cerca de 10 milhões de empregos anuais, sendo 2,5 milhões diretamente no campo. Estes números têm diminuído em função das grandes transformações tecnológicas pelas quais a cultura tem passado recentemente. Nos EUA, para cada 100 ha plantados, a cultura gera no campo, 13 empregos: 9 permanentes e 4 temporários.

A cultura do algodão está entre as dez principais culturas agrícolas do Brasil e ocupa também o sexto lugar mundial em superfície cultivada. A área cultivada com o algodoeiro no Brasil, apresentou declínio considerando-se o período 1970 até a atualidade. A área passou de 4.318.679 ha (1973) para 850.700 em 2005/06 (CONAB, 2006, figura 1\A). A Conab em sua avaliação da safra agrícola 2006/2007 estima que a área a ser plantada será de 1,03 milhões de hectares com aumento de 20,8% em relação à safra anterior.

Figura 1: Evolução das áreas de plantio de algodão no Brasil. Período de 1976 a 2006



Fonte: CONAB – Levantamento: abril/06

Quanto aos rendimentos, culturais para o algodoeiro herbáceo (*Gossypium hirsutum* L.), houve grande incremento nos últimos anos, devido à queda de área plantada

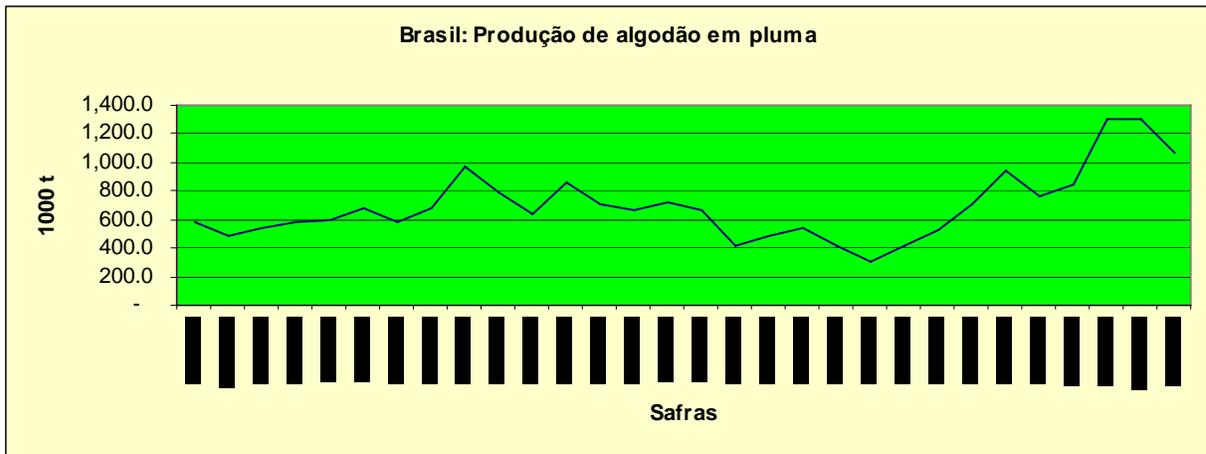
com algodões arbóreos (*Gossypium hirsutum* L. raça *Marie-Galante* ou “Mocó” e formas introgressas com *G. barbadense*) no Nordeste e a adoção de novas tecnologias de produção e a expansão da cultura para o centro-oeste brasileiro. No passado, o algodoeiro Mocó ocupou grandes áreas no vale do Seridó e atualmente a área plantada não ultrapassa 9.000 ha. No Brasil distinguem-se basicamente três regiões produtoras, o Nordeste, o Centro-Oeste e o Sudeste as quais divergem entre si em aspectos climáticos, edáficos e econômico-sociais. A primeira devido à seca e ao baixo uso de tecnologia utilizado em alguns Estados, apresenta rendimentos culturais baixos (entre 370 e 800 kg/ha), mas a média regional é de 2.728 kg de algodão em caroço/ha para 2005/06. Para tal, contribui sobremaneira o Estado da Bahia, cuja área plantada teve crescimento recente e hoje, em 2006, é responsável por 31,9% da produção nacional. A Bahia teve área plantada de 229.700 ha em 2005/06 com produção de 785.600 ton de algodão em caroço, com produtividade de 3.420 kg/ha de algodão em caroço. A Região Centro-Oeste teve área plantada em 2005/06 de 388.100 ha, com produtividade média de 3.567 kg/ha. Caracteriza-se pelo uso de alta tecnologia e clima favorável. Cultiva-se exclusivamente o algodoeiro anual. Nesta região destaca-se o Estado do Mato Grosso, com 356.800 ha cultivados em 2005/06 e produtividade média de 3.630 kg de algodão em caroço/ha. Um misto de incentivos fiscais aos agricultores, tecnologia e pesquisa fez o Mato Grosso o Estado líder de produção (40,9% da produção nacional) e produtividade no início deste século. Na Região Sudeste, a área plantada em 2005/06 foi de 75.800 ha, com rendimento de 2.460 kg/algodão em caroço/ha. A produção brasileira de pluma na safra 2005/06 foi de 1.037,9 mil ton. A estimativa para 2006/7 será de 1.342,9 mil ton (Conab,2007) com um aumento estimado de 29,4% em relação à safra anterior.

- **A Cultura do Algodão no Brasil**

A exploração da cultura do algodão no Brasil teve início no nordeste brasileiro, e tinha pouca expressão, sendo que a primeira valorização da atividade foi concomitante a decadência da indústria açucareira, e sua expansão se deu em função de crises de outras culturas, como a do café, em São Paulo e Paraná. Estes Estados já ocuparam a posição de maiores produtores nacionais de algodão por várias décadas, baseados num modelo de pequenas e médias propriedades, porém, atravessando várias crises.

A produção no Brasil sofreu grandes mudanças nos últimos trinta anos. Nas décadas de setenta e oitenta, o modelo de produção era predominantemente familiar, com utilização de grande quantidade de mão de obra, principalmente devido à colheita manual, baixa produtividade. Neste período ocorreu um intenso crescimento do parque têxtil da região nordeste, impulsionado pelos incentivos dados pelos governos estaduais e federal (Figura 2). No ano de 2006/7 está estimada em 1342,9 mil ton (Conab, 2007).

Figura 2: Evolução da produção brasileira de algodão em pluma, de 1977 a 2006.



Fonte: CONAB – levantamento maio/2006

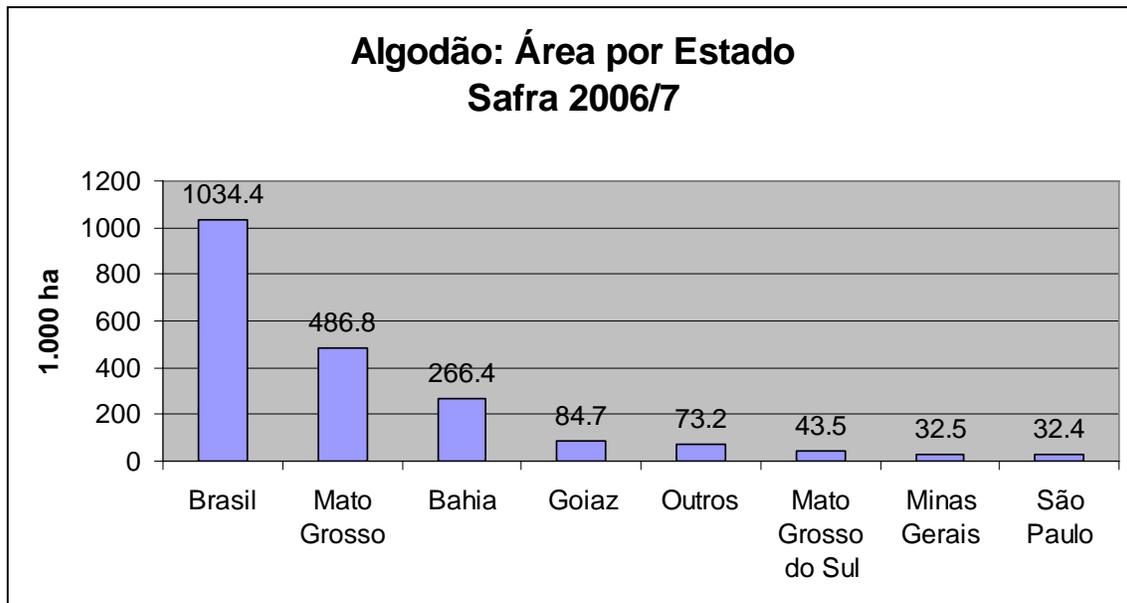
A partir de meados dos anos 80, a cotonicultura mergulhou numa grande crise, atingindo o seu ápice em 1997, quando o Brasil tornou-se o segundo maior importador de algodão do mundo, atingindo um déficit na cadeia têxtil de US\$1,1 bilhão, com importação de 501,2 mil t de algodão em pluma, com uma área plantada de 657,5 mil hectares (Figura 1). Isto ocorreu devido a uma conjugação de fatores, como entrada da praga conhecida como “bicudo do algodoeiro” que dizimou as plantações, principalmente do nordeste onde predominava o algodão mocó (perene), queda na alíquota de importação (de 55% em 1988 para 0% em 1991), câmbio defasado, prazos longos para pagamento de algodão importado (até 400 dias), queda no consumo de têxteis e preços baixos.

O cenário atual da cotonicultura brasileira começou a ser desenhada a partir de 1998, quando a cultura se expandiu para os cerrados, graças à introdução de novas linhagens (importadas), que se adaptaram muito bem as condições brasileiras e resistência a ramulose, que era uma doença limitante para esta região do Brasil. Além disso, a qualidade da fibra, tanto em relação às qualidades intrínsecas e extrínsecas, atendia tanto o mercado interno como externo, comparável às fibras produzidas nos Estados Unidos ou Austrália.

O modelo de produção passou a ser empresarial, com propriedades maiores e a utilização de melhores técnicas agrônômicas, mecanização intensiva e gestão profissional.

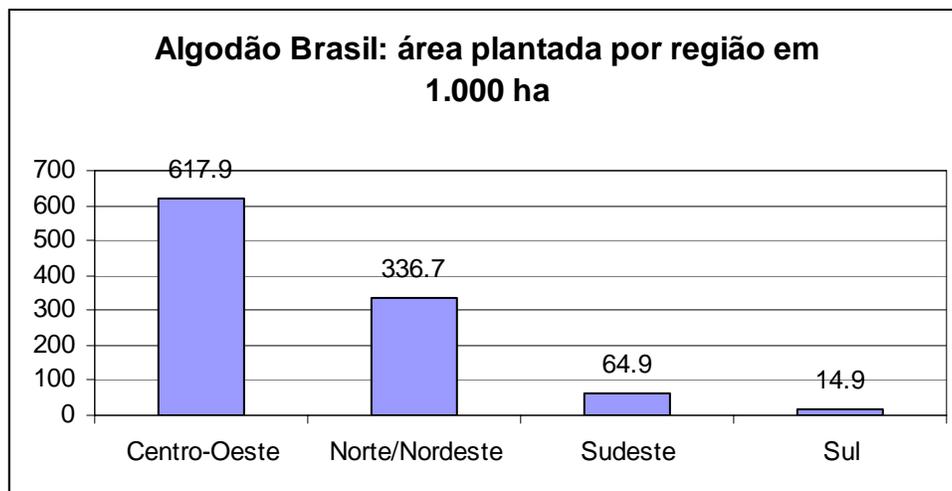
A partir deste período observamos a migração da produção dos Estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais para os Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e mais recentemente, Bahia. Hoje os principais Estados em área plantada são mostrados na figura 3. Por região as áreas são mostradas na figura 4.

Figura 3: Áreas de plantio de algodão no Brasil, distribuídos por Estado, em mil hectares.



Fonte: CONAB – levantamento: dezembro/2006.

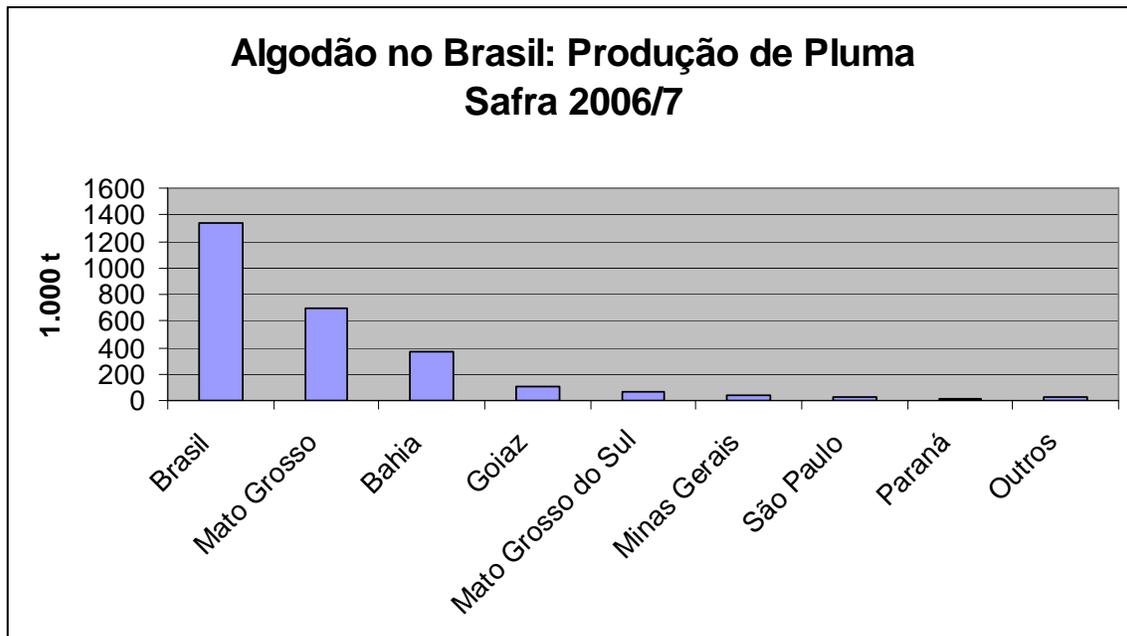
Figura 4: Áreas de plantio de algodão no Brasil, por região.



Fonte: CONAB – levantamento: junho 2007.

A produção de pluma nos principais Estados produtores é mostrada na figura 5, com grande destaque para o Mato Grosso e Bahia.

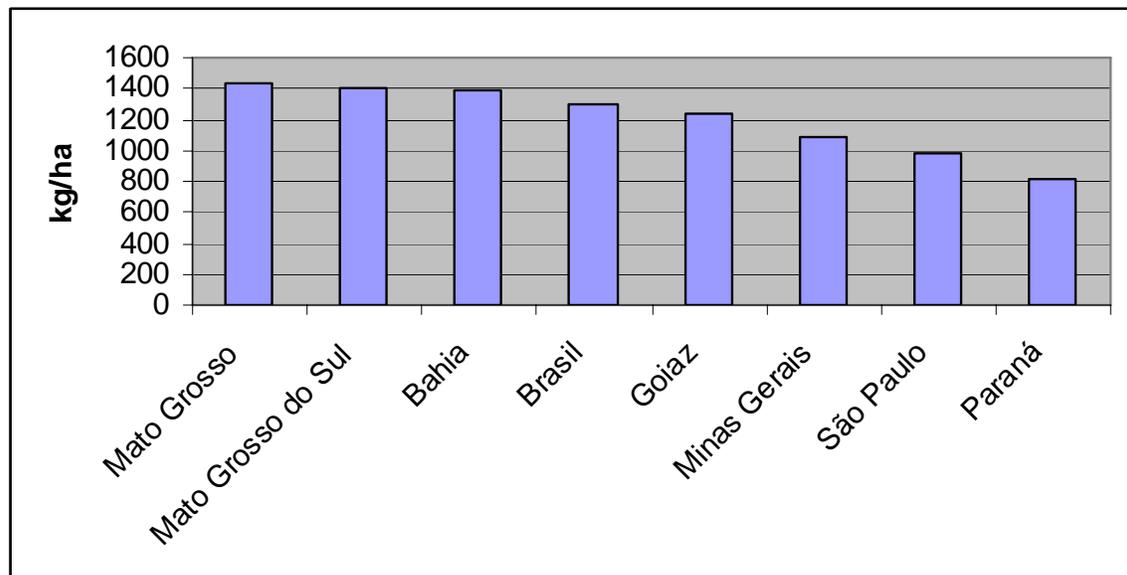
Figura 5: Produção de algodão no Brasil, por Estado.



Fonte: CONAB – levantamento: junho 2007.

A produtividade de algodão em quilograma de pluma por hectare, nos principais Estados, é mostrada na figura 6, com liderança de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Bahia.

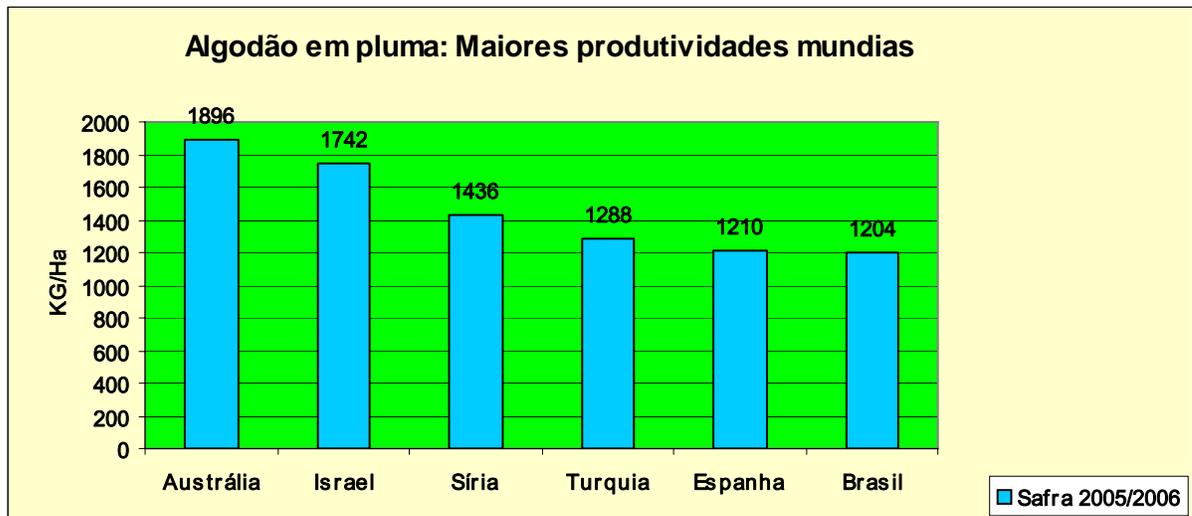
Figura 6: Produtividade em kg/ha de pluma, dos principais Estados produtores do Brasil. Safra 2006/2007.



Fonte: CONAB – levantamento: dezembro/2006

Mas a produtividade de pluma/ha do Brasil ainda está abaixo de muitos países como se vê na figura 7.

Figura 7: Produtividade de algodão em pluma, em kg/ha, das seis maiores produtividades do mundo.



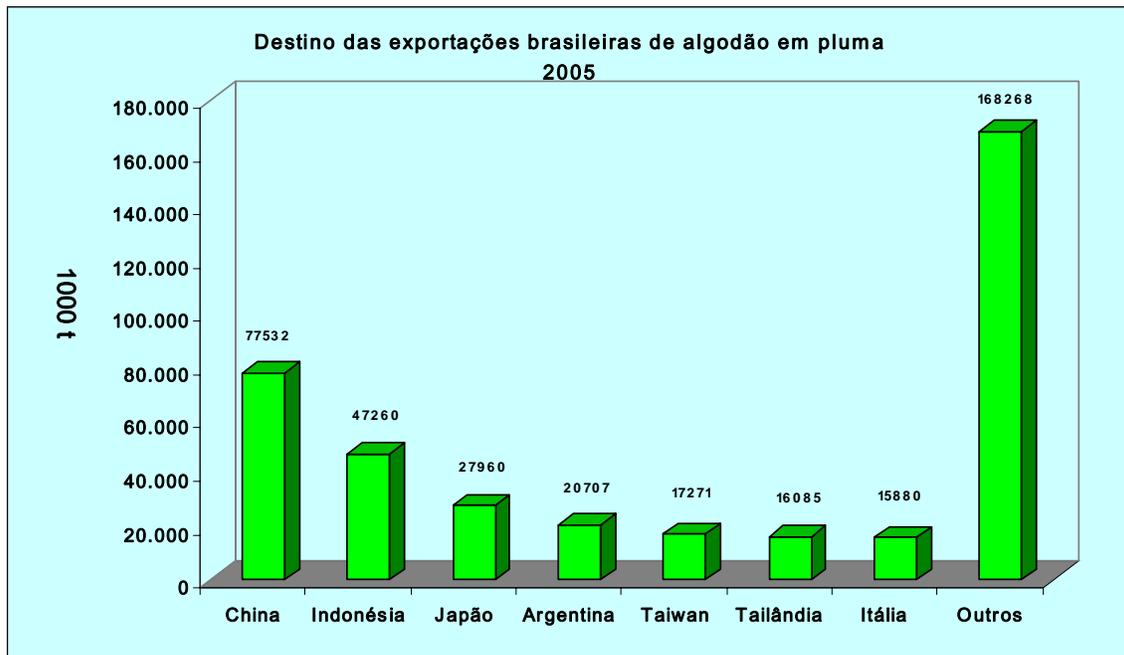
Fonte: USDA, maio 2006.

Atualmente o Brasil é o sexto maior produtor de algodão do Mundo, com 850 mil hectares de área cultivada, sendo Índia (8.850), Estados Unidos (5.586), China (5.060), Paquistão (3.150) e Uzbequistão (1.450) os cinco primeiros em termos de área plantada. Porém em quantidade produzida, a China ocupa a primeira colocação, com 26,2 milhões de fardos, seguida dos Estados Unidos (23,89), Índia (18,3), Paquistão (9,75), Uzbequistão (5,6) e Brasil (4,7). Os seis maiores produtores mundiais respondem por 78% da produção mundial, sendo que a China contribui com 23%, os EUA, Índia, Paquistão, Uzbequistão e Brasil com 21%, 16%, 9%, 5% e 4% respectivamente.

Atualmente o Brasil exporta para 46 países, sendo China, Indonésia, Japão, Argentina, Tailândia e Itália, os seis principais compradores de nosso algodão em 2005 (Figura 8).

O Brasil exportou 390, 96 mil t em 2005, com faturamento de US\$449,7 milhões e deve alcançar 380 mil t em 2006.

Figura 8: Destino das exportações de algodão em pluma, em mil toneladas, no ano de 2005.



Fonte: SECEX: NCM 5201.00.000A5201.99.99

- **Linhagens cultivadas no Brasil**

Há registro, no Ministério da Agricultura, de 85 linhagens de algodão. Porém, segundo dados da MDM (Maeda & Deltapine, 2006), somente três linhagens ocupam mais de 80% da área cultivada no Brasil.

Na safra 2004/2005, 60% da área de algodão no Brasil era ocupada com a linhagem Deltaopal, 16% da Fibermax 966, 13% da Acala 90 e 11% de outras linhagens. Na safra 2005/2006, aproximadamente 55% da área cultivada foi ocupada com a linhagem Deltaopal, 20% com Fibermax 966, 10% com Acala 90 e 15% com outras cultivares.

- **Produtos do Algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)**

-Fibras

O principal produto das plantas de algodão é a fibra (pluma), sendo as sementes um subproduto. As fibras são usadas em um grande número de tecidos, sendo responsáveis por quase 50% das fibras têxteis, (Anônimo, 1974). Em anos recentes, tem-se obtido na indústria, por tonelada de semente, em média cerca de 160 kg de óleo, 455 kg de farelo, 270 kg de cascas e 84 kg de fibras, com perda na fabricação de 31 kg de material. As produtividades médias variam de área para área, ano para ano e fábrica para fábrica, dependendo das características das semente, tipo de processamento usado e condições do mercado.

A semente do algodão é processada para obter produtos diferentes de alimentos e rações, tais como: óleo comestível, farelo e linter.

-Óleo comestível

O óleo extraído da semente do algodão é considerado o principal produto alimentício do algodão, que é de muito boa qualidade, dentro da amplitude de variação dos óleos de sementes.

Gorduras e óleos têm um importante papel na dieta humana. As gorduras são a mais concentradas formas de energia, suprimindo mais de duas vezes as calorias de energia por unidade de peso do que é fornecido por proteínas e carboidratos. Além de fornecer energia, as gorduras são as únicas fontes de certos ácidos graxos essenciais que não são fabricados pelo organismo, mas que são necessários para o seu crescimento e funcionamento adequado. Elas são boas transportadoras de vários grupos de vitaminas A, D, E, e K e, assistem o organismo a absorver alguns outros elementos nutritivos vitais. Além do seu valor alimentício direto, as gorduras e óleos melhoram o sabor de outros alimentos e com isso contribuem para o paladar e a digestão.

O óleo bruto de algodão que sai da usina requer posterior processamento antes de ser usado como alimento. O primeiro passo deste processo é o refino, o que é feito pelo aquecimento do óleo e acrescentando hidróxido de sódio. Esta substância combina com uma parte do óleo para formar o que é conhecido como resíduo de neutralização. Esse resíduo, juntamente com as impurezas que podem estar presentes, são então separados do óleo por meio de uma centrífuga de alta velocidade (Ver Guide to Edible Oils para maiores detalhes do refinamento de óleos vegetais). O processo de refinamento também remove materiais corantes escuros presentes, deixando o óleo amarelo claro.

Para a maior parte dos fins a que se destina, o óleo de semente de algodão é branqueado. Este processo envolve aquecimento e o acréscimo de uma argila especial branqueadora. A argila combina com o material corante remanescente no óleo após o refinamento e é então separada do óleo por filtração. O grau de branqueamento varia, dependendo do tipo de produto acabado no qual o óleo deve ser usado. Para uso em assados, um óleo muito claro é preferido. A maioria dos fabricantes de margarina também preferem um óleo claro, de modo a poderem melhor controlar a cor de seu produto acabado. Para óleo de cozimento, molhos de saladas, snacks e produtos similares, o óleo pode ser ou claro ou de cor levemente dourada.

O óleo de semente de algodão refinado e desodorizado é um dos produtos alimentícios mais puros disponíveis. Poucos alimentos podem ser tão extremamente purificados e refinados quantos os óleos vegetais e ainda manterem sua qualidade nutritiva.

-Ração animal

A semente do algodão é processada em três produtos principais para ração animal: farelo de algodão, cascas de sementes de algodão, e a semente integral. Eles são fontes naturais de proteína, fibra e energia. Em seguida ao farelo de soja, o farelo de algodão é a mais abundante proteína vegetal disponível em todos os EUA (NCPA, 2004) e o produto processado para rações mais importado pela UE (FAO banco de dados de estatísticas, dados agrícolas).

-Farelo de algodão

O farelo de algodão pode ser usado tanto em rações para ruminantes como para monogástricos. Normalmente, o farelo de algodão é obtido quando as sementes do algodão sem cascas, torradas e laminadas são submetidas à alta pressão por uma rosca rotativa em um tubo, o qual força o óleo por meio de pequenas aberturas. A torta desengordurada que resta é depois moída até farelo (NCPA, 2004).

O farelo de algodão é normalmente vendido como um produto com 41% de proteína, mas acha-se disponível como torta de algodão com 35%, e farelos com 38% e 44% de proteína. Os farelos de algodão são excelentes fonte de proteína para várias espécies de animais, incluindo monogástricos e ruminantes. Os farelos são freqüentemente processados em *pellets* de vários tamanhos, dependendo da aplicação. O farelo de algodão pode ser usado sozinho em muitas dietas ou em combinação com outras fontes de proteínas vegetais ou animais para completar uma ração balanceada.

-Cascas da semente do algodão

As cascas são o invólucros externos das sementes do algodão e são separadas do grão antes do processo de extração do óleo. As cascas da semente do algodão contêm de 3 a 8 % de *lint* altamente digerível, contendo pouco menos de 100% de celulose. As cascas da semente do algodão são uma excelente fonte alimentícia com alto nível de fibra efetiva, resultando numa fonte muito palatável e rica para rações de monogástricos e como volumoso em rações para ruminantes. As cascas são comumente usadas em confinamentos e rações para gado de leite, uma vez que não requerem moagem e se misturam bem com outros ingredientes da ração. Elas também podem ser peletizadas para facilitar o manejo e diminuir o custo de transporte. As cascas de sementes de algodão são comparáveis em valor nutritivo a um bom feno de gramíneas e são um valioso ajudante digestivo para concentrar a ração.

3. Aspectos botânicos

Gossypium é um dos oito gêneros que compõem a tribo Gossypieae, da família Malvaceae (Penna, 2005). Anteriormente, o gênero era colocado na tribo Hibisceae, porém Fryxell, 1968, mostrou evidências para sua classificação na tribo Gossypieae. Estudos citogenéticos do gênero demonstraram a existência de grupos genômicos que reúnem espécies que apresentam alto grau de homologia entre si no pareamento de cromossomos de híbridos, mas baixo grau de pareamento com espécies de grupos diferentes. Tais grupos foram definidos por letras maiúsculas de A a G por Beasley (1942), com números subscritos para genomas proximamente relacionados. As espécies diplóides ($2n = 2x = 26$) foram classificadas em três grupos geográficos por Fryxell (1979): australianas, com onze espécies (Genoma C); americanas, com doze espécies (dez no México e duas no Peru e Ilhas Galápagos) (Genoma D); e afro-arábicas, com oito espécies (Genomas A, B, E e F). Neste último grupo, encontram-se as espécies cultivadas *G. arboreum* e *G. herbaceum*. As espécies alotetraplóides ($2n = 4x = 52$, genoma AD) são seis: duas são cultivadas (*G. hirsutum* e *G. barbadense*) e as demais encontradas no Havaí, no Brasil, nas Ilhas Galápagos e no México (Penna, 2005).

Os algodoeiros cultivados no mundo pertencem a quatro espécies distintas do gênero, sendo duas alotetraplóides (*Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L.) e duas diplóides (*G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L.). A segregação dos alotetraplóides é idêntica à dos diplóides, apresentando proporções mendelianas previsíveis para caracteres de herança simples. A primeira dessas espécies, *G. hirsutum* é, sem dúvida, a de maior importância, pela grande área de cultivo e pelo volume e valor de sua produção. Este é o algodoeiro conhecido no Brasil como “herbáceo” ou “anual” e, no hemisfério norte, como algodoeiro “upland”. As plantas apresentam porte subarbustivo e não são verdadeiras anuais, pois predominando condições climáticas favoráveis após a colheita, elas continuam vegetando, podendo perdurar por maiores períodos. No Brasil, os produtores em geral arrancam e queimam as plantas após a colheita e nos países de clima temperado, elas são mortas pelas primeiras frentes frias do inverno (Penna, 2005).

A espécie *G. barbadense* L. tem importância na produção de fibras especiais de alta qualidade, destacando-se o cultivo de linhagens conhecidas como “Pimas” no hemisfério norte. No Brasil, essa espécie possui uma variedade botânica, a *brasiliense*, presente em aldeias indígenas e fundos de quintais; é conhecida como algodão “rim-de-boi”, por apresentar suas sementes nuas e soldadas em forma de um rim. As outras duas espécies, *G. arboreum* L., cultivada no Paquistão e na Índia, e *G. herbaceum* L., cultivada na África, são ambas exploradas em pequena escala. Outras espécies de *Gossypium* ocorrem em regiões amplamente separadas do mundo, principalmente em zonas áridas dos trópicos e subtropicais.

As plantas de *Gossypium hirsutum* apresentam caule sub-lenhoso, ereto, cilíndrico, ligeiramente quadrangular ou pentagonal com entrenós mais curtos do que no *G. barbadense*. O porte final das plantas é variado, podendo atingir até 2,5m em terras férteis com bom suprimento de água ou sob irrigação e neste caso, para atender às boas práticas agrônômicas, adaptação à colheita mecânica, etc, normalmente necessitam controle de crescimento via utilização de químicos reguladores (hormônios). O caule principal e alguns ramos basais secundários são estritamente vegetativos (monopódios) e os ramos frutíferos (simpódios) dispõem-se ao longo do caule principal ou ainda saindo dos ramos vegetativos basais. O sistema radicular é considerado pivotante, afinando-se a 20-40cm de profundidade e pode atingir até 2m de acordo com o tipo do solo. Existem raízes secundárias entre 5 e 30 cm, com ramificações, porém 80% da massa total das raízes está situada nos 20 cm iniciais. As folhas são pecioladas, palmadas, de consistência coriácea ou não, inteiras (primeiras) ou recortadas com lobos arredondados ou agudos variando de três a sete. Quanto à profundidade da endentação, podem ser: normais ou tipo “okra” (endentação profunda, dando às folhas o aspecto de folha de mandioca ou de quiabo). Os pecíolos apresentam comprimento variável. A presença de tricomas é variável, podendo as folhas serem densamente pilosas, aveludadas ou glabras. Apresentam 1 ou 3 grandes nectários na face dorsal das folhas que também estão presentes nas flores (Penna, 2005).

As flores são hermafroditas, apresentando 5 pétalas (de 5 a 7cm de comprimento) de cor creme ou amarelo-sulfurina com sépalas soldadas. São efêmeras, abrindo nas primeiras horas da manhã e entram em decadência à tarde do mesmo dia. O ovário é súpero com 3 a 5 carpelos os quais contém de 5 a 10 óvulos e toda a estrutura floral é parcialmente envolvida pelas brácteas que são estruturas protetoras composta de folhas modificadas formando uma pequena pirâmide em torno dos botões florais (“squares”). A

parte masculina da flor é constituída por uma coluna estaminal que envolve o ovário e o pistilo, órgão feminino que se projeta por entre os estames. Em *G. tomentosum* (tetraplóide silvestre do Havai) o estigma é alongado e a autofecundação só pode ser assegurada por insetos polinizadores. Aproximadamente o mesmo fenômeno ocorre com o algodoeiro mocó brasileiro (*G. hirsutum* r. *Marie-galante*) mais presente na região Nordeste do país.

A floração do algodoeiro é peculiar em relação à maioria das culturas anuais. Ela inicia-se por volta dos 40 a 50 dias após a germinação, com o aparecimento dos primeiros botões florais e prossegue indefinidamente até o “final” do ciclo da planta. A seqüência de abertura de flores segue um padrão determinado, iniciando-se a primeira flor no primeiro nó do primeiro ramo frutífero (simpódio). A próxima flor aparece no segundo ramo frutífero após alguns dias, que podem variar de 1 a 5, sendo a média de 3 dias (Namken *et al.*, 1979). A este intervalo dá-se o nome de Intervalo de Floração Vertical. À medida que os ramos frutíferos se desenvolvem, novas flores se apresentam e o ciclo de floração se repete. A segunda flor no mesmo ramo aparece, com um intervalo de 8 dias em média, em relação à primeira flor. Este intervalo é conhecido como Intervalo de Floração Horizontal. Esses intervalos variam em função da própria constituição genética dos cultivares e das condições ambientais. Esse sistema de floração faz com que o algodoeiro apresente um prolongado período de floração, que se inicia em torno de 55 dias e se prolonga por várias semanas, passando por um pico de freqüência máxima, que também varia segundo a cultivar e as condições ambientais (Penna, 2005).

As sementes tem óvulos fecundados, de forma piriforme e de dimensões em torno de 7,0 x 4,0 mm e peso médio de 100 sementes oscilando de 9 a 14g dependendo da cultivar e das condições ambientais. São constituídas por 25 a 40% de óleo e 20 a 25% de proteínas. As plantas possuem, estruturalmente, glândulas de gossipol, um terpenóide, substância tóxica para animais monogástricos. A camada superficial de células que envolve os óvulos, após a fecundação se diferencia em fibras, que são as duas camadas de tricomas com convoluções (estas tornam possível a fiação) que envolvem as sementes: línter (tricomas curtos) e fibras ou “lint” (tricomas longos). Os frutos são cápsulas deiscentes com três a cinco lojas que são denominados popularmente por maçãs (quando imaturas) ou por capulhos (quando abertos e prontos para a colheita).

- **Características reprodutivas**

A fecundação das flores normalmente ocorre durante as primeiras horas mais quentes da manhã. As anteras, após extrusão carregam-se abundantemente de grãos de pólen, em torno de 45.000 grãos por flor, segundo Tsyganov, 1953, citado por McGregor, 1976. Tais grãos são relativamente grandes (81 a 143 microns) e são pegajosos, o que faz com que não sejam carregados pelo vento. Após a fertilização e com a decadência das pétalas, as flores mudam de cor creme, para avermelhado púrpura e finalmente com dois a três dias senescem e caem, deixando à mostra as jovens maçãs sempre protegidas pelas brácteas que as acompanharão até a colheita.

O algodoeiro é uma espécie autógama, com taxas de alogamia variável, sendo que alguns autores a consideram planta “intermediária” entre autógamas e alógamas (Allard, 1960). As taxas de polinização cruzada encontradas em vários estudos variam muito e são, na prática, totalmente dependentes de atividade entomófila. Polinização cruzada, ou

“cruzamentos naturais” são definidos por Fryxell (1957) como aqueles que ocorrem entre indivíduos dentro de uma população. As plantas apresentam características atraentes para alguns grupos de insetos e apesar de insetos de pequeno porte também serem responsáveis pela polinização cruzada, as abelhas e as mamangavas são consideradas as grandes promotoras de alogamia. Em fato, a cultura é considerada em algumas regiões do mundo como forrageira de abelhas para produção melífera (Benson 1937, Kuliev 1958, Minkov 1957, Parks 1921, todos citados por McGregor, 1976), especialmente devido ao seu longo período de floração. Aparentemente os nectários das plantas, especialmente os extra-florais assumem papel importante na atratividade da planta pelas abelhas. Existem nectários em várias partes da planta, como nas folhas, nas flores, nas partes externas e internas das brácteas (extra-florais) e nos pedúnculos florais (unipapilares ou microscópicos). Estes nectários estão em função ativa por vários dias antes da abertura dos botões florais, mas aumentam grandemente sua capacidade de produção no dia de abertura das flores. Nas lavouras, a polinização cruzada varia segundo a intensidade e o número de aplicações de inseticidas, sendo reduzida em culturas altamente tecnificadas, em que se fazem pulverizações de inseticidas com regularidade. No melhoramento genético do algodão, as taxas de polinização cruzada podem comprometer a pureza genética de plantas selecionadas e assim, para não perder o controle das gerações segregantes, utiliza-se a autopolinização forçada ou controlada (Penna, 2005). Isto é conseguido por meio do amarrão dos botões florais na tarde do dia que antecede à abertura da flor com um pedaço de fio de cobre ou barbante, o qual, ao mesmo tempo, é amarrado na base da flor para que esta fique identificada para a colheita. A técnica no entanto, normalmente reduz a quantidade de sementes e de pluma obtida do capulho em comparação ao que teve polinização natural.

- **Polinizadores**

O algodoeiro é predominantemente autógamo, mas a polinização cruzada pode ocorrer sob a ação de insetos. As flores do algodoeiro abrem pela manhã, o pólen é liberado, e as flores começam a murchar no fim do primeiro dia. O pólen não é levado pelo vento, devido à sua natureza pesada e pegajosa (Poehlman, 1994).

A fecundação cruzada em algodoeiro cultivado na América do Norte é realizada com o auxílio de mamangavas (*Bombus* spp.), abelhas *Melissodes* e abelhas melíferas (*Apis mellifera*) que são seus principais polinizadores. O pólen do algodoeiro é bem adaptado ao transporte pelos insetos, mas não é igualmente atrativo a todas as abelhas. A forma espinhosa do pólen torna difícil para as abelhas melíferas compactá-lo em suas bolsas de pólen. Portanto, as abelhas melíferas raramente coletam pólen deliberadamente, embora elas recolham pólen quando visitam as flores à procura do néctar (Oosterhuis & Jernstedt, 1999).

Um estudo conduzido no Estado do Alabama (Ward & Ward, 2000) sugere um impacto positivo de abelhas melíferas suplementares nos indicadores de produtividade em campos de algodão B.t.. A concentração de polinizadores adequados varia de local a local, dependendo da natureza das culturas próximas, eficiência no controle do mato na cultura ou na proximidade do campo e uso de inseticida (McGregor, 1976).

Umbeck *et al.* (1991) estudaram o movimento de pólen e genes no Mississippi, e mostraram que o movimento do pólen diminui rapidamente após 12 metros. Um estudo

similar foi conduzido por Llewellyn & Fitt (1996) no Vale Namoi, Austrália, e os resultados indicaram que zonas tampão de 20 metros são suficientes para limitar a dispersão de pólen transgênico em teste de campo de pequena escala.

Os polinizadores de algodão mais citados na literatura são *Apis mellifera*, *A. dorsata*, *A. florea*, *A. cecropia*, *Melissodes spp.*, *Halictus spp.*, *Bombus spp.*, *Anthophora confusa*, *Elis thoracica* e *Scolia spp.* (Freire *et al.*, 2003). As abelhas melíferas são consideradas os insetos de maior relevância neste sentido, no Brasil, ao passo que outras espécies como as *Melissodes* e as abelhas do gênero *Bombus* assumem maior importância na América do Norte (McGregor, 1976). Alguns estudos mostraram que as visitas de abelhas aos algodoeiros são menos frequentes durante o ciclo médio da cultura e por outro lado, altas frequências no início e final de floração. O fenômeno parece se relacionar com a variação de composição dos açúcares presentes no néctar. Num estudo de preferência, Wykes (1952) ainda citado por McGregor (1976) constatou que abelhas melíferas preferiam soluções de açúcar na seguinte ordem de composição: sacarose, glicose, maltose, e frutose, e ainda que misturas destes açúcares em iguais proporções eram as mais preferidas e Kaziev (1964) (citado por McGregor (1976) encontrou no ciclo médio da planta, sacarose nos nectários de algodoeiro, variando entre 2,3 a 7,6% enquanto os açúcares simples totais variavam de 21,2 a 46,9%. Na mesma revisão de McGregor (1976), Butler *et al.* (1972), compararam as composições de néctar de nectários foliares, florais e extra-florais de três cultivares de *G. hirsutum* e uma de *G. barbadense* e concluíram que os nectários florais e extra-florais possuíam baixos teores de sacarose. Por outro lado, Kaziev (1964) demonstrou que as abelhas eram mais atraídas pelos nectários presentes nas brácteas (externos e internos). O mesmo autor descreve a atividade dos nectários foliares os quais começam a secretar antes da folha atingir seu tamanho máximo e coincide com o aparecimento dos primeiros botões florais e ainda são ativos por duas a três semanas na mesma folha.

Outro aspecto importante para isolamento de campos de algodão de diferentes cultivares é a questão da distância a qual o pólen pode ser transportado. O assunto assumiu maior importância com o advento de plantas geneticamente modificadas (GM), trazendo importantes questões no que concerne a fluxo gênico de culturas GM para culturas convencionais e para algodoeiros silvestres. A dispersão de pólen a longas distâncias está relacionada ao hábito de forrageamento dos polinizadores, que por sua vez é dependente da capacidade de vôo dos mesmos (Freire *et al.*, 2003). É consenso que a distância para forrageamento varia segundo a espécie.

Os mesmos autores (Freire *et al.*, 2003), revisaram este assunto e apresentaram os resultados de algumas pesquisas: Malone (2002), relata que a maioria das pesquisas demonstra que a distância máxima de forrageamento de abelhas melíferas é de 10 km e a distância média de forrageamento é de 0,5 a 1,5 Km. Se as fontes de alimento se encontrarem distantes, vôos de até 5 km de distância podem ocorrer (Heinrich, 1979). Hedtke (1996) citado por Freire *et al.*, 2003, verificou que *Bombus terrestris* e *B. lapidarius* podem realizar forrageamento em locais distantes até 4 Km. As abelhas desprovidas de ferrão apresentam menor capacidade de vôo em comparação às abelhas melíferas e mamangavas. Segundo Kerr (1954), citado por Freire *et al.*, 2003, abelhas pequenas (como as do subgênero *Plebeia*) têm uma amplitude de vôo de cerca de 300 metros, as medianas, como *Trigona* alcançam 600 metros, as grandes atingiram 800 metros e as muito grandes como *Melipona fuliginosa*, chegariam aos 2000 metros.

- **Taxa de cruzamento**

As metodologias para se estimar as taxas de fecundação cruzada em algodoeiro são várias e podem ser agrupadas em quatro tipos, segundo o marcador utilizado: morfológicas, moleculares, colorimétricas e bioensaios (Freire *et al.*, 2003). As morfológicas baseiam-se em marcadores fenotípicos de herança simples, tais como a ausência de glândulas de gossipol nas sementes, a cor do hipocótilo e de folhas, a forma das folhas e brácteas, etc. Em geral, as determinações mais comuns empregam a ausência de gossipol nas sementes (Moresco *et al.*, 1999; Xanthopoulos & Kechagia, 2000; Thitiprasert, 2001, todos citadas por Freire *et al.*, 2003), pela sua facilidade de reconhecimento e pelo efeito xênia, no qual o caráter em questão se expressa já na semente cruzada (F1). Os locos mais utilizados são G_2 e G_3 , cujo fenótipo sem glândulas é expresso plantas homozigotas recessivas (g_2g_2 g_3g_3). As plantas sem glândulas são usadas como fêmeas receptoras de pólen de plantas normais de fonte glandulada. No método colorimétrico utiliza-se um corante fluorescente ou convencional para a marcação e visualização de flores visitadas por insetos polinizadores. Queiroga *et al.* (1993) e Freire (2002a) utilizaram o corante azul de metileno para determinar taxas de polinização cruzada em algodoeiro. A metodologia fornece mais estimativas do potencial de cruzamento do que valores reais das taxas. Outra metodologia utilizada se baseia na detecção de marcadores moleculares provenientes de outra população e é mais usada na avaliação de fluxo gênico a partir de plantas geneticamente modificadas. A expressão da característica transgênica em um indivíduo descendente de uma planta convencional (genitor feminino) indica que ele foi formado por fecundação cruzada com pólen transgênico. Geralmente são utilizados a resistência a um determinado marcador seletivo presente nas plantas transgênicas, como a resistência a antibióticos (Umbeck *et al.*, 1993; Llewellyn & Fitt, 1996) ou o desenvolvimento anormal ou a morte de lagartas em ensaios envolvendo transgênicos do tipo Bt (Llewellyn & Fitt, 1996).

A literatura apresenta várias estimativas de taxas de polinização cruzada em algodão, desde ínfimas como a calculada por Al-Jibouri (1960) de 0,47%, no Iraque, até valores extremos como encontrados por Simpson (1950), citado por McGregor, 1976, com cerca de 90% em sua pesquisa no cinturão de algodão dos EUA. Outros valores encontrados na literatura e citados pelo mesmo autor são apresentados a seguir. Por outro lado, Peebles (1942) em seus estudos considerou 1,6 km como suficiente para o isolamento de campos. Ricks e Brown (1916) encontraram entre 2,8 a 18,5% entre plantas e ruas adjacentes respectivamente. Stephens & Finkner (1953), estudando os efeitos benéficos da polinização cruzada no processo de obtenção de linhagens híbridas de algodão, encontrou valores variando de 5 a 50% ou mais, dependendo da presença de abelhas nas áreas de estudo. Humbert & Mogford (1927) afirmaram que a polinização aberta em algodão varia de 2 a 20% e não passaria de 15% em condições normais. O valor fixo de 4% foi estabelecido como normal por Fikry (1931). Em Missouri, Sappenfield (1963) estimou as taxas na faixa de 1,0 a 32,2%, com média de 13,6%. No noroeste australiano, Thomson (1966) encontrou taxas de 1 a 2% em ambiente com ausência de abelhas e onde cotonicultores aplicavam inseticidas uma ou mais vezes por semana.

No Brasil, os valores estimados para as taxas de alogamia em algodão também são muito variáveis e dependentes dos ambientes de teste. Em Sete Lagoas, MG., Castro *et al.* (1982) encontraram taxa média de polinização entre plantas individuais de 32,2 %

em 1974 e de 15,2% entre fileiras nos anos consecutivos de 1973 e 1974. Penna *et al.* (1991), encontraram, em Uberaba, MG, a taxa média de 25% no período de três anos agrícolas (1984/85 a 1986/87). Em Campinas, SP., Crisóstomo *et al.* (1988) detectaram taxa média de 35,6% no período de 1986 a 1988. Em 1993/94, Resende & Fallieri (1995) reportaram, em Janaúba, MG, a média de 10,1% de polinização cruzada. Em todos estes estudos utilizou-se como marcador genético a característica ausência de glândulas de gossipol (*glandless*), expressa por dois genes na condição de duplo recessivo. As taxas de polinização cruzada dos algodoeiros arbóreos, predominantemente os algodoeiros “Mocó” - *G. hirsutum*, raça *marie-galante* no Nordeste são normalmente altas e se devem basicamente à morfologia das flores, pois o pistilo projeta-se acima da coluna estaminal, sendo exposto ao contato com insetos que visitam o algodoal. Freire (2002b) resumindo estudos efetuados no Brasil, apresenta valores de polinização cruzada de 0,2 a 70%, de até 100% para o Nordeste brasileiro, e de 1 a 32% para áreas de mais de 500 ha de cultivo para a região do cerrado do centro-oeste. A Tabela 1 apresenta um resumo das estimativas de polinização cruzada executados no Brasil.

Tabela 1: Taxas de fecundação cruzada em diferentes localidades no Brasil.

Autor	Tipo de algodão	Local	Taxa (%)
Cavaleri e Gridi-Papp (1963)	Herbáceo	São Paulo, SP	6 a 41
	Herbáceo	Campinas, SP	33
Mangueira (1971)	Mocó	Serra Talhada, PE	1 a 100
Silva <i>et al.</i> (1973)	Mocó	Ceará	55
Castro (1975)	Herbáceo	Sete Lagoas, MG	32
Penna <i>et al.</i> (1991)	Herbáceo	Uberaba, MG	25
Queiroga <i>et al.</i> (1993)	Mocó	Patos, PB	3 a 97
Resende e Fallieri (1995)	Herbáceo	Porteirinha, MG	10,11
Moresco (1999)	Herbáceo	Campo Verde, MT	6,54
	Herbáceo	Pedra Preta, MT	50,44
	Herbáceo	Pedra Preta, MT	68,83
	Herbáceo	Serra Petrovina, MT	46,85
	Herbáceo	Serra Petrovina, MT	44,98
	Herbáceo	Primavera do Leste, MT	29,26
Freire (2002)	Herbáceo	Capinópolis, MG*	0 a 100
	Herbáceo	Santa Helena, GO	20 a 60
	Herbáceo	Acreuna, GO	0 a 12
	Herbáceo	Porteirão, GO	0 a 29

Fonte: Freire *et al.*, 2003

Vários estudos demonstram que a distribuição de pólen decresce consideravelmente à medida que aumenta a distância da fonte do mesmo. Num experimento onde um grande número de colméias dispunha-se em torno de um campo de 32 ha de algodão Pima (*G. barbadense*), Johansson, citado por McGregor (1976) estudou a movimentação de pólen marcado por partículas fluorescentes e conclui que de 0 a 16m da fonte (flor com pólen marcado), 40,5% de flores apresentaram vestígios de polinização com o referido pólen um dia depois; de 16 a 33m, 14% das flores apresentaram o pólen;

de 33 a 50m, 3.5% de flores e finalmente de 50 a 65m de distância, apenas 1,6% apresentou o pólen marcado. Mais recentemente, Umbeck *et al.* (1991) estudaram fluxo gênico por meio de polinização cruzada em parcelas experimentais no Mississippi. Para isto, os autores estudaram um campo com 98.800 plantas de algodoeiro GM cercado por bordaduras de algodoeiros não-transgênicos. Foram tomadas amostras de sementes de todas as linhas da bordadura em três pontos da planta (parte inferior, média e superior) para representar a variação sazonal. Os autores utilizaram um gene marcador de resistência ao antibiótico canamicina para identificar sementes resultantes de cruzamentos naturais com as plantas GM. Os resultados encontrados mostraram redução consistente na disseminação de pólen à medida que aumentava a distância da fonte de pólen e a taxa de polinização cruzada caiu de 5% para menos de 1% aos 7m de distância do campo de teste. Até 25m de distância foram encontradas esporadicamente dispersão de menos de 1% de pólen. Os autores não encontraram diferenças nos valores em função de possíveis variações sazonais e concluíram que para a localidade em questão, as distâncias para contenção de pólen para algodoeiros geneticamente modificados podem ser reduzidas.

- **Fluxo gênico no algodoeiro e zonas de exclusão.**

O fluxo gênico por meio de polinização cruzada é possível entre diferentes espécies de *Gossypium* desde que entre espécies do mesmo grupo de ploidia. Assim, é possível a hibridização entre *G. hirsutum* e ambos *G. barbadense* e *G. mustelinum*, espécies presentes no Brasil, especialmente na região Nordeste (*G. mustelinum*) e aldeias indígenas no norte do Mato Grosso e Rondônia (*G. barbadense*). É fenômeno conhecido dos melhoristas que em geral populações híbridas interespecíficas entre *G. hirsutum* e *G. barbadense* degeneram em gerações avançadas em direção à um dos parentais, não incorporando significativamente características híbridas (Freire *et al.*, 2003).

Devido às taxas de polinização cruzada, a multiplicação de sementes deve ser levada a efeito com o isolamento dos campos, seja físico, pela distância, ou através de barreiras vegetais. Recomenda-se, na literatura, distâncias livres de no mínimo 1600 m aproximadamente (uma milha) entre campos (Pope *et al.*, 1944). Já Green & Jones (1953) recomendam distâncias de 100 m. Castro *et al.* (1982) desaconselham a utilização de barreiras vegetais em situações que requerem perfeito isolamento. Em seu trabalho, os autores testaram barreiras de 5 m de largura de milho, sorgo, algodoeiro e crotalária. A barreira de milho foi a que mais reduziu a polinização cruzada (de 15,1 para 5,2%).

Llewellyn & Fitt (1996) conduziram pesquisa em condições ambientais da Austrália para determinar a eficiência de medidas de contenção de pólen a partir de uma parcela de plantas geneticamente modificadas. Foi utilizada cultura de algodão não-transgênico ao redor da parcela em questão cuja função seria uma área de deposição de pólen, ou seja, a própria barreira vegetal. Estimou-se a dispersão de pólen por meio da detecção da presença do marcador transgênico dominante “neomycin phosphotransferase (NptII)” nas progênies das plantas constituintes da barreira. A dispersão em dois anos de pesquisa foi considerada baixa pelos autores, variando no primeiro ano, de 0.15% na progênie a 1m de distância da fonte, para menos de 0.08% nas progênies a 4 m de distância. No segundo ano, com uma área maior de plantas GM, obtiveram-se valores de 0.4% a 1 m, reduzindo para menos de 0.03% a 16 m de distância. Os autores concluíram

que para experimentos em pequena escala e nas condições ambientais testadas, barreiras de algodoeiro de 20 m seriam suficientes para limitar a dispersão de pólen de plantas transgênicas. No Brasil, Freire (2002a) realizou estudo para a avaliação de fluxo gênico a partir de algodoeiros geneticamente modificados. O autor verificou que um número “relativamente pequeno de fileiras de algodão convencional”, plantadas em bordaduras era suficiente para a contenção de pólen advindo do interior da parcela de plantas transgênicas. Em locais próximos a matas nativas, as taxas de cruzamentos encontradas foram relativamente grandes. Os dados obtidos permitiram considerar 10 ruas de algodoeiro convencional como barreira suficiente para conter pólen das áreas de experimentação com algodoeiros transgênicos.

Em seu artigo de revisão, Freire *et al.* (2003) e Borém *et al.* (2003) citam medidas visando controlar a dispersão do pólen entre algodoeiros de alguns países. Na Argentina, por exemplo, exige-se o isolamento em distância de 500 m para experimentos com plantas transgênicas de outras lavouras da mesma espécie. Nos EUA, no Estado da Califórnia a legislação exige distância mínima de 4,8 km entre campos de produção de sementes de linhagens de fibra branca e colorida (sem bordaduras). Caso seja implantada bordadura de 100 linhas de algodoeiro de fibra branca entre eles, a distância é reduzida para 1,6 km. No Havaí, o algodoeiro silvestre tetraplóide *Gossypium tomentosum* pode hibridizar naturalmente com *G. hirsutum* ou com *G. barbadense*. O arquipélago foi considerado área proibida para cultivo de transgênicos devido à alta probabilidade de fluxo gênico em direção a estes germoplasmas. Para pesquisas localizadas no Havaí, exige-se o plantio de 12 ou 24 linhas de bordadura de algodoeiros convencionais dependendo do tamanho das parcelas experimentais a ainda deve ser mantida a distância mínima de 400 m de plantas de *G. tomentosum*. Os resultados da literatura demonstram que barreiras com a própria cultura do algodão são mais eficientes na redução da fecundação cruzada do que as barreiras com culturas como o milho (Carvalho, 2001).

A legislação brasileira, segundo a Instrução Normativa Nº 25, de 16 de dezembro de 2005, publicado no Diário Oficial da União de 20/12/2005, Seção 1, Página 18, estabelece normas específicas e os padrões de identidade e qualidade para produção e comercialização de sementes de algodão. Determina que campos destinados à produção de sementes de algodão devem estar a 800 metros de distância de outras espécies de *Gossypium*. Esta exigência é reduzida para 250 metros de outras lavouras de diferentes cultivares ou ainda 50 metros quando for utilizada barreira de plantas mais altas entre os campos. Segundo Freire *et al.* (2003), não há indicativo de que tais valores tenham sido estipulados com base em pesquisa em áreas maiores e sim devem ter sido baseadas em análise de dados históricos e na extrapolação dos resultados obtidos em experimentos em parcelas menores.

Barroso *et al.* (2005) publicaram proposta de zonas de exclusão e algodoeiros transgênicos no Brasil, em função da distribuição espacial dos algodoeiros nativos e silvestres e do zoneamento agrícola de 2004/05 do MAPA, no qual excluem do cultivo de algodoeiros OGM's, as regiões Amazônia (todos os Estados da região Norte e parte da Amazônia legal dos Estados do Mato Grosso e Maranhão), Pantanal (Municípios do Pantanal dos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Seridó (Rio Grande do Norte e Paraíba) e Norte da Bahia (Municípios de Macururê e Jaguarari).

Devido ao sistema de floração contínua por todo o ciclo da cultura não há viabilidade de isolamento temporal dentro da mesma estação de crescimento. Parece

óbvio, no entanto, que o plantio na entre safra, quando viável, pode ser utilizado para o isolamento, desde que os restos culturais da lavoura anterior tenham sido adequadamente destruídos.

- **Escape de material genético do algodoeiro**

O escape gênico a partir de *Gossypium hirsutum* poderia ocorrer potencialmente de um local para outro por meio do pólen, da semente ou mesmo de material vegetativo. Esta última possibilidade pode ser na prática descartada pois apesar de reprodução vegetativa ser possível em algodoeiro, nos modernos sistemas de cultivo do Brasil Central e outras regiões de alta tecnologia, as lavouras são destruídas após a colheita, como é previsto por lei. A destruição é feita nas áreas de plantio, pelo arranquio e queima dos restos culturais, ou pela roçada baixa e posterior gradeação. Alguns produtores usando cultivo mínimo ainda fazem usos de herbicidas para a destruição de soqueiras, apesar do fato de não existirem herbicidas registrados para tal uso. Outrossim, a multiplicação vegetativa da planta não é prática normal, mas quando é efetuada, normalmente é para fins de pesquisa sob condições controladas (casa de vegetação). Quanto ao escape por sementes, é possível a deposição de algodão em caroço no solo após a colheita mecânica. Entretanto as operações de destruição de restos e os preparos que antecedem o próximo plantio (ou próxima cultura em rotação) normalmente não permitem a perpetuação das plantas voluntárias/tigüeras. Eastick (2002) comenta que na prática não há evidências documentadas de que os algodoeiros possam se estabelecer em áreas cultivadas a partir de fragmentos de plantas após colheita.

Em regiões algodoeiras podem ocorrer também perdas de algodão em caroço devido aos descuidos no transporte, o que é denominado como tigüera de beira de estrada. Com a melhoria dos sistemas de transporte pelo uso de fardões prensados, comuns na cotonicultura do centro-oeste, tais problemas tendem à diminuição. Sementes que porventura germinem às margens de rodovias para que se estabeleçam com sucesso, precisariam de nichos especiais e enfrentariam grande concorrência com espécies presentes (Eastick, 2002). Outrossim, as sementes de algodão normalmente não germinam se não são cobertas por terra. No Brasil é abundante a presença de capins como Braquiárias, Colômbia, Elefante (napier) e outros com alta capacidade competitiva, assim é pouco provável que tigüeras de margens de estrada se estabeleçam/colonizem estes habitats como plantas daninhas. Adicionalmente, o algodoeiro não possui características típicas das diferentes invasoras ruderais, forte competidoras ou tolerantes aos estresses (Pitelli *et al.*, 2005).

Quanto à polinização, esta seria a forma mais comum de escape gênico. Há grande variedade de plantas silvestres da família das malváceas no Brasil, porém as barreiras reprodutivas interespecíficas impedem a formação de híbridos na grande maioria dos casos. As únicas espécies com as quais o *Gossypium hirsutum* poderia trocar genes, gerando híbridos férteis são o algodoeiro selvagem do norte da Bahia (*Gossypium mustelinum*) e as raças botânicas de *G. hirsutum* (Marie Galante ou Mocó – de distribuição no nordeste brasileiro) e de *G. barbadense* (brasiliense - ou Rim-de-Boi), este último de distribuição mais difusa, além de híbridos naturais que surgiram pela introgressão entre as várias espécies encontradas no País. Estas áreas que contêm a distribuição natural destes algodoeiros foram recentemente levantadas e amostradas por

Barroso *et al.* (2005). Assim, o zoneamento proposto foi implantado visando proteger de possíveis contaminações as populações selvagens e ferais encontradas no Brasil. Recentemente o MAPA, estabeleceu as zonas de exclusão de cultivos de OGM de algodão no Brasil, para fins de proteção de tais germoplasmas.

http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2005/folder.2005-08-15.0415022412/foldernoticia.2005-09-26.0161761690/noticia.2005-10-26.2543269213/mostra_noticia.

- **Aspectos taxonômicos**

Gossypium L. é o gênero do algodoeiro da família das Malvaceae. Este gênero inclui aproximadamente 50 espécies que podem ser encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Quatro dessas são geralmente cultivadas em todo o mundo: *G. hirsutum*, *G. arboreum*, *G. barbadense* e *G. herbaceum* (Fryxell, 1984). A espécie mais comumente cultivada globalmente é a alotetraplóide ($2n = 4x = 52$) *Gossypium hirsutum*, que deve sua atual predominância à sua relativamente alta produtividade e ampla adaptação. Aproximadamente 90% ou mais do algodão produzido no mundo é plantado com cultivares de tipo *G. hirsutum*, muitos dos quais são derivados dos cultivares upland Americano (Niles & Feaster, 1984a). *Gossypium barbadense*, também um alotetraplóide, é um distante segundo lugar do *G. hirsutum* na produção dos EUA e mundial. Áreas muito pequenas da espécie diplóide ($2n = 26$) *G. herbaceum* e *G. arboreum* são cultivadas no Sudoeste da Ásia, principalmente nas áreas secas e improdutivas da Índia e Paquistão, não adequadas para *G. hirsutum* e *G. barbadense* (Niles & Feaster, 1984b).

Nos Estados Unidos são encontradas quatro espécies de *Gossypium*. Duas são espécies cultivadas: *G. hirsutum*, a espécie principal e comercialmente importante, também às vezes referida como algodão upland, e *G. barbadense*, a espécie secundária, também às vezes referida como “Sea Island”, ou algodão “Pima” (Niles & Feaster, 1984a). As duas outras espécies de *Gossypium*, *G. thurberi* e *G. tomentosum*, também alotetraplóides do Novo Mundo, são plantas silvestres do Arizona e Hawaí (Percival *et al.*, 1999), respectivamente.

- **Representantes brasileiros do gênero *Gossypium***

Em *G. hirsutum*, são reconhecidas as seguintes raças geográficas, a maioria delas encontradas na América Central e no México: *punctatum*, *marie-galante*, *palmeri*, *richmondi*, *morrili*, *yucatanense* e *latifolium*. Nesta última, enquadra-se o algodoeiro anual comercialmente cultivado (Penna, 2005).

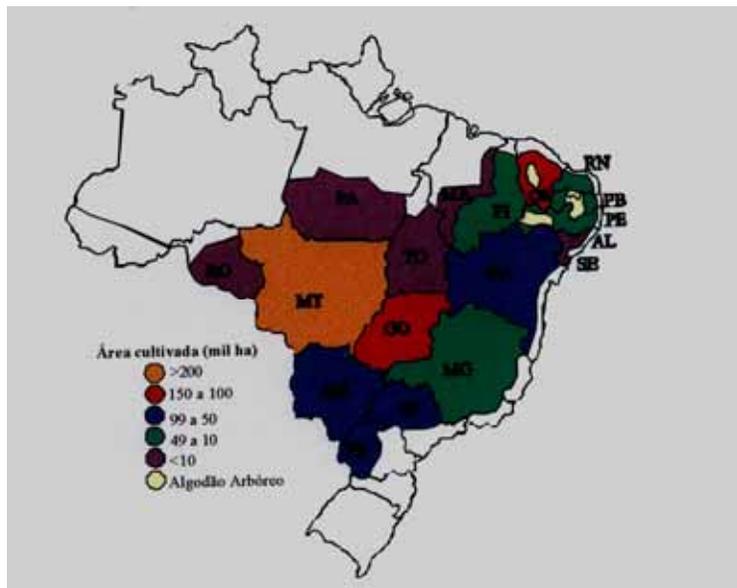
No Brasil, encontram-se tipos de algodoeiros silvestres de porte arbustivo diferentes do *G. hirsutum* raça *latifolium* (o algodoeiro cultivado). Todas as espécies e suas raças botânicas encontradas no País, podem ser hibridizadas sem problemas com o algodoeiro anual, artificialmente ou naturalmente pela ação de insetos polinizadores (McGregor, 1976). O mais importante que já foi largamente cultivado no semi-árido Nordeste é o *G. hirsutum* raça *marie galante* (Watt) Hutch., conhecida como Mocó. Este algodoeiro é originado das Antilhas e foi trazido para o Brasil pelos Holandeses ou Africanos (Moreira *et al.*, 1995) e restam atualmente pequenas lavouras em algumas localidades do interior do Nordeste. São encontradas também pequenas populações ferais

no alto de serras em alguns Municípios do Seridó da Paraíba e no Rio Grande do Norte. Ainda os mesmos autores, apontam que a outra espécie presente no Brasil, *G. barbadense* foi introduzida por povos pré-colombianos e sua fibra era utilizada na confecção de artesanatos têxteis por algumas etnias durante a pré-colonização. Sua variante mais importante, a raça *brasiliense*, é conhecida como “rim-de-boi” e tem este nome por ter as sementes agrupadas em uma estrutura que lembra um rim em um mesmo lóculo do capulho. O centro de origem/diversidade deste algodoeiro é a bacia Amazônica.

O controle genético desta característica foi elucidado por Turcotte & Percy, 1990, como sendo monogênico recessivo. Fryxell, 1979, aponta as duas possíveis vantagens seletivas do caráter na agricultura rudimentar: a facilidade de se descaroçar manualmente e a sementeira mais adequada do grupo de sementes. Outro variante, conhecido como “quebradinho”, apresenta as sementes soltas de maneira normal.

Estes algodoeiros têm ampla distribuição no país, em fundos de quintais e aldeias indígenas, especialmente pela sua tradição de planta medicinal. A única espécie nativa do Brasil é o tetraplóide *G. mustelinum*. Este algodoeiro foi descrito pela primeira vez por Watt (1907) e foi muitas vezes tratado como variantes de *G. hirsutum*. Suas avaliações mais recentes porém indicam que esta espécie é única (Wendel *et al.*, 1994). Sua distribuição é restrita ao seu centro de origem, o semi-árido nordestino (Freire, 2000). Ainda segundo o autor, apenas três agrupamentos de plantas desta espécie são conhecidas, duas delas de ocorrência ao norte do Estado da Bahia e uma no Estado do Rio Grande do Norte. A caprinocultura extensiva é a principal causa da redução drástica do tamanho das populações desta espécie. Os locais de ocorrência de *G. mustelinum* são atualmente muito distantes das grandes culturas de algodão comerciais do Brasil. Outros tipos ocorrem principalmente no Nordeste, conhecidos como “Verdões” e provavelmente são híbridos naturais entre os algodoeiros Mocós e o cultivado *G. hirsutum* var. *latifolium*. Devido ao seu isolamento geográfico é pouco provável que tenham ocorrido hibridações entre *G. mustelinum* e as outras espécies e raças encontradas na região. O algodoeiro Mocó ocorre principalmente no Nordeste brasileiro, mas distribui-se também em maior escala em quintais de residências urbanas e de fazendas em outras regiões brasileiras, inclusive no Brasil central. O “quebradinho” ou *G. barbadense* r. *barbadense* também ocorre como agrupamentos silvestres não-cultivados e são também encontrados espalhados pelo País em quintais e jardins.

A figura a seguir mostra a distribuição geográfica de algodoeiros arbóreos no Brasil (em amarelo-claro).



Fonte: Amorim-Neto *et al.*, 2001.

- **Características dos genomas**

O gênero *Gossypium* inclui aproximadamente 45 espécies diplóides e 5 alotetraplóides (Brubaker *et al.*, 1999). A maioria das espécies silvestres são diplóides e são divididas em grupos genômicos baseados na citologia, por semelhanças em tamanho e estrutura dos cromossomos. Elas existem em três principais centros de diversidade: as espécies Afro-asiáticas (genomas A-, B-, E-e F), as espécies Australianas (genomas C-, G-, e K), e as espécies do Novo Mundo (genoma D) (Small & Wendel, 2000).

Os genomas são semelhantes entre parentes próximos, e isso é refletido na capacidade das espécies relacionadas produzirem híbridos que apresentam pareamento normal na meiose e alta fertilidade do F1. Entretanto cruzamentos mais amplos são frequentemente difíceis ou inviáveis, e os que são bem sucedidos tipicamente exibem anormalidades na meiose ou outros tipos de deficiências dos híbridos. A Tabela 2 resume os oito grupos genômicos designados de A a G, mais K. As observações coletivas de comportamento no pareamento, tamanhos de cromossomos e fertilidade relativa dos híbridos interespecíficos foram usadas para criar estes grupos (Brubaker *et al.*, 1999).

Tabela 2: Tipos genômicos de *Gossypium*, número de espécies e distribuição geográfica (adaptado de Brubaker *et al.*, 1999).

Genomas	Número de espécies	Localização geográfica
A	2	África/Ásia
B	4	África
E	7	Arábia
F	1	África
C	2	Austrália
G	3	Austrália
K	12	Austrália
D	13	Novo Mundo
AD	5	Novo Mundo

Muitos sub-tipos dos tipos genômicos foram identificados. Como discutido anteriormente, duas espécies diplóides, *G. arboreum* e *G. herbaceum*, são de importância agrônômica regional na Ásia. Os mais importantes dos algodoeiros agrícolas, *G. hirsutum* e *G. barbadense*, parecem ter se originado dos genomas A e D. Outros membros deste grupo são *G. tomentosum* (uma espécie silvestre nativa do Havaí), *G. mustelinum* (Brasil), *G. darwinii* (Ilhas Galápagos) e *G. lanceolatum* (México). Os alotetraplóides, em suas formas silvestres, crescem próximos aos oceanos como invasores da orla marítima e adjacências. Foi sugerido que as espécies cultivadas desenvolveram-se dessas espécies (Fryxell, 1979).

4.Importância das pragas na cultura do algodoeiro

Apesar do grande sucesso da cultura do algodoeiro hoje no Brasil, existe grande preocupação pela sua sustentabilidade nos atuais patamares de produtividade e lucratividade, pois a cultura é alvo de um grande número de pragas (insetos e ácaros) e doenças de várias naturezas. As produções elevadas por área são mantidas à custo de grandes esforços de controle destes organismos, via de regra de grandes quantidades e tipos de pesticidas, que em última análise tornam seu cultivo alvo de críticas por preocupação com a contaminação do homem, da fauna e dos recursos edáficos e hídricos.

Uma grande variedade de insetos e ácaros são pragas costumeiras do algodoeiro no Brasil. Algumas delas são também vetores de importantes doenças, como os pulgões (*Aphis* spp.), que transmitem e disseminam a virose conhecida como “doença azul”. A partir de 1983, com a introdução no país do bicudo (*Anthonomus grandis*), este tornou-se uma das principais praga desta cultura, causando grandes prejuízos e sendo ainda responsável pelas grandes mudanças tecnológicas e de área de cultivo pelas quais a cotonicultura passou desde então. A cultura do algodão é notória como grande consumidora de pesticidas. Larvas e adultos de lepidópteros constituem-se também num grupo importante de pragas que afligem a cultura. As mais importantes nas condições brasileiras são: o “curuquerê” - *Alabama argillacea*, a lagarta das maçãs - *Heliothis virescens*, a lagarta rosada - *Pectinophora gossypiella*, e a lagarta do cartucho do milho - *Spodoptera frugiperda*. Esta última é uma praga polífaga sendo o principal inseto causador de prejuízos no milho no Brasil. As demais são mais restritas à cultura do algodão. Os curuquerês têm hábitos migratórios e aparecem mais cedo nas lavouras em relação aos demais lepidópteros, alimentando-se dos limbos foliares e na falta de folhas também de estruturas reprodutivas (Medeiros *et al.*, 2003). Atacam inicialmente as folhas superiores e em reboleiras e estima-se que cada lagarta consuma em média 66 cm² de área foliar. Prejuízos de 21 a 31% na produtividade sob condições simuladas foram estimados por Marchini *et al.*, 1976.

A lagarta das maçãs, considerada praga secundária assumiu importância no cenário atual da cotonicultura. As lagartas recém-nascidas alimentam-se de tecidos novos, folhas ou botões florais, causando quedas destes últimos. Posteriormente atacam as maçãs onde se alimentam das fibras e sementes em formação. Estima-se que causem perdas de produção na região meridional brasileira da ordem de 18 a 32% e de 20% no Nordeste do Brasil (respectivamente Santos, 1977 e Degrande, 1988).

A lagarta do cartucho do milho transformou-se na última década em importante praga do algodão, especialmente nas áreas de cerrado do Brasil Central, no entanto não há estimativas de prejuízos causados na literatura.

A lagarta rosada, pode causar grandes prejuízos caso passem despercebidos os sinais de sua infestação no campo. As larvas, após a eclosão, penetram diretamente nos frutos e somente é percebido nas maçãs os orifícios de saída. As lagartas alimentam-se das sementes no interior da maçã, destruindo-as com perda parcial ou total de fibras e sementes. Maiores populações incidem em culturas plantadas tardiamente. Não se encontram na literatura recente estimativas de danos à produtividade, mas presume-se que podem chegar a 45%, baseando-se em trabalho de Davidson & Seara, 1966.

5.Elementos genéticos presentes na construção do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23

- **Descrição do sistema de transformação Cry1F**

O Evento 281-24-236 foi transformado com o plasmídeo pAGM281, usando transformação mediada por *Agrobacterium* (Narva, *et al.*, 2001 a,b). O plasmídeo pAGM281 continha os genes *cryIF* e *pat* codificando seqüências juntamente com os componentes reguladores necessários para suas expressões no genoma do algodão. Os dois genes e seus elementos reguladores estão ligados no mesmo vetor de transformação. O plasmídeo Ti na cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* foi desarmado pela remoção de seu T-DNA natural. Ao invés disso foi usado o sítio do T-DNA no plasmídeo binário pAGM 281 codificando os genes *cryIF* e *pat*.

Segmentos de cotilédones do germoplasma de algodão GC510 foram isolados de plântulas de 7-10 dias germinadas *in vitro*. Os segmentos foram co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* desarmado cepa LBA4404 que continha o plasmídeo pAGM281 codificando os genes *cryIF* e *pat*. Após o procedimento de transformação, os segmentos tratados foram transferidos para meio de indução de calo que continha glufosinato de amônio para selecionar apenas os calos que expressavam a proteína PAT e, portanto, haviam sido transformados com sucesso. O meio de indução também continha o antibiótico carbenicilina para eliminar quaisquer *Agrobacterium* remanescentes.

As plantas transgênicas foram transplantadas para o solo e mantidas em câmaras de crescimento para aclimação sendo subseqüentemente transferidas para a casa de vegetação. A análise Southern do evento transgênico 281-24-236 confirmou a presença dos genes *cryIF* (synpro) e *pat*. Os transformantes primários foram testados para resistência a insetos contra a praga-alvo, a lagarta da maçã, pela condução de bio-ensaios com discos de folhas. O evento transgênico 281-24-236 foi cruzado com o genótipo elite PSC-355 para obter sementes para novas pesquisas e desenvolvimento.

A construção pAGM281 usada na transformação da linhagem 281-24-236 contém os seguintes componentes: o gene de cadeia completa *cryIF* comandado pelo promotor 4OCSΔMas2' e o gene *pat* comandado pelo promotor do milho Ubiquitina 1. Ambos os genes são terminados pela seqüência de terminação bidirecional ORF25. A configuração da construção é a seguinte: ZmUbi1/*pat*/ORF25*cryIF*4OCSΔMas2' .

- **Resumo dos elementos genéticos do evento 281-24-236**

Um resumo dos elementos genéticos contidos na T-DNA do plasmídeo pAGM281 é mostrado na Tabela 3 .

Tabela 3: Elementos genéticos da região T-DNA do plasmídeo pAGM281

Elemento Genético	Tamanho (kbp)	Local (bp)	Detalhes
(4OCS) Δ mas 2'	0.61	7028-7636 (complementar)	Promotor da manopina sintase de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa LBA 4404 pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983), GenBank Locus ATACH5, Acesso X00493), incluindo 4 cópias do realçador da octopina sintase (OCS) de pTiAch5 (Ellis <i>et al.</i> ,1987), GenBank Número de Acessos I05704 to I05712).
<i>cryIF</i> (synpro)	3.45	3571-7017 (complementar)	Sintético, otimizado p/ plantas, versão comprimento total de CryIF de <i>B.t. var. aizawai</i> .
ORF25 poliA	0.73 ¹	2818-3544	Terminador bidirecional de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa LBA 4404 pTi15955 (Barker <i>et al.</i> ,1983), GenBank Locus ATACH5, Acesso X00493)
<i>pat</i>	0.55	2259-2810	O gene sintético de resistência a glufosinato de amônio otimizado para plantas, baseado em uma seqüência do gene de fosfotricina acetiltransferase de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Eckes <i>et al.</i> , 1989)
Ubi Zm1	1.99	260-2252	Promotor <i>Zea mays</i> promoter mais <i>Zea mays</i> exon 1 (realçado não traduzido) e intron 1 (Christiansen <i>et al.</i> ,1992), (US Patent 5614399, GenBank Acesso I38571)

¹ Tamanho dos elementos atualizados em relação aos apresentados em Narva *et al.*, 2001 a,b, para refletir a informação completa da seqüência obtida de Green *et al.*, 2002.

- **Descrição do sistema de transformação Cry1Ac**

O Evento 3006-210-23 foi transformado com o plasmídeo pMYC3006, usando transformação mediada por *Agrobacterium* (Narva *et al.*, 2001 a,b). O plasmídeo pMYC3006 contem as seqüências de codificação *cryIAc* e *pat*, juntamente com os componentes necessários para suas expressões no genoma do algodão.

A semelhança dos procedimentos realizados na transformação com o gene *cry 1F*, segmentos de cotilédones de germoplasma de algodão GC510 foram isolados de plântulas de 7-10 dias de idade germinadas in vitro. Os segmentos foram cultivados

juntamente com *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 que continha o plasmídeo pMYC3006 codificando os genes *cryIAc* e *pat*. Em seguida ao procedimento de transformação, segmentos tratados foram transferidos para meio de indução de calo que continha glufosinato de amônio para selecionar apenas aqueles calos que expressavam PAT e, portanto, haviam sido transformados com sucesso. O meio de indução também continha o antibiótico carbenicilina para eliminar qualquer *Agrobacterium* remanescente.

As plantas transgênicas foram transplantadas no solo, mantidas em câmaras de crescimento para aclimatação e subseqüentemente transferidas para a casa de vegetação. Análise Southern do evento 3006-210-23 confirmou a presença dos genes *cryIAc* e *pat*. Os transformados primários foram testados para resistência a insetos contra a praga-alvo, a lagarta da maçã, pela condução de bio-ensaios em discos de folhas. O Evento 3006-210-23 foi cruzado como o genótipo elite PSC-355 para obter sementes para pesquisas adicionais e desenvolvimento do produto final.

A transformação do algodão da linha 3006-210-23 foi conduzida com a construção pMYC3006 na qual o gene *cryIAc* é dirigido pelo promotor Ubiquitin1 do milho e o gene *pat* é dirigido pelo promotor 4OCSΔMas2'. Ambos os genes são terminados pela seqüência de terminação bidirecional ORF25. A configuração da construção é a seguinte: UbiZm1/*cryIAc*(synpro)/-Orf25\pat\4OCSΔMas2' (ver Tabela 4).

- **Resumo dos elementos genéticos do evento 3006-210-23**

Um resumo dos elementos genéticos contidos no T-DNA do plasmídeo pMYC3006 é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Elementos genéticos da região T-DNA do plasmídeo pMYC3006.

Os tamanhos são baseados no mapa atualizado do plasmídeo, como em Green et al., 2002.

Elemento Genético	Tamanho (kbp)	Local (bp)	Detalhes
Ubi Zm1	1.99	6080-8072 (complementar)	Promotor de <i>Zea mays</i> mais exon1 de <i>Zea mays</i> exon1 (realçador não traduzido) e intron1 (Christiansen <i>et al.</i> ,1992,) (US Patent 5614399, GenBank Acesso I38571)
<i>cryIAc</i> (synpro)	3.47	2587-6057 (complementar)	Versão sintética, otimizada p/ plantas, cadeia completa de <i>CryIAc1</i> de <i>B.t. var. kurstaki</i> .
ORF25 poliA	0.73	1835-2561	Terminador bidirecional de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi15955 (Barker <i>et al.</i> ,1983), GenBank Locus ATACH5, Acesso X00493)
<i>pat</i>	0.55	1276-1827	O gene sintético de resistência a glufosinato otimizado para plantas, baseado numa seqüência gênica de fosfinotricina acetiltransferase de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Eckes <i>et al.</i> , 1989)

(4OCS) Δ mas 2'	0.61	643-1251	Promotor da manopina sintase de pTi15955 (Barker et al.,1983, GenBank Locus ATACH5, Acesso X00493), incluindo 4 cópias do realçador da octopina sintase (OCS) de pTiAch5 (Ellis et al.,1987, GenBank Acesso Numbers I05704 to I05712).
------------------------	------	----------	--

6.Desenvolvimento do evento 281-24-236/3006-210-23

Dois eventos desenvolvidos inicialmente, evento 281-24-236 e evento 3006-210-23 foram posteriormente combinados, através de cruzamentos, para produzir o evento 281-24-236/3006-210-23 (Relatório de Biossegurança do Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23, páginas 49-52; processo CTNBio n°: 01200.005322/2006-55).

- **Evento 281-24-236**

O evento Cry1F 281-24-236 da Dow AgroSciences foi desenvolvido através da transformação do cultivar de algodão ‘Germain’s Acala GC510’ (*Gossypium hirsutum* L.) liberado em 1984 nos EUA, por Germain’s Agribusiness, Inc., retrocruzando o transformado original (T0) com o germoplasma da Phytogen Seed Company PSC-355. GC510 era uma linhagem de algodão de propriedade da Acala adaptada para o Vale San Joaquin da Califórnia. A linhagem GC510 foi usada por causa de sua facilidade de regeneração no sistema de cultura de tecidos usado no processo para produzir plantas transgênicas. Pesquisadores (Trolinder *et.al.* – comunicação pessoal) demonstraram que a GC510 tinha pré-condições para responder favoravelmente à cultura de tecido. A linhagem GC510, embora não seja mais amplamente plantada, é ainda uma linhagem comercialmente aceitável.

A Phytogen Seed Company, LLC, desenvolveu PSC-355 a partir de germoplasma licenciado da Mississippi State University e requereu proteção varietal de acordo com as emendas de 1994 do U.S. Plant Variety Protection Act de 1970. Todos os testes do evento Cry1F foram conduzidos em linhagens com introgressão em PSC-355 em vários graus. A PSC-355 foi especificamente desenvolvida para produção na região do Delta do Mississippi nos EUA, mas demonstrou ampla adaptação para produção ao Sul. A característica Cry1F tem sido transferida para outras linhagens comerciais de algodão usando-se técnicas convencionais de melhoramento.

Em resumo a transformação para criar o evento 281-24-236 foi executada na linhagem de algodão GC510 da Acala. A linhagem original transformada (T0) foi cruzada com a linhagem de algodão PSC-355, desenvolvida pela Phytogen Seed Company, LLC. A primeira geração (F1) desse cruzamento foi retrocruzada por três gerações adicionais para PSC-355, para criar uma linhagem BC3F1 do evento 281-24-236.

- **Evento 3006-210-23**

O evento 3006-210-23 da Dow AgroSciences Cry1F foi desenvolvido através da transformação do cultivar de algodão ‘Germain’s Acala GC510’ (*Gossypium hirsutum* L.) liberado em 1984 nos EUA, por Germain’s Agribusiness, Inc., retrocruzando o transformado original (T0) com o germoplasma de Phytogen Seed Company PSC-355. A GC510 era uma linhagem de algodão de propriedade da Acala e adaptada para o Vale San Joaquin da Califórnia.

A linhagem original transformada (T0) foi autofecundada duas vezes e então cruzada com a linhagem de algodão PSC-355, desenvolvida por Phytogen Seed Company, LLC. A primeira (F1) geração foi retrocruzada por três gerações adicionais para PSC-355, para criar a linhagem BC3F1 do evento 3006-210-23.

- **Evento 281-24-236/3006-210-23**

Os eventos 281-24-236 da geração BC3F1 e evento 3006-210-23 da geração BC3F1 foram então cruzados e autofecundados até a geração F3, constituindo a semente designada como 281-24-236/3006-210-23, que contém os genes para expressão das proteínas Cry1F, Cry1Ac e PAT, também designada como evento 281-24-236/3006-210-23, ou cultivar MXB-13. O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 é destinado a proteger a cultura do ataque de importantes pragas de lepidópteros do algodão no Brasil, como as lagartas da maçã (*Heliothis virescens*), (*Helicoverpa zea*), lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), curuquerê (*Alabama argillacea*) e lagarta rosada (*Pectinophora Gossypiella*).

7.Eficácia do Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23

Um estudo delineado com o objetivo de investigar a eficiência e praticabilidade agrônômica do algodão geneticamente modificado MXB-13, expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac, submetido ou não à aplicação de inseticida, no manejo do curuquerê, *Alabama argillacea* Hueb, da lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens* Fabr. e da lagarta militar ou lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* Smith foi conduzido, com autorização da CTNBio (processo CTNBio # 01200.000443/2003-68) na safra 2005/06.

O ensaio foi realizado na Fazenda Experimental da Dow AgroSciences Industrial Ltda (Figura 9), Município de Indianópolis, MG, utilizando-se algodão geneticamente modificado MXB-13 expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac e sua versão convencional não-transgênica PSC-355. A área experimental foi semeada dia 21/12/05 utilizando-se espaçamento de 0,90 m entre linhas. Por ocasião da avaliação inicial a cultura apresentava-se com cerca de 0,60 cm de altura, no estágio de desenvolvimento vegetativo e início da emissão de botões florais.



Figura 09: Vista geral do ensaio de eficácia, instalado em 22/12/2005 na Unidade Operativa de Indianópolis, MG, da Dow AgroSciences Industrial Ltda (Processo CTNBio # 01200.000443/2003-68)

O delineamento estatístico utilizado foi de blocos casualizados, com 4 tratamentos e 05 repetições. Cada parcela foi constituída de 4 linhas com 6 metros de comprimento, onde somente duas linhas foram consideradas úteis para amostragem, sendo que na primeira linha foi realizada a liberação de lagartas de primeiro ou segundo instar de *S. frugiperda* e na segunda linha, lagartas de primeiro ou segundo instar de *H. virescens*. Houve uma infestação natural da lagarta curuquerê, *A. argillacea*, na área experimental. A mesma foi avaliada nas duas linhas úteis da parcela. As lagartas de *S. frugiperda* e *H. virescens*, foram fornecidas pela BUG Agentes Biológicos de Piracicaba-SP. As lagartas foram enviadas em potes com dieta especial e acondicionadas em caixas de isopor.

A liberação de lagartas foi realizada manualmente, com um pincel fino para facilitar o processo de retirada das mesmas dos potes a dieta. A partir disso, as lagartas foram distribuídas no ápice das plantas, mais especificamente na região da última folha emitida. Foram liberadas em média 10 lagartas/planta em 20 plantas por parcela no caso de *S. frugiperda* e 5 lagartas/planta em 10 plantas/parcela no caso de *H. virescens*. As liberações foram realizadas em 10/02, 24/02, 05/03, 10/03 e 06/04/2006.

Na amostragem 10 plantas / linha foram observadas visualmente de forma integral, baixeiro, terço-médio e ponteiros, verificando-se o número de ovos e de lagartas das 3 espécies, diferenciando em pequena, ou seja de 1^o a 3^o, e grande 4^o a 5^o instares, o número de estruturas reprodutivas atacadas, e por fim, a porcentagem de desfolha.

Os tratos culturais constaram de capinas manuais e aplicação de regulador de crescimento Pix. Quando necessário foram utilizados produtos específicos para o controle de pulgões e mosca-branca, imidacloprid e thiametoxan, e ácaros, abamectina e óxido de fenbutatina. No caso do bicudo utilizou-se parathion-methyl e endosulfan.

Os tratamentos testados encontram-se na Tabela 5. As aplicações de Tracer nas parcelas algodão convencional+inseticida e algodão Bt+inseticida, foram realizadas entre 2 e 5 dias após a liberação das lagartas (13/02, 01/03, 08/08 e 10/04). O equipamento utilizado foi o Pulverizador Costal Pessurizado com CO₂ à pressão de 20 psi e acoplado a uma barra de 2 m munida de 4 pontas TXVK-12. A dose utilizada foi de 57.6 g ia/ha (120 mL/ha) em todas as aplicações.

Foram realizadas 5 avaliações: 15/02/06; 22/02/06; 04/03/06; 10/03/06 e 12/04/06. Entre 14/03/06 e 04/04/06, foram necessárias aplicações específicas em todos os tratamentos para o bicudo, *A. grandis*, intervalo este onde não houve liberação de lagartas e avaliações. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias transformadas foram comparadas por Tukey a 5% de probabilidade. A eficiência dos tratamentos na redução do número total de lagartas foi calculada por meio da fórmula proposta por Abbott (1925).

Tabela 5: Tratamentos testados no manejo de *Alabama argillacea*, *Spodoptera frugiperda* e *Heliothis virescens*. Indianópolis, MG, 2006.

<i>Tratamentos</i>
Algodão Bt MXB-13 (Cry1F+Cry1Ac) + Inseticida
Algodão Bt MXB-13 (Cry1F+Cry1Ac)
Algodão Convencional (PSC-355) + Inseticida
Algodão Convencional (PSC-355)

- **Efeito dos tratamentos sobre a Lagarta Curuquerê, *Alabama argillacea***

Na primeira avaliação (15/02/06), já foi possível verificar os danos inicialmente causados pela lagarta curuquerê no algodão não Bt PSC-355 (Figura 10). Nesta avaliação observou-se o efeito do algodão MXB-13 (Cry1F + Cry1Ac), também conhecido como evento 281-24-236/3006-210-23, com e sem aplicação de inseticida, sobre o número médio de lagartas de *A. argillacea*, diferindo significativamente do algodão convencional (Tabela 6). É importante salientar, que o tratamento algodão convencional submetido à aplicação de Tracer (120 mL/ha), não diferiu estatisticamente dos tratamentos algodão Bt com e sem inseticida e também da testemunha (algodão convencional sem inseticida). Na última avaliação (12/04/06) a população de insetos reduziu drasticamente. Tal fato, pode ser explicado pela necessidade de realizar aplicações de inseticidas alternativos para o controle do Bicudo, *A. grandis*, que estava infestando a área experimental e, com isso, a população natural de curuquerê diminuiu e não mais se recuperou até a última avaliação. É importante se observar que a população do curuquerê se manteve próxima de zero nos tratamentos algodão Bt. Na testemunha a população atingiu 38,2 lagartas / 10 plantas em 04/03, nível este acima do nível crítico recomendado de controle, que é de 20 lagartas / 10 plantas.



Figura 10: Dano inicialmente causado pela Lagarta curuquerê no algodão convencional PSC-355. Indianópolis, MG, 2006

Tabela 6: Efeito dos tratamentos, sobre o número médio de lagartas do Curuquerê (pequena e grande), *Alabama argillacea*. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de lagartas, <i>A. argillacea</i> , em 10 plantas ^{1/2}									
	Pequena - 1 ^o a 3 ^o ínstaes					Grande - 4 ^o a 5 ^o ínstaes				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04	15/02	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	0,0 b	0,2 b	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,2 b	0,0 a
Algodão Bt	0,4 b	0,2 b	0,0 b	0,0 b	0,0 a	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 a
Algodão Convenc. + Inseticida	0,6 b	1,2 b	0,6 b	0,2 b	0,0 a	0,4 b	0,2 b	0,0 b	0,0 b	0,0 a
Algodão Convencional	10,8 a	10,2 a	17,2 a	4,4 a	2,8 a	6,2 a	13,8 a	21,2 a	22,4 a	0,8 a

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”.

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

^{3/} Data da avaliação.

A eficiência na redução do número médio de lagartas curuquerê (pequena e grande), durante todo o período de realização do ensaio foi satisfatória tanto no algodão Bt com ou sem inseticida (próximo a 100% de controle) quanto no convencional com inseticida (entre 90 e 100%) (Figura 11).

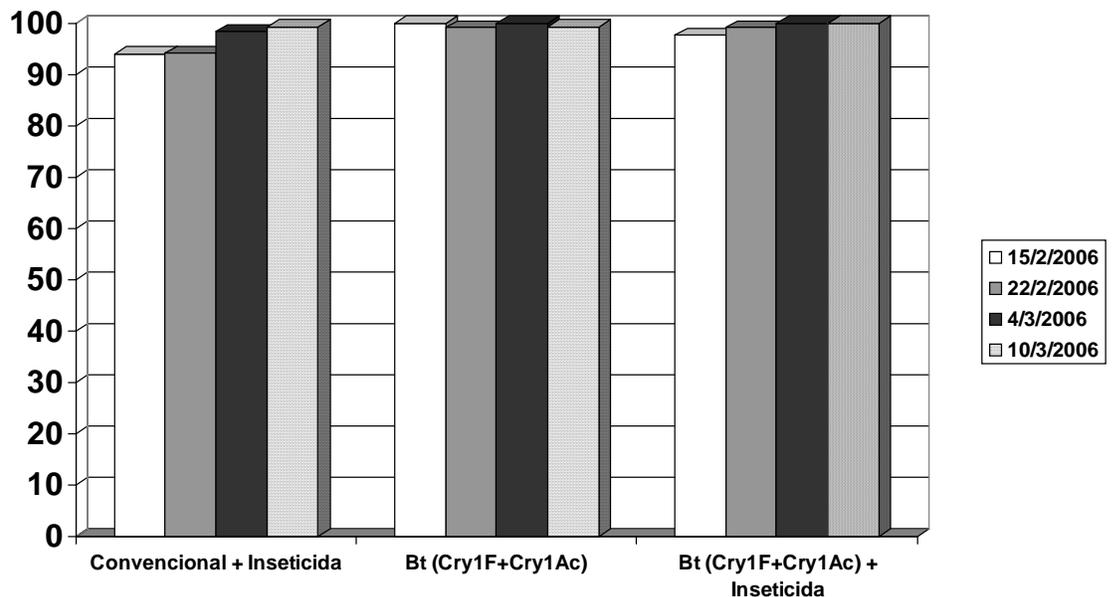


Figura 11: Porcentagem de redução do número médio de Lagarta Curuquerê (pequena+ grande), *Alabama argillacea* - Eficiência em % calculada pela fórmula proposta por Abbott (1925). Indianópolis, MG, 2006.

Analisando a Tabela 7, pode-se constatar que não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhuma das avaliações em relação ao número de ovos/planta. Na terceira e quarta avaliações verificou-se maior número de ovos presentes nas plantas.

Tabela 7: Número médio de ovos da Lagarta Curuquerê, *Alabama argillacea*, sob diferentes tratamentos. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de ovos de <i>A. argillacea</i> , em 10 plantas ^{1/2}				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	5,4 a	4,0 a	62,2 a	23,0 a	2,8 a
Algodão Bt	3,4 a	4,4 a	84,4 a	55,4 a	1,2 a
Algodão Convenc. + Inseticida	3,0 a	2,8 a	73,6 a	68,6 a	0,8 a
Algodão Convencional	2,8 a	3,0 a	66,2 a	19,0 a	0,8 a

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

^{3/} Data da avaliação.

- **Efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de desfolha das plantas**

Danos iniciais de desfolha causados por insetos-praga do algodoeiro, mostrando o contraste do algodão geneticamente modificado MXB-13 e o parental não-transgênico (PSC-355), são mostrados na figura 12.



Figura 12: Diferença de desfolha inicial no algodão transgênico MXB-13 e na linhagem original não-transgênica PSC-355. Indianópolis, MG, 2006.

Conforme mostra a Tabela 8, o algodão Bt (com e sem inseticida) manteve-se praticamente sem desfolha por lagartas (próximo de 0% de desfolha), diferindo significativamente do algodão convencional com aplicação de inseticida e da testemunha. O algodão convencional que recebeu a aplicação de Tracer (120 mL/ha), apresentou baixa porcentagem de desfolha (2,3 a 5,8%) nas avaliações e também do algodão convencional sem inseticidas (8,6 a 21,4%).

Tabela 8: Porcentagem média de desfolha. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	% média de desfolha ^{1/2}				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	0,0 c	0,0 c	0,0 b	0,0 c	0,0 c
Algodão Bt	0,1 c	0,1 c	0,0 b	0,1 c	0,0 c
Algodão Convenc. + Inseticida	5,6 b	5,8 b	2,2 b	2,5 b	2,3 b
Algodão Convencional	8,6 a	11,9 a	20,3 a	21,4 a	15,6 a

^{1/}Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = \arcsin\{(x+1/100)\}^{1/2}$ ”

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

^{3/} Data da avaliação.

- **Efeito dos tratamentos sobre a Lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens***

Analisando o número médio de lagartas pequenas de *H. virescens* (Tabela 9), pode-se constatar que os tratamentos algodão Bt (com e sem aplicação de inseticida), apresentaram infestação (0 a 0,4 lagartas/10 plantas) inferior à testemunha (0,8 a 10,6 lagartas) e não diferiram estatisticamente entre si em nenhuma das avaliações. O algodão convencional + inseticida (0,2 a 3 lagartas / 10 plantas) não diferiu significativamente do algodão Bt mas também não diferiu da testemunha (algodão convencional sem inseticida) na maioria das avaliações. Não houve ocorrência de lagartas grandes durante todo o período do ensaio nas parcelas com algodão Bt (com ou sem inseticida). No caso do algodão convencional com inseticida as infestações ocorreram a partir de 04/03 (0,8 a 4 lagartas / 10 plantas), diferindo significativamente da testemunha nas avaliações de 22/02, 04/03 e 10/03 (0,2 a 3,2 lagartas/10 plantas).

Tabela 9: Efeito dos tratamentos, sobre o número médio de Lagarta-da-maçã (pequena e grande), *Heliothis virescens*. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de lagartas, <i>H. virescens</i> , em 10 plantas ^{1/2}									
	Pequena - 1 ^o a 3 ^o ínstaes					Grande - 4 ^o a 5 ^o ínstaes				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04	15/02	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,4 a	0,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 a
Algodão Bt	0,0 b	0,2 ab	0,2 b	0,4 ab	0,4 a	0,0 a	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 a
Algodão Conv. + Insetic.	3,0 b	0,2 ab	1,0 ab	1,0 ab	1,2 a	0,0 a	0,0 b	0,8 b	0,4 b	4,0 a
Algodão Convencional	10,6 a	0,8 a	2,4 a	2,4 a	4,8 a	0,2 a	1,4 a	3,2 a	2,4 a	3,2 a

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”.

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

^{3/} Data da avaliação.

Em relação a porcentagem de redução do número de lagartas (Figura 13), verifica-se que o algodão Bt com ou sem aplicação de inseticida, apresentou eficiência satisfatória (>90%) sobre o controle de *H. virescens*, durante todo o decorrer do ensaio. No algodão convencional com aplicação de inseticida, a eficiência manteve-se ao redor de 85% nas duas primeiras avaliações, caindo posteriormente para próximo de 70% em 04 e 10/03, possivelmente, em função do hábito da praga de se estabelecer internamente às brácteas e sépalas, dificultando o contato com o produto. Em 12/04 a eficácia do tratamento algodão convencional com inseticida atingiu apenas 40%. Cabe ressaltar que entre 10/03 e 10/04 não houve aplicação do inseticida Tracer já que endosulfan e parathion-methyl foram aplicados para controle do bicudo.

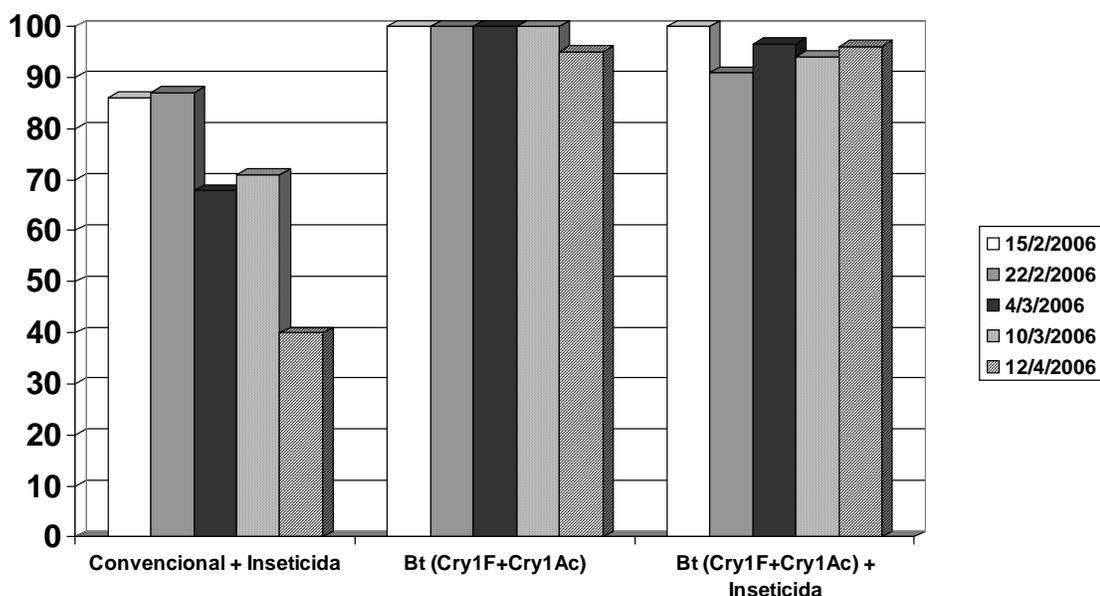


Figura 13: Porcentagem de redução do número médio de Lagarta-da-maçã (pequena + grande), *Heliothis virescens* - Eficiência em % calculada pela fórmula proposta por Abbott (1925). Indianópolis, MG, 2006.

Analisando-se o número médio de ovos da Lagarta-da-maçã, *H. virescens* (Tabela 10), verifica-se que nas avaliações de 15/02 e 22/02, a oviposição da praga foi menor na testemunha (algodão convencional sem inseticida). A desfolha causada pelo curuquerê na testemunha pode ter influenciado na oviposição de adultos de *H. virescens* devido a maior área foliar nos tratamentos algodão Bt e algodão convencional com inseticida. Nas avaliações de 04/03 e 10/03 não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 10: Número médio de ovos de Lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens*, sobre diferentes tratamentos. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de ovos de <i>H. virescens</i> , em 10 plantas ^{1/2}				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	10,8 a	11,0 a	5,2 a	2,0 a	0,0
Algodão Bt	10,6 a	8,8 ab	3,2 a	1,2 a	0,0
Algodão Convenc. + Inseticida	6,8 ab	4,0 ab	3,4 a	1,4 a	0,0
Algodão Convencional	1,6 b	2,2 b	7,2 a	0,4 a	0,0

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$).

^{3/} Data da avaliação.

No caso do número médio de estruturas reprodutivas danificadas pela Lagarta-da-maçã, *H. virescens* (Tabela 11), constata-se que o algodão Bt, com e sem aplicação de inseticida (entre 0,2 e 8,8 estruturas danificadas), e o algodão convencional com aplicação de inseticida (entre 1 e 20,4 estruturas danificadas), apresentaram menores danos causados em relação a testemunha (entre 14 e 24 estruturas danificadas). Tal fato,

fica caracterizado também pela diferença estatística entre os tratamentos citados anteriormente e a testemunha (algodão convencional sem inseticida) ao longo das avaliações.

Tabela 11: Efeito dos tratamentos, sobre o número médio de estruturas reprodutivas danificadas pela Lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens*. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de estruturas reprodutivas danificadas por <i>H. virescens</i> , em 10 plantas ^{1/2}				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	0,8 bc	0,4 b	5,2 b	6,0 a	2,0 c
Algodão Bt	0,2 c	0,8 b	6,8 b	8,8 a	4,0 bc
Algodão Convenc. + Inseticida	7,8 ab	1,4 b	11,6 b	11,4 a	20,4 ab
Algodão Convencional	15,8 a	14,0 a	24,8 a	17,4 a	24,0 a

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$);

^{3/} Data da avaliação.

- **Efeito dos tratamentos sobre a Lagarta Militar, *Spodoptera frugiperda***

A população de *S. frugiperda*, manteve-se numericamente baixa (ao redor de 1 lagarta por 10 plantas) durante a realização do ensaio, apesar das liberações periódicas de lagartas, porém com nível de infestação (8 a 10% de plantas infestadas) sempre superior ao nível de ação recomendado que é de 5% (Tabela 12). Não houve diferença estatística entre os tratamentos em todas as avaliações

Tabela 12: Efeito dos tratamentos, sobre o número médio de Lagarta militar (pequena e grande), *Spodoptera frugiperda*. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de lagartas, <i>S. frugiperda</i> , em 10 plantas ^{1/2}									
	Pequena - 1 ^o a 3 ^o ínstaes					Grande - 4 ^o a 5 ^o ínstaes				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04	15/02	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,2 a	0,0 a	0,0 a
Algodão Bt	0,4 a	0,2 a	0,0 a	0,6 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,2 a	0,0 a	0,0 a
Algodão Conv. + Insetic.	0,0 a	0,4 a	0,2 a	0,2 a	0,8 a	0,2 a	0,0 a	0,2 a	0,6 a	0,4 a
Algodão Convencional	1,0 a	1,0 a	1,0 a	0,8 a	0,0 a	0,0 a	0,4 a	0,4 a	0,2 a	0,0 a

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$);

^{3/} Data da avaliação.

No que diz respeito ao número médio de estruturas danificadas por *S. frugiperda* (Tabela 13), verifica-se que nas 3 primeiras avaliações os tratamentos algodão Bt (com e sem aplicação de inseticida) apresentaram menos que 3 estruturas

danificadas/10 plantas e diferiram significativamente da testemunha (algodão convencional sem inseticida) com 8 a 26 estruturas danificadas. Na valiação de 10/03 não houve diferença estatística entre algodão Bt com (0,8) e sem inseticida (4,8), entretanto o tratamento sem inseticida não diferiu da testemunha (14,2 estruturas danificadas). Em duas ocasiões (15/02 e 04/03) o tratamento algodão Bt sem inseticida diferiu significativamente do algodão convencional com inseticida.

Tabela 13: Efeito dos tratamentos, sobre o número médio de estruturas reprodutivas danificadas pela Lagarta militar, *Spodoptera frugiperda*. Indianópolis, MG, 2006.

Tratamentos	Número médio de estruturas reprodutivas danificadas por <i>S. frugiperda</i> , em 10 plantas ^{1/2}				
	15/02 ³	22/02	04/03	10/03	12/04
Algodão Bt + Inseticida	0,2 b	0,2 b	3,2 c	0,8 b	2,4 a
Algodão Bt	0,2 b	0,6 b	3,4 c	4,8 ab	0,0 a
Algodão Conv. + Insetic.	4,6 a	3,8 b	14,0 b	14,2 a	4,0 a
Algodão Convencional	8,4 a	13,8 a	26,0 a	13,2 a	3,2 a

^{1/} Dados reais. Para fins de análise estatística, os dados foram transformados em “ $y = (x+1)^{1/2}$ ”

^{2/} Nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si por Tukey ($P \leq 0,05$);

^{3/} Data da avaliação.

Para efeito de determinação da porcentagem de controle dos tratamentos sobre *S. frugiperda* (Figura 14), levou-se em consideração o número médio de estruturas reprodutivas danificadas durante todo o período do ensaio. Os tratamentos algodão Bt+inseticida com 95% de controle, e o algodão Bt sem inseticidas com 86% de controle, foram altamente eficientes na prevenção de danos causados por *S. frugiperda*.

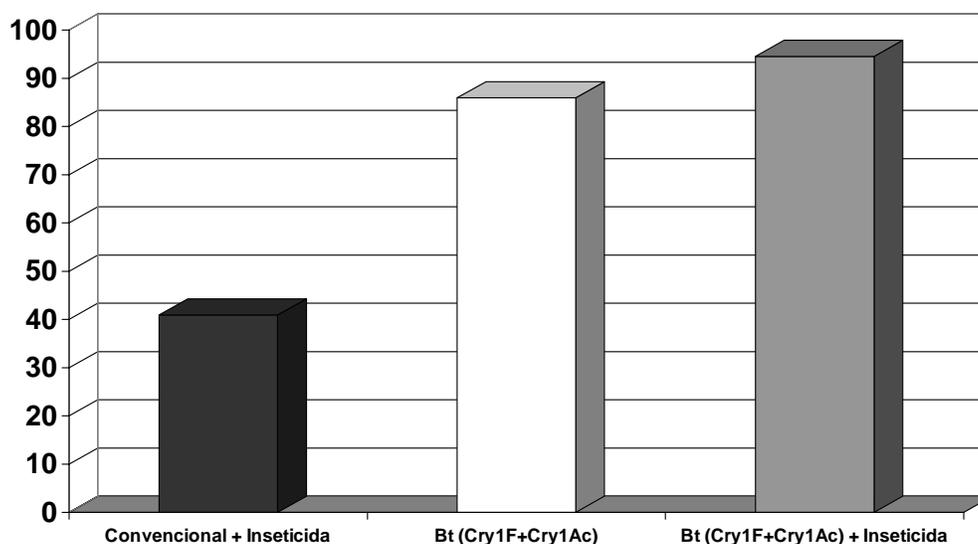


Figura 14: Porcentagem de controle da Lagarta militar (pequena e grande), *Spodoptera frugiperda*. Indianópolis, MG, 2006.

Em 12/04 realizou-se a contagem do número de estruturas reprodutivas em 20 plantas (Figura 15). Não houve diferença significativa entre os tratamentos convencional (532,0), convencional + inseticida (671,2), Bt (653,2) e Bt com inseticida (748,4).

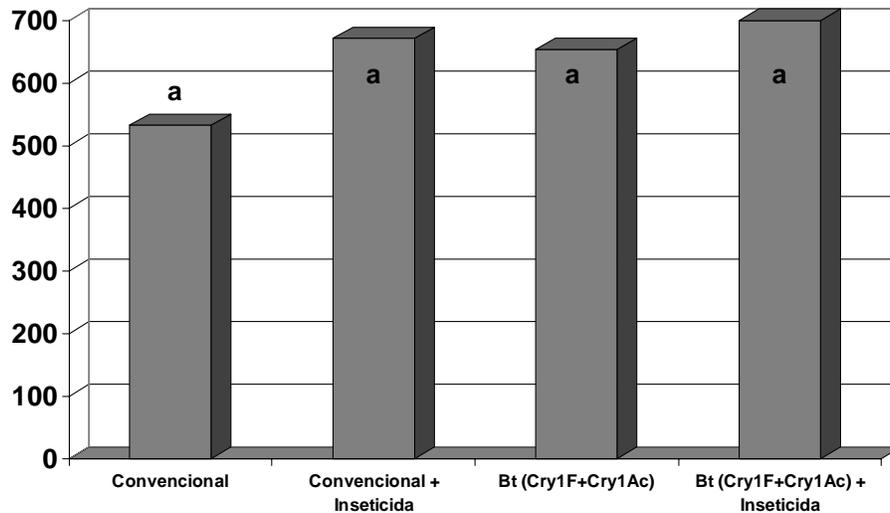


Figura 15: Número de estruturas reprodutivas em 20 plantas. Indianópolis, MG, 2006.

Desse estudo realizado no ano agrícola de 2005/2006, pode-se concluir que:

1. O algodão MXB-13 (Cry1F + Cry1Ac) foi eficiente no controle da lagarta curuquerê, *A. argillacea*.
2. O algodão MXB-13 (Cry1F + Cry1Ac) foi eficiente no controle da lagarta militar, *S. frugiperda* e praticamente não apresentou danos em suas estruturas reprodutivas.
3. O algodão MXB-13 (Cry1F + Cry1Ac) foi eficiente no controle da lagarta-damaçã, *H. virescens*, que praticamente não apresentou danos em suas estruturas reprodutivas.
4. A porcentagem de desfolha manteve-se próxima de zero no algodão MXB-13, indicando a eficiência do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 para proteção ao ataque pelos Lepdopteros estudados.

Um outro estudo foi realizado por Gravena *et al* (2007a) para avaliar a eficiência e praticabilidade agrônômica do algodão geneticamente modificado MXB-13, que expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac, no controle de *Spodoptera* spp., *Heliothis virescens* Fabr. e *Alabama argillacea* Hueb. O estudo foi conduzido em Mogi Mirim - SP, Jardinópolis - SP, Indianópolis - MG e Rio Verde - GO na safra 2006/07. Nos quatro locais foram aplicados os mesmos tratamentos, no delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pelo algodão geneticamente modificado MXB-13, que expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac, e pelo algodão convencional PSC-355 parental recorrente do MXB-13. Para garantir a presença de pragas foram realizadas infestações artificiais com lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (lagarta militar) e

Heliothis virescens Fabr. (lagarta da maçã) em todos os ensaios. Além destas duas pragas, também foram obtidos resultados para *Spodoptera cosmioides* (Walk.) e *Alabama argillacea* Hueb (lagarta curuquerê), oriundas de infestação natural. A aplicação de agroquímicos nas parcelas restringiu-se apenas a produtos específicos para controle de insetos sugadores.

Nos quatro ensaios foram aplicados os mesmos tratamentos, no delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. A semeadura dos ensaios foi em 15, 06, 08 e 21 de fevereiro de 2007, nos locais de Mogi Mirim, Jardinópolis, Indianópolis e Rio Verde, respectivamente. O espaçamento utilizando foi de 0,90 m entre linhas, com densidade de 8-12 plantas/metro. Os tratos culturais constaram de capinas manuais periódicas, adubação de plantio e cobertura e aplicação de produtos reguladores de crescimento para plantas, conforme práticas normalmente adotadas para o algodão. Quando necessário, foram utilizados produtos específicos para o controle de insetos sugadores (tripés, pulgão e mosca branca) e ácaros.

Cada parcela apresentava quatro linhas de plantio com 6 metros de comprimento, onde somente as duas linhas centrais foram consideradas úteis para amostragem e infestação artificial de lagartas. Na linha número dois foi realizada a liberação de lagartas de primeiro a terceiro ínstar de *Spodoptera frugiperda* Smith (lagarta militar) e, na linha número três, de lagartas de segundo a terceiro ínstar de *Heliothis virescens* Fabr. (lagarta da maçã). Houve ocorrência natural de *Alabama argillacea* Hueb (lagarta curuquerê) em todos os locais e de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) em Rio Verde, sendo estas avaliadas nas duas linhas centrais de cada parcela (ou seja, naquelas infestadas artificialmente para *S. frugiperda* e *H. virescens*). As lagartas de *S. frugiperda* e *H. virescens*, criadas em dieta artificial, foram fornecidas pelo Laboratório da Gravena Ltda de Jaboticabal - SP, sendo transportadas em potes com dieta artificial e acondicionadas em caixas de isopor até a localidade de condução do ensaio.

A infestação de *S. frugiperda* foi realizada com o auxílio de equipamento dosador, onde as lagartas foram misturadas a pó de sabugo de milho e depositadas no dossel das plantas, após o prévio umidecimento das plantas com borrifador de água, a fim de evitar que as lagartas caíssem ao solo. A liberação de *H. virescens* foi realizada manualmente, com um pincel fino para facilitar o processo de retirada das mesmas dos potes com dieta. As lagartas de *H. virescens* foram distribuídas no ápice das plantas ou diretamente na bráctea de botões florais e maçãs. Esta segunda forma de liberação foi realizada quando havia alta infestação de outras pragas e alta ocorrência de inimigos naturais. Nesta situação, as lagartas liberadas no ápice das plantas tinham menor sucesso em atingir as estruturas reprodutivas. Foram liberadas em média 40 lagartas por planta em 10 plantas por parcela no caso de *S. frugiperda* e 5 lagartas por planta em 10 plantas por parcela no caso de *H. virescens*.

Na Tabela 14 estão apresentadas as datas das infestações, avaliações e estágios da cultura por ocasião destas atividades.

As avaliações foram realizadas nas duas linhas centrais, em 10 plantas de cada linha, observando-se para cada espécie o número de ovos, lagartas pequenas (1^o a 3^o ínstar) e lagartas grandes (4^o e 5^o ínstar); o número de estruturas reprodutivas danificadas por *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *H. virescens*; e a porcentagem de desfolha nas plantas causada por *S. cosmioides* e *A. argillacea*.

Tabela 14 - Dados referentes às infestações, avaliações e estágio da cultura segundo escala BBCH (Meier, 2001). Mogi-Mirim, Jardinópolis, Indianópolis e Rio Verde, 2007.

Local: Mogi-Mirim, SP			
Data	Avaliação	Infestação artificial	Estágio da cultura
11-12/abr/07	Avaliação de danos	<i>Spodoptera frugiperda</i>	55 (BBCH)
19/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	55 (BBCH)
26/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	55 (BBCH)
03/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>Heliothis virescens</i>	61 (BBCH)
11/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>H. virescens</i>	64 (BBCH)
18/mai/07	Avaliação de danos	-	70 (BBCH)
25/mai/07	Avaliação de danos	-	75 (BBCH)
01/jun/07	Avaliação de danos	-	79 (BBCH)
Local: Jardinópolis, SP			
Data	Avaliação	Infestação artificial	Estágio da cultura
09/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	55 (BBCH)
17/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	61 (BBCH)
24/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	63 (BBCH)
30/abr/07	Avaliação de danos	<i>H. virescens</i>	64 (BBCH)
08/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>H. virescens</i>	70 (BBCH)
14/mai/07	Avaliação de danos	<i>H. virescens</i>	79 (BBCH)
21/mai/07	Avaliação de danos	-	79 (BBCH)
Local: Indianópolis, MG			
Data	Avaliação	Infestação artificial	Estágio da cultura
10/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	59 (BBCH)
17/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	60 (BBCH)
23/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	60 (BBCH)
30/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>H. virescens</i>	61 (BBCH)
09/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>H. virescens</i>	61 (BBCH)
16/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	62 (BBCH)
21/mai/07	Avaliação de danos	-	66 (BBCH)
29/mai/07	Avaliação de danos*	-	67 (BBCH)
06/jun/07	Avaliação de danos*	-	75 (BBCH)
20/jun/07	Avaliação de danos*	-	79 (BBCH)
Local: Rio Verde, GO			
Data	Avaliação	Infestação artificial	Estágio da cultura
26/abr/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i>	55 (BBCH)
03/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>H. virescens</i>	61 (BBCH)
10/mai/07	Avaliação de danos	<i>S. frugiperda</i> e <i>H. virescens</i>	61 (BBCH)
16/mai/07	Avaliação de danos	-	61 (BBCH)

* Avaliou-se somente *Alabama argillacea*.

Os resultados obtidos foram comparados pelo erro padrão da média e a eficiência de controle de lagartas pelo algodão Bt foi calculada por meio da fórmula proposta por

Abbott (1925). A eficiência de redução somente foi calculada para as datas de avaliação nas quais a infestação de lagartas no algodão convencional foi significativa.

- **Efeito dos tratamentos sobre *Spodoptera* spp.**

A infestação natural de *Spodoptera frugiperda* Smith determinada na primeira avaliação de Mogi Mirim, Jardinópolis e Indianópolis foi igual a zero ou baixa, justificando-se as infestações artificiais (Figuras 16, 18 e 20). Nestes três locais, as infestações artificiais apresentaram resultado positivo, com aumento na presença da praga logo na segunda avaliação. Já em Rio Verde, não foram encontradas lagartas de *S. frugiperda*, mesmo após as infestações artificiais. Neste local, constatou-se alta infestação de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Figura 22), sendo provável que a competição entre as duas espécies impediu o estabelecimento das infestações artificiais de *S. frugiperda*.

O maior nível de infestação no algodão convencional nos três locais com *S. frugiperda* ocorreu na segunda ou terceira avaliações, com valores entre 5 (Jardinópolis) e 15 (Indianópolis) lagartas em 10 plantas de algodão (Figuras 16, 18 e 20). Posteriormente, as densidades populacionais foram decrescentes. No algodão Bt as populações de lagartas foram próximas ou iguais a zero em todas as avaliações. Como consequência, as porcentagens de controle proporcionadas pelo algodão Bt foram superiores a 80%, sempre que a infestação no algodão convencional foi significativa (Figuras 17, 19 e 21).

Os danos por *S. frugiperda* foram verificados logo após as infestações, sendo significativos somente no algodão convencional (Figuras 16, 18 e 20). Os danos no tratamento OGM foram restritos àqueles necessários para promover a morte da lagarta, que consistem em lesões bem menores que as ocorridas no algodão convencional. Os danos no algodão Bt se caracterizaram por escarificações superficiais de até 0,5 cm de diâmetro, que não afetaram o desenvolvimento das estruturas reprodutivas. A morte da lagarta ocorre a partir da alimentação e ingestão de determinada quantidade de proteína, portanto, um dano mínimo em estruturas do tratamento OGM pode ser evidenciado em alguns momentos. Os danos no algodão convencional se caracterizaram por perfuração capazes de afetar o posterior desenvolvimento das estruturas reprodutivas. O dano máximo encontrado nas avaliações do algodão convencional nos diferentes locais foi de 8 (Mogi Mirim) a 29 (Indianópolis) estruturas reprodutivas atacadas.

Em Rio Verde, as populações de lagartas de *S. cosmioides* foram significativas desde a primeira avaliação nos dois cultivares, com tendência de decréscimo ao longo do tempo (Figura 22). Na primeira avaliação, o total de lagartas em 10 plantas foi igual a 35 e 17, para as cultivares convencional e OGM, respectivamente. A alta população no algodão Bt deveu-se unicamente às lagartas pequenas, que morreram com o tempo, tanto que o número de lagartas grandes foi próximo a zero em todas as avaliações. Considerando-se as lagartas grandes e as avaliações nas quais estas ocorreram em número relevante no algodão convencional, a eficiência de controle do algodão Bt foi acima de 88% (Figura 23).

Os danos por *S. cosmioides* ocorreram nas estruturas reprodutivas e nas folhas das plantas (desfolha) (Figura 22). Os dois tipos de danos foram significativos no algodão convencional, sendo que até 41 estruturas reprodutivas foram afetadas, com 34% de

desfolhada nas plantas. Destaca-se que assim como ocorreu para *S. frugiperda* nos outros locais, os danos causados ao algodão Bt foram superficiais e o desenvolvimento das estruturas reprodutivas não foi afetado. No algodão convencional ocorreram perfurações capazes de afetar o desenvolvimento das estruturas reprodutivas. A porcentagem de desfolha no algodão Bt não foi superior a 4%, sendo causado por lagartas pequenas que se alimentaram antes de morrer.

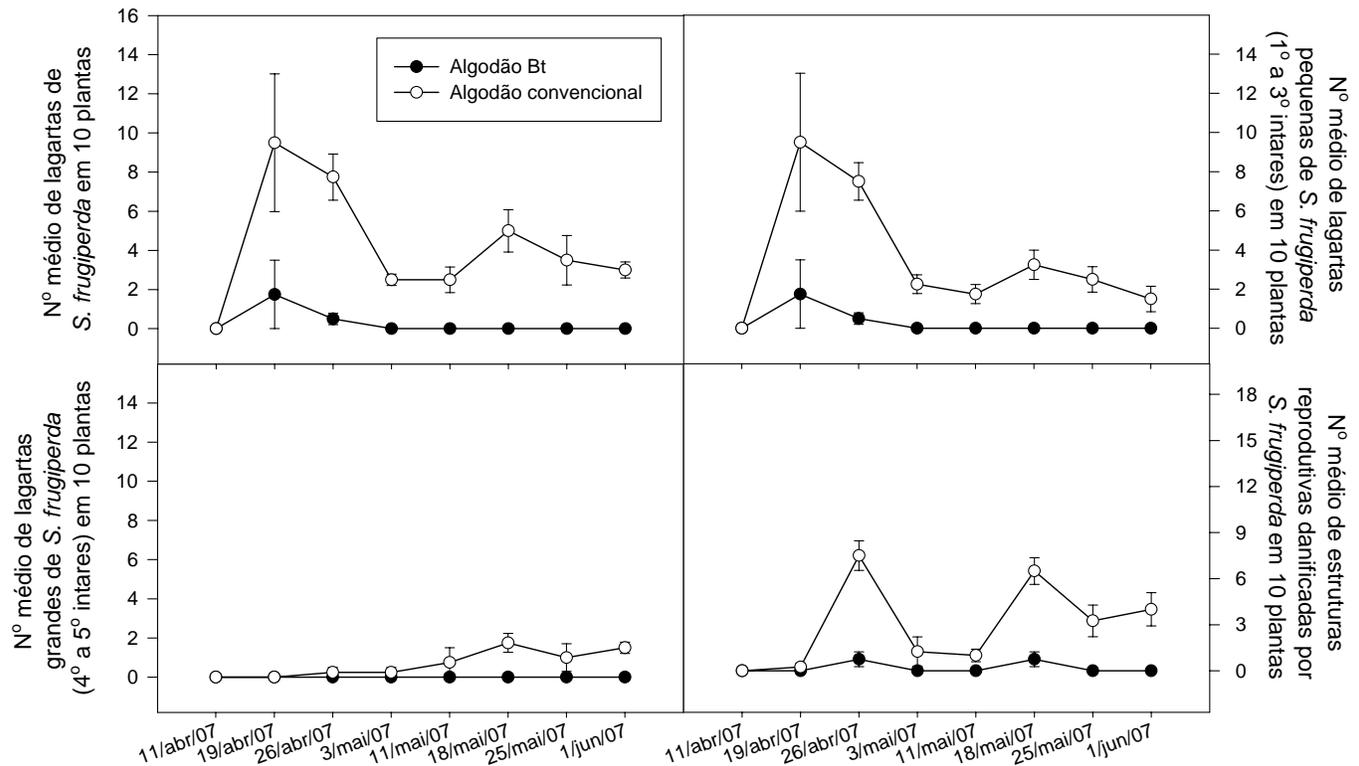


Figura 16 - Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em de algodão Bt ou de algodão convencional. Mogi Mirim, SP, 2007.

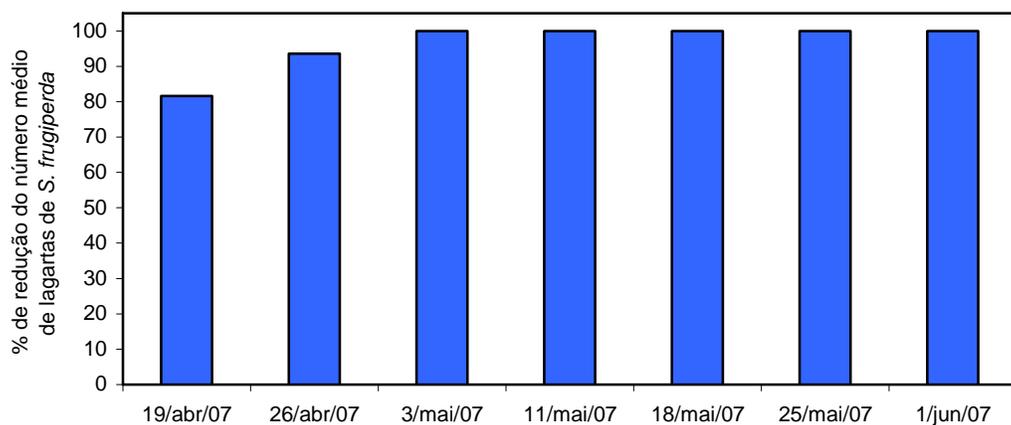


Figura 17 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Mogi Mirim, SP, 2007.

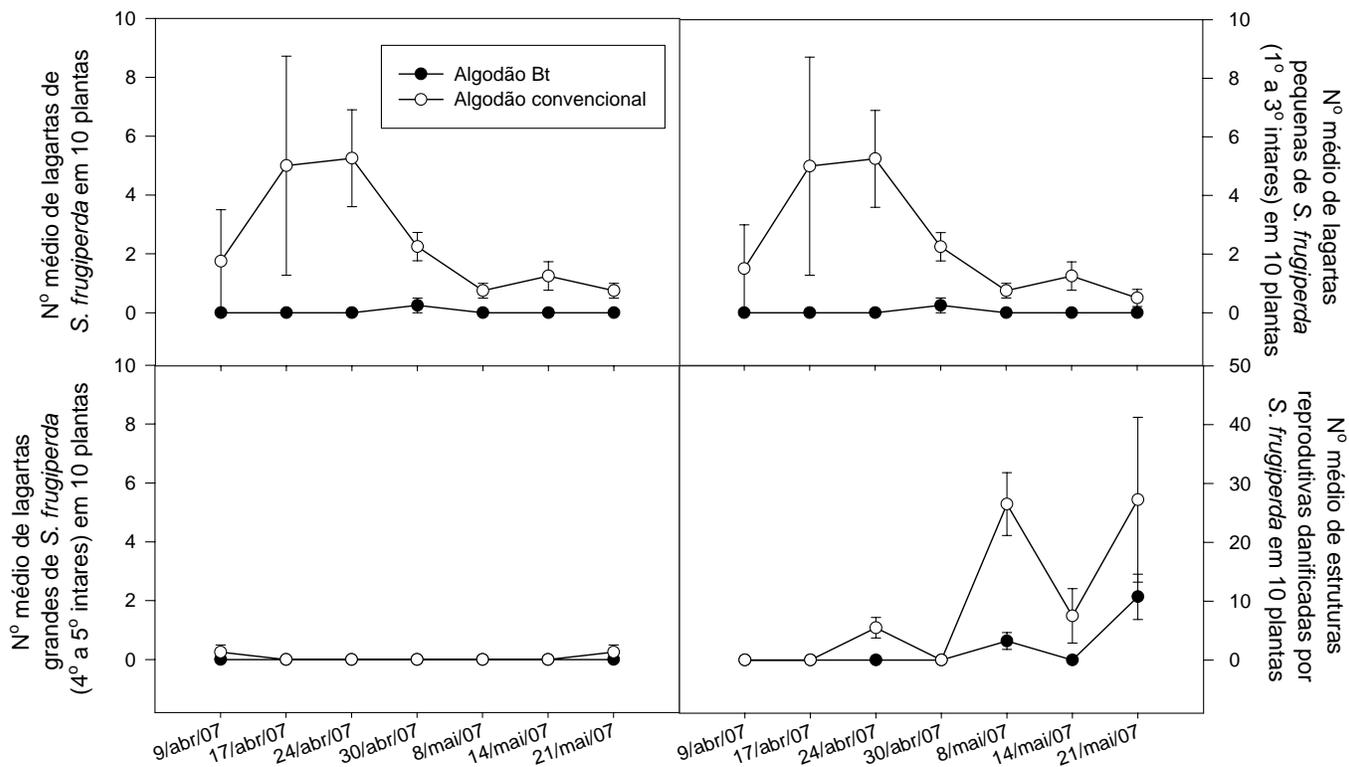


Figura 18 - Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em de algodão Bt ou de algodão convencional. Jardinópolis, SP, 2007.

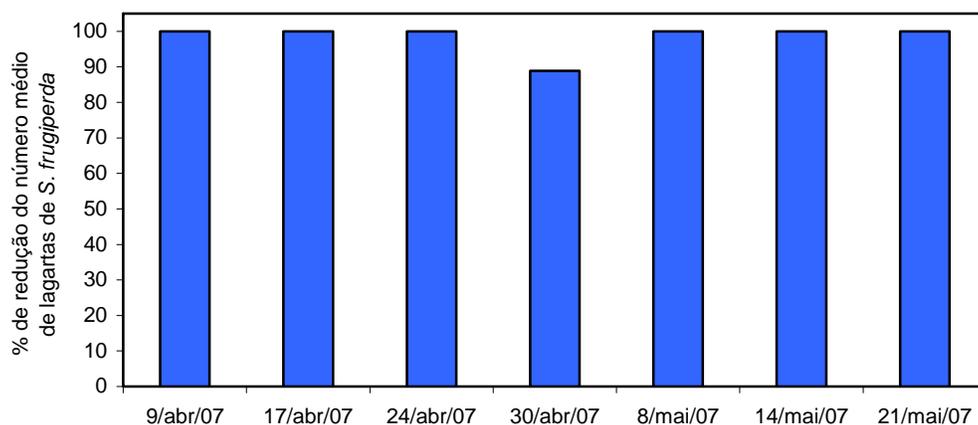


Figura 19 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Jardinópolis, SP, 2007.

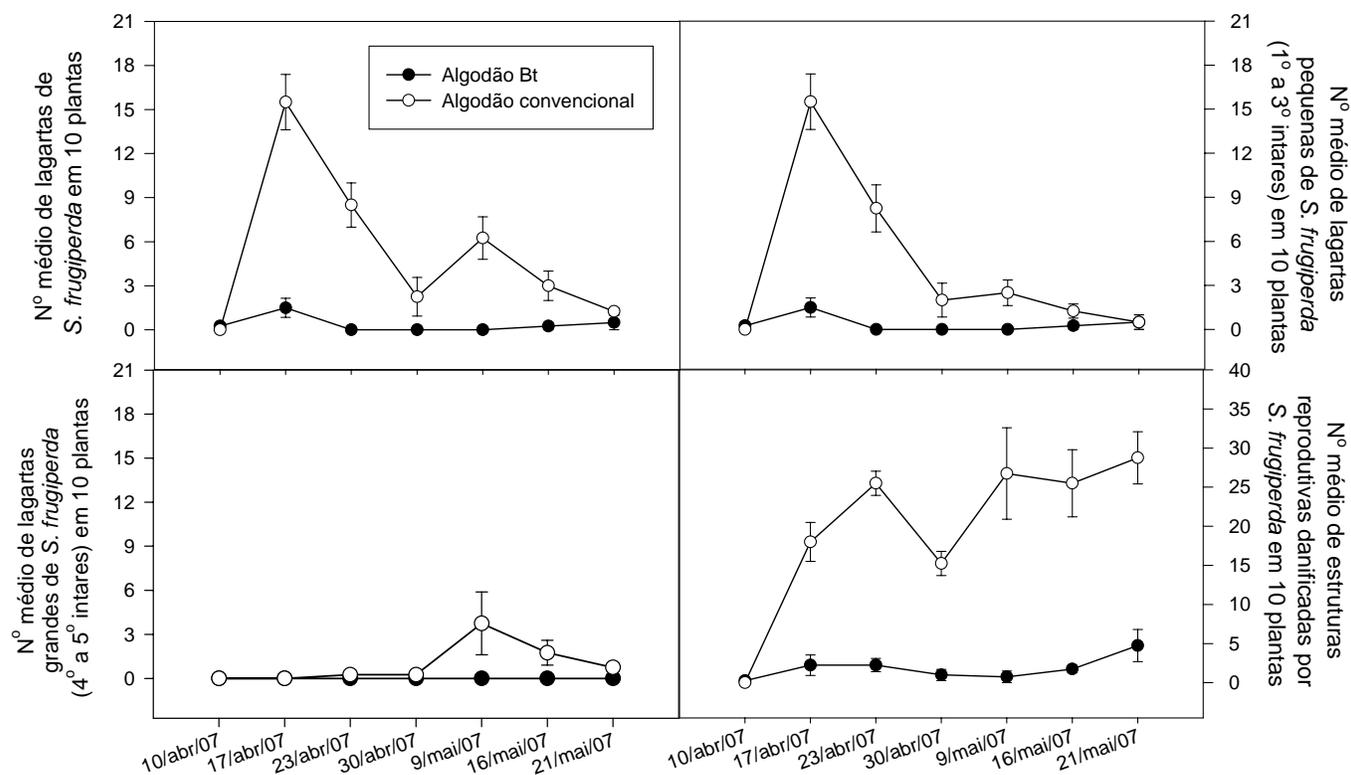


Figura 20 - Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em de algodão Bt ou de algodão convencional. Indianópolis, MG, 2007.

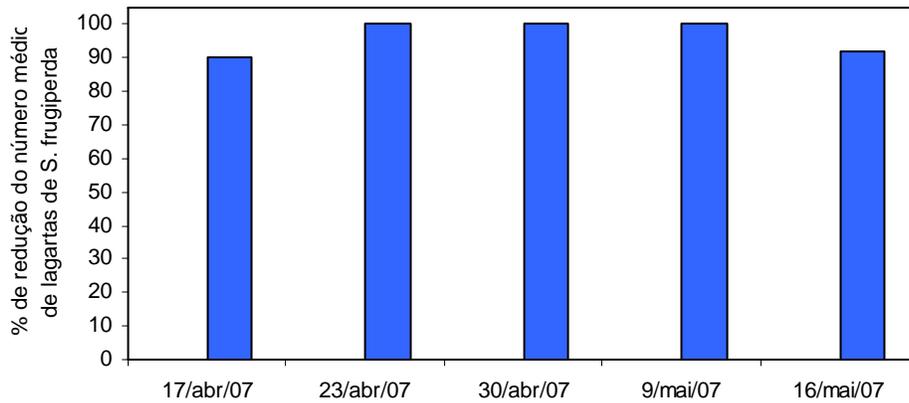


Figura 21 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Indianópolis, MG, 2007.

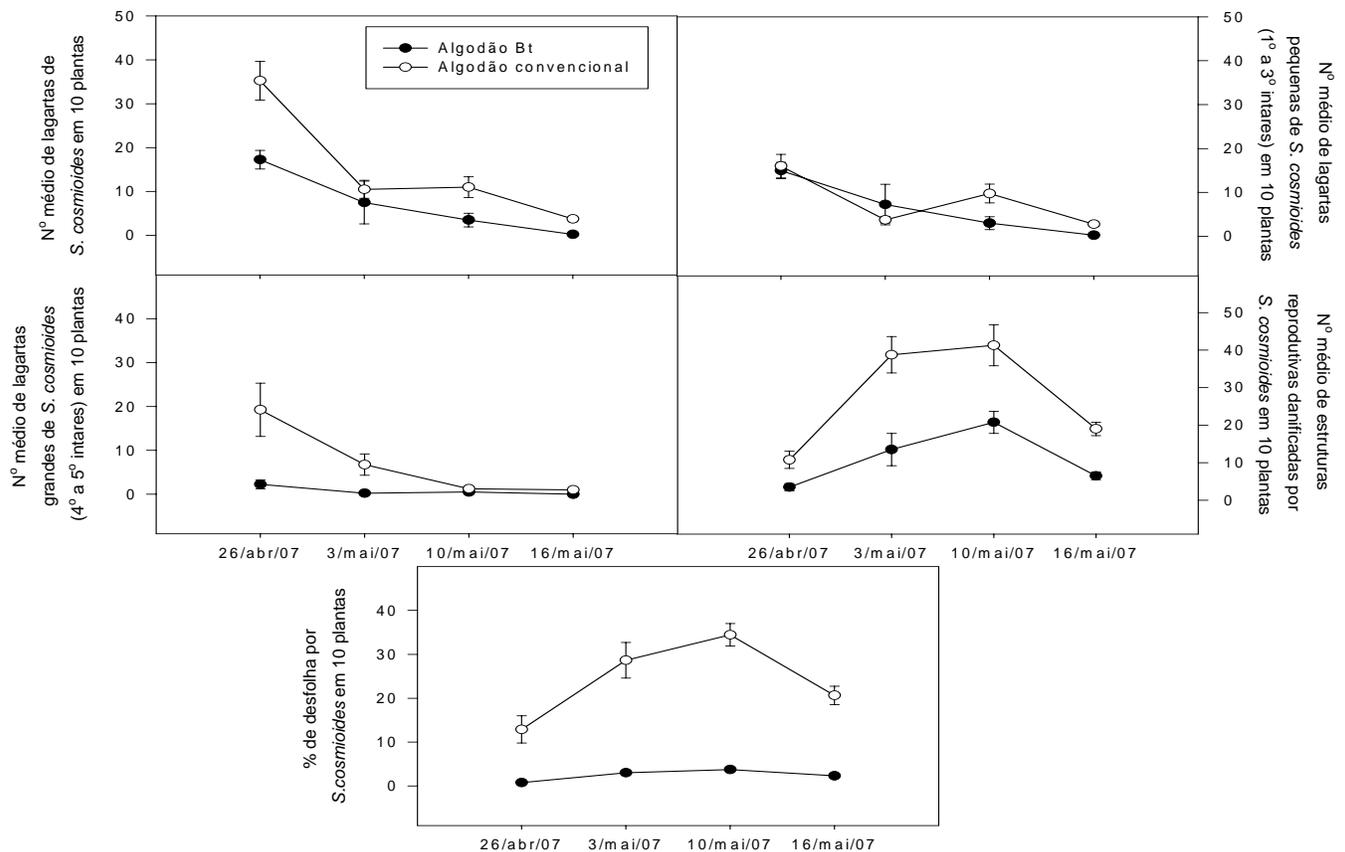


Figura 22 - Número de lagartas de *Spodoptera cosmioides*, de estruturas reprodutivas danificadas e de desfolha por esta praga em de algodão Bt ou de algodão convencional. Rio Verde, GO, 2007.

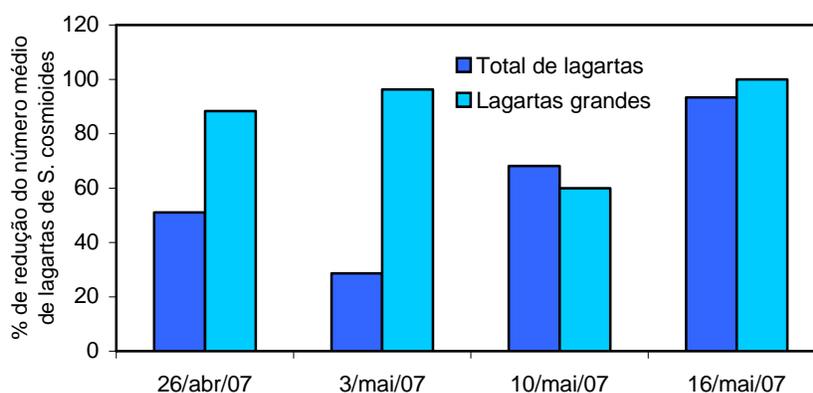


Figura 23 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Rio Verde, GO, 2007.

- **Efeito dos tratamentos sobre *Heliothis virescens* Fabr.**

A área de Mogi Mirim foi a única que apresentou infestação natural alta de *Heliothis virescens* Fabr. Nas demais áreas foram necessárias infestações artificiais para avaliar a eficácia do algodão Bt. As maiores populações encontradas nas avaliações do algodão convencional dos quatro locais estiveram entre seis (Jardinópolis) e 19 (Indianópolis) lagartas por 10 plantas (Figuras 24, 26, 28 e 30). As populações foram baixas no algodão Bt na maioria das avaliações nas quais a infestação no algodão convencional foi significativa, resultando em porcentagens de controle superiores a 80% (Figuras 25, 27, 29 e 31). A exceção ocorreu na última avaliação da área de Rio Verde, onde foram encontradas 12 lagartas no algodão convencional e quatro no algodão Bt, conseqüentemente 67% de controle. A alta população no algodão Bt da última avaliação de Rio Verde deveu-se unicamente às lagartas pequenas. Considerando-se as lagartas grandes, a eficiência de controle do algodão Bt foi de 92%.

Os danos foram relevantes somente no algodão convencional. Os danos no algodão Bt restringiram-se aos necessários para promover a morte da lagarta, que consistem em lesões bem menores que as ocorridas no algodão convencional, da mesma forma que foi observado para *Spodoptera*. Os danos no algodão Bt se caracterizaram por escarificações superficiais de até 0,5 cm de diâmetro, que não afetaram o desenvolvimento das estruturas reprodutivas. Os danos no algodão convencional resultaram em perfurações de estruturas reprodutivas capazes de afetar o posterior desenvolvimento. O nível de dano máximo atingido nas avaliações do algodão convencional nos diferentes locais foi de 15 (Mogi Mirim) a 41 (Jardinópolis) estruturas reprodutivas.

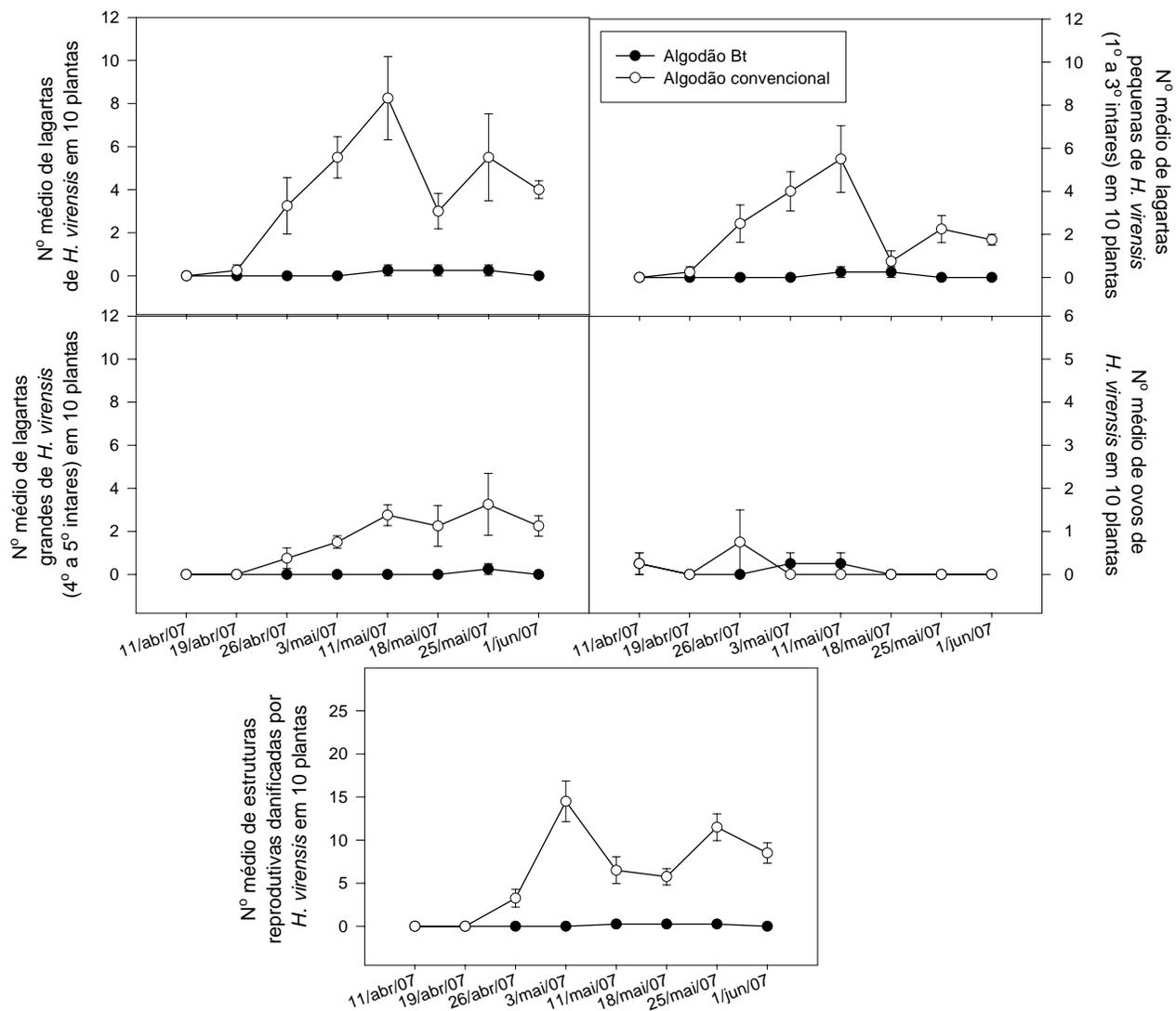


Figura 24 - Número de lagartas e ovos de *Heliobius virescens* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Mogi Mirim, SP, 2007.

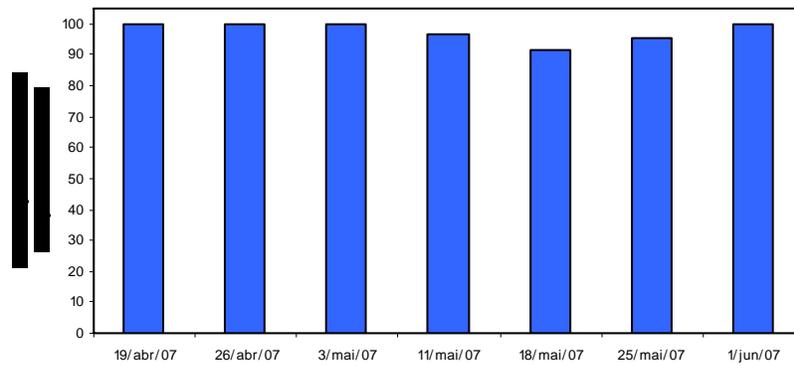


Figura 25 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Heliothis virescens* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Mogi Mirim, SP, 2007.

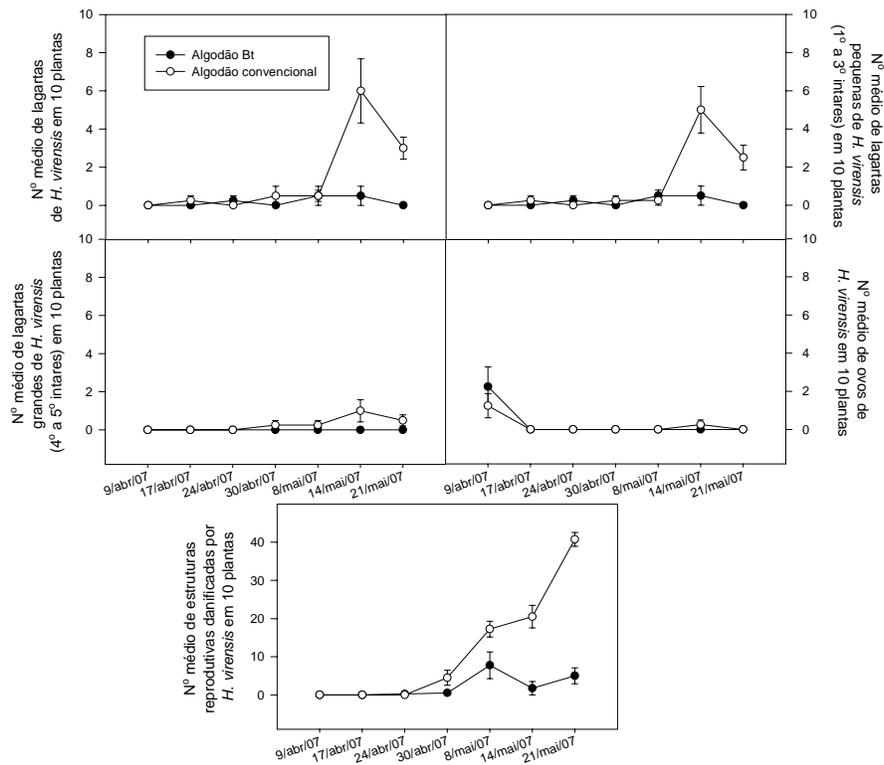


Figura 26 - Número de lagartas e ovos de *Heliothis virescens* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Jardinópolis, SP, 2007.

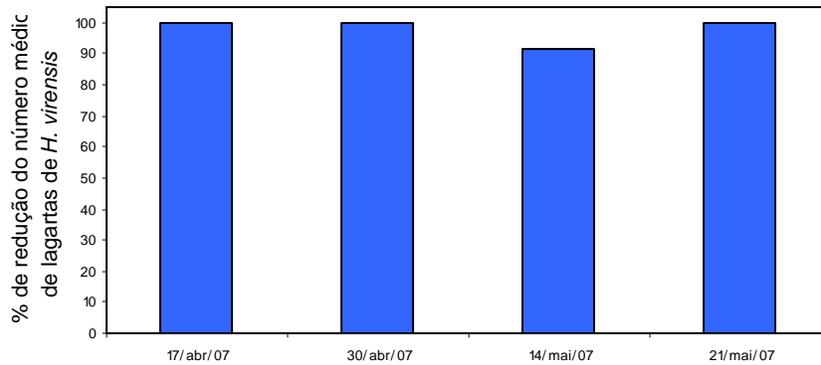


Figura 27 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Heliothis virescens* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Jardinópolis, SP, 2007.

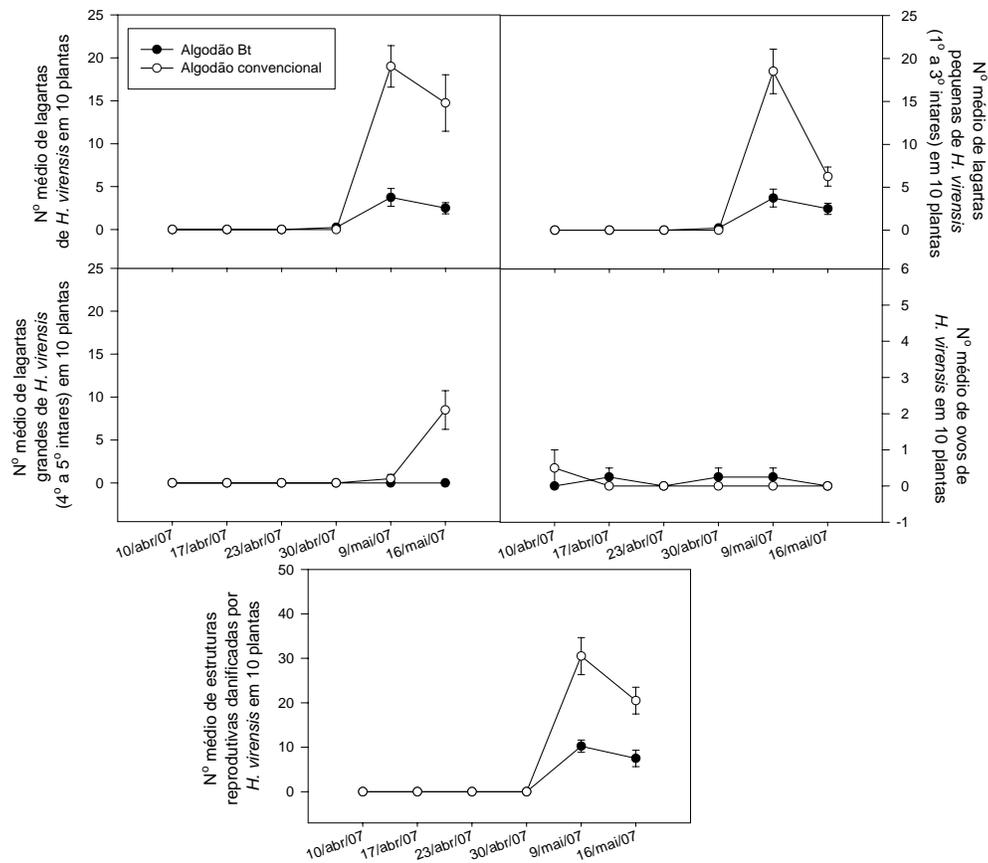


Figura 28 - Número de lagartas e ovos de *Heliothis virescens* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Indianópolis, MG, 2007.

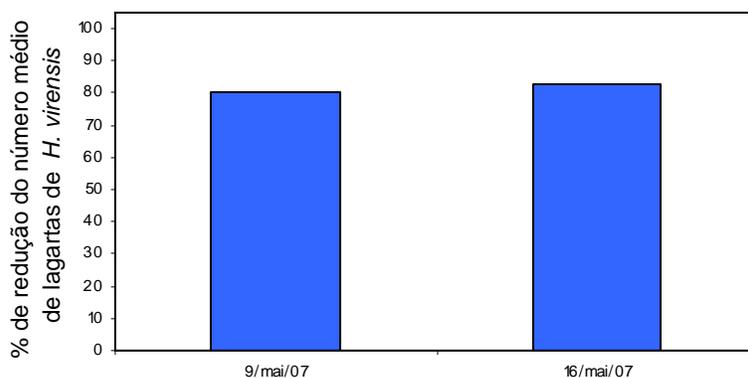


Figura 29 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Heliothis virescens* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Indianópolis, MG, 2007.

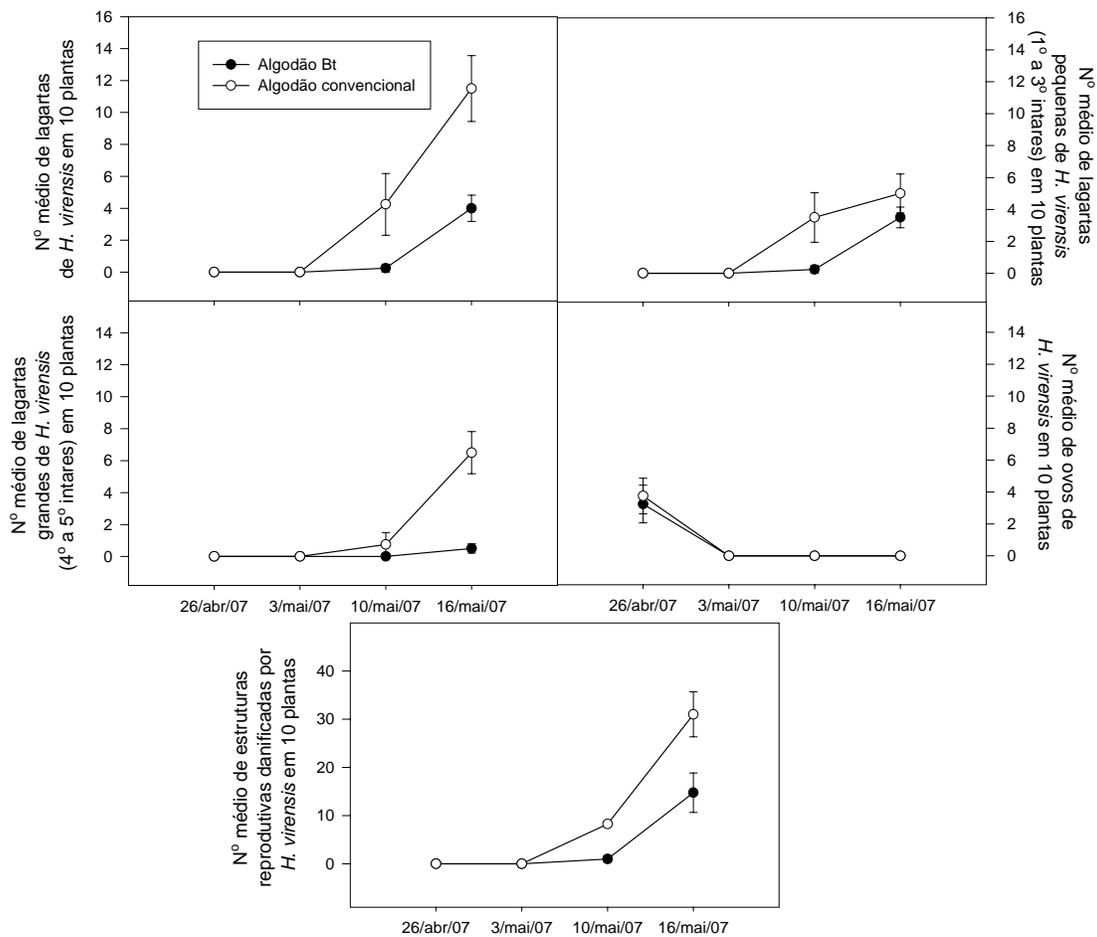


Figura 30 - Número de lagartas e ovos de *Heliothis virescens* e de estruturas reprodutivas danificadas por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Rio verde, GO, 2007.

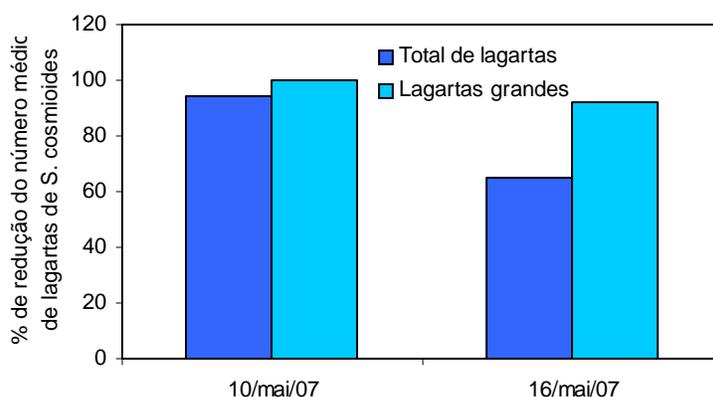


Figura 31 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Heliothis virescens* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Rio Verde, GO, 2007.

- **Efeito dos tratamentos sobre *Alabama argillacea* Hueb**

A ocorrência de *Alabama argillacea* Hueb somente foi relevante nas áreas de Mogi Mirim, Jardinópolis e Indianópolis (Figuras 31, 33 e 35).

A infestação natural de *A. argillacea* nas áreas de Mogi Mirim e Indianópolis manteve-se crescente e expressiva para o algodão convencional e praticamente nula para o algodão Bt (Figuras 31 e 35). O pico populacional no algodão convencional ocorreu na penúltima avaliação das duas áreas, com 8 lagartas por 10 plantas em Mogi Mirim e 26 lagartas em Indianópolis. Na última avaliação ocorreu redução no número médio de lagartas no tratamento convencional, fato este justificado pela acentuada desfolha causada pelas lagartas ao longo do período de avaliações. As porcentagens de controle proporcionadas pelo algodão Bt foram superiores a 90% (Figuras 32 e 36). A desfolha no algodão convencional de Mogi Mirim e de Indianópolis chegou a 10 e 52%, respectivamente, enquanto que a desfolha no algodão Bt foi praticamente nula (Figuras 31 e 35).

A maior população de *A. argillacea* na área de Jardinópolis foi constatada na primeira avaliação do algodão convencional, com 45 lagartas em 10 plantas (Figura 33). Posteriormente, o número de lagartas reduziu bruscamente. A densidade populacional no algodão Bt também foi alta na primeira avaliação, com 30 lagartas em 10 plantas, e, posteriormente, foi praticamente nula. Desta forma, a porcentagem de controle proporcionada pelo algodão Bt na primeira avaliação foi de apenas 33% e nas demais avaliações onde houve presença significativa de lagartas o controle foi superior a 80%. A alta população no algodão Bt, na primeira avaliação, deveu-se unicamente às lagartas pequenas. Considerando-se as lagartas grandes, a eficiência de controle foi de 100%. Os danos foram relevantes somente no algodão convencional, atingindo desfolha de até 15%. No algodão Bt os danos não chegaram 2% de desfolha.

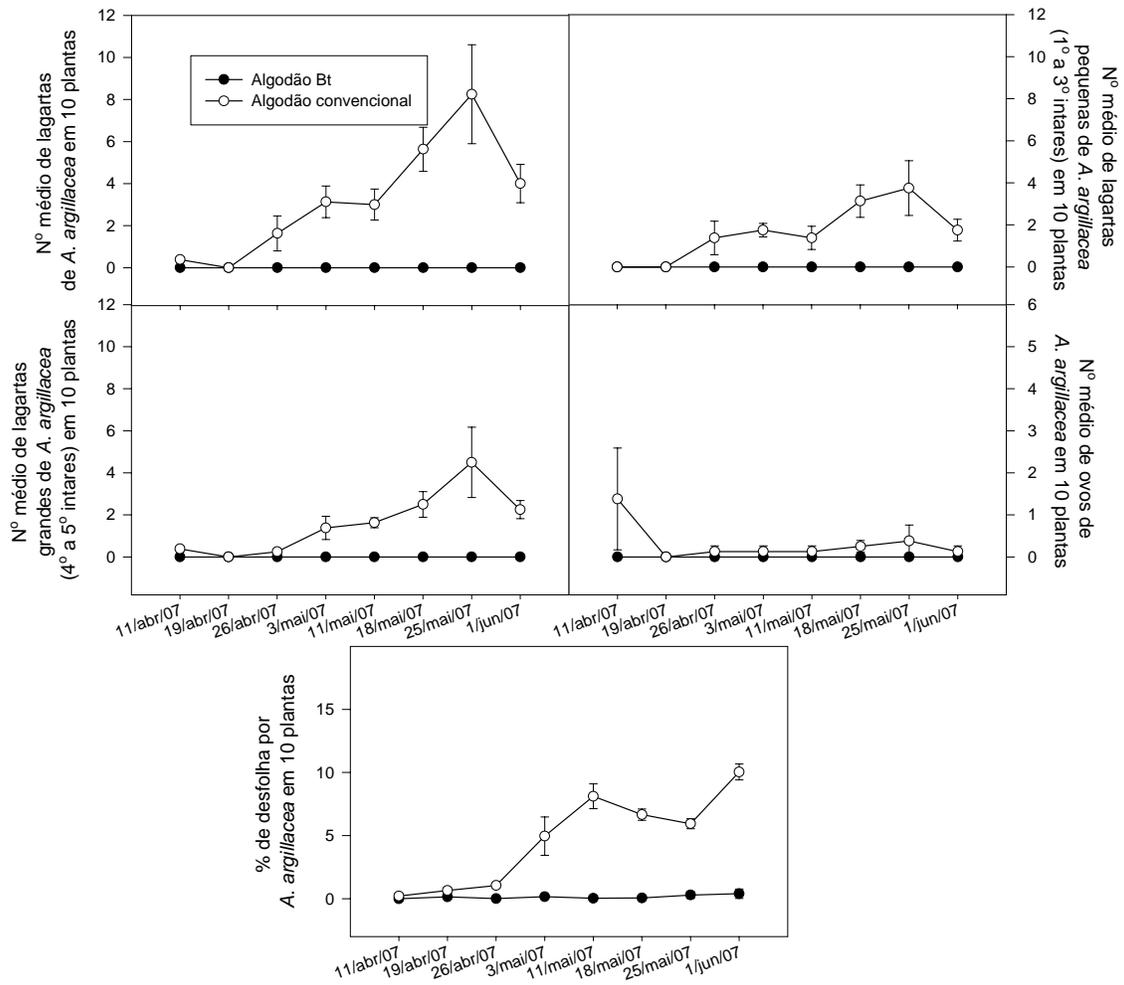


Figura 32 - Número de lagartas e ovos de *Alabama argillacea* e porcentagem de desfolha por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Mogi Mirim, SP, 2007.

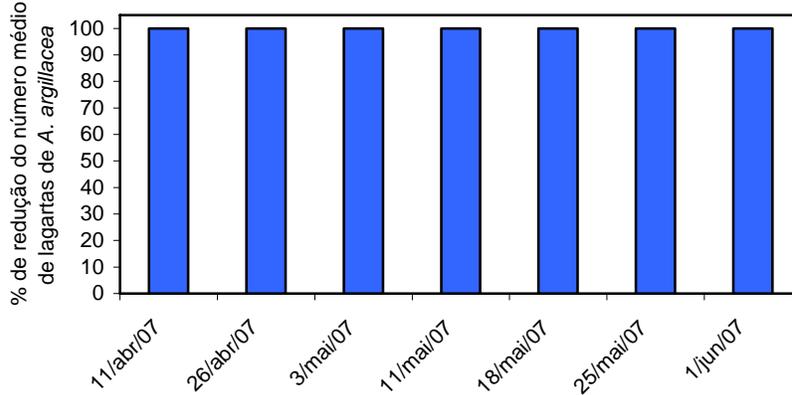


Figura 33 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Alabama argillacea* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Mogi Mirim, SP, 2007.

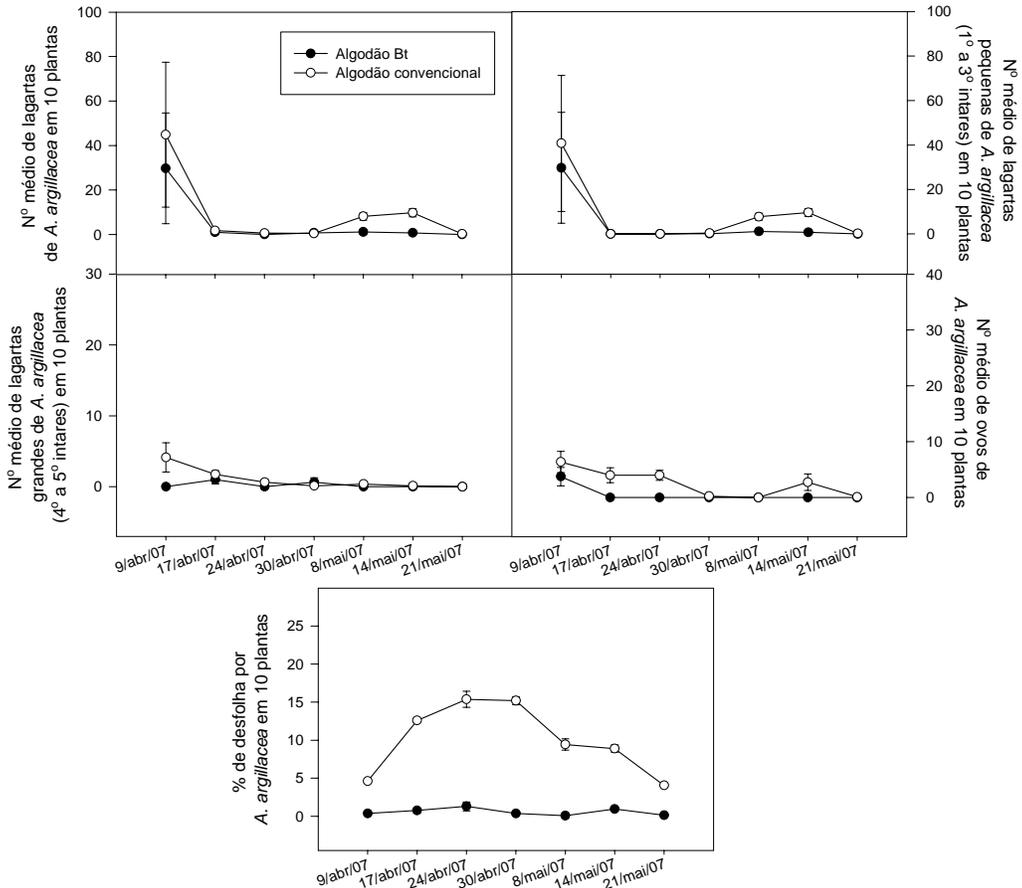


Figura 34 - Número de lagartas e ovos de *Alabama argillacea* e porcentagem de desfolha por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Jardinópolis, SP, 2007.

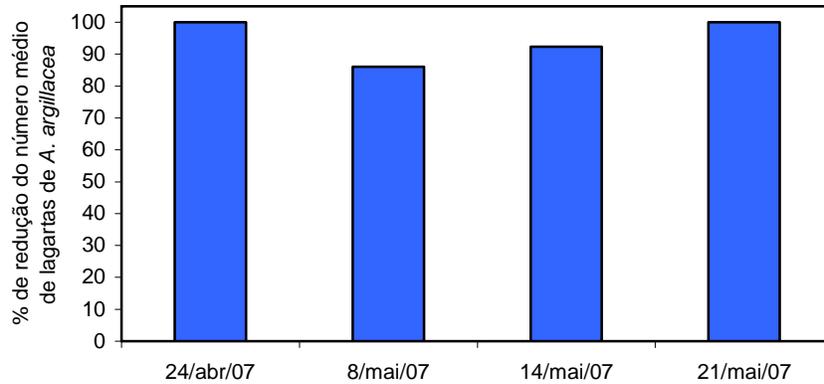


Figura 35 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Alabama argillacea* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Jardinópolis, SP, 2007.

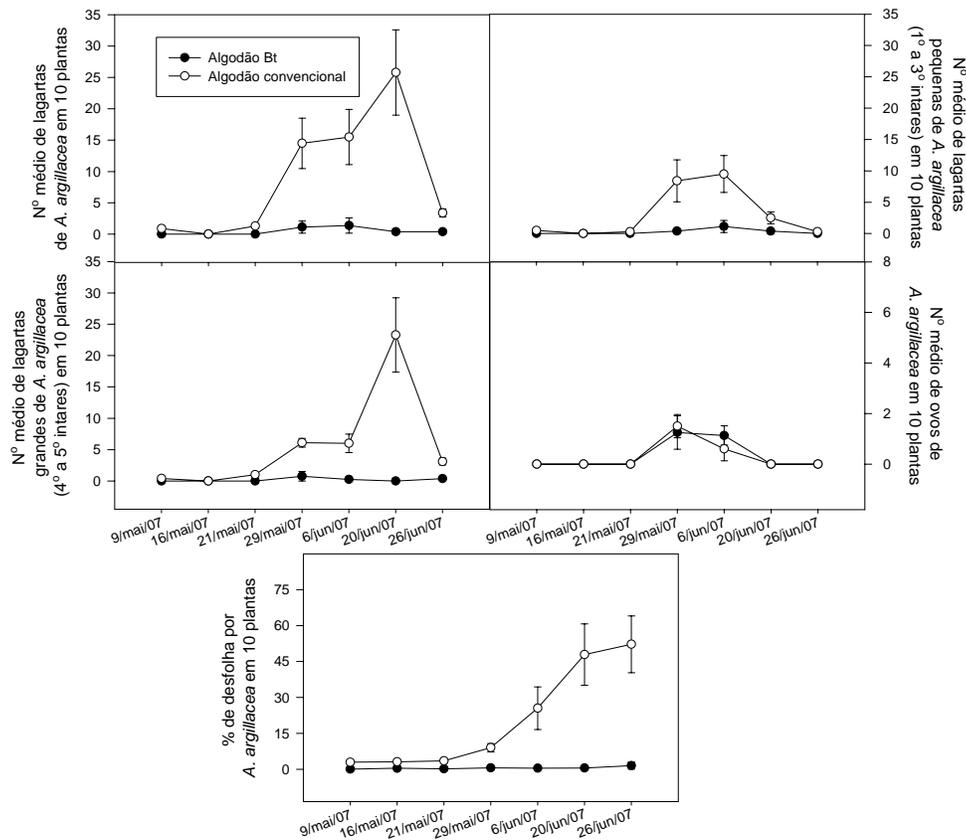


Figura 36 - Número de lagartas e ovos de *Alabama argillacea* e porcentagem de desfolha por esta praga em plantas de algodão Bt ou algodão convencional. Indianópolis, MG, 2007.

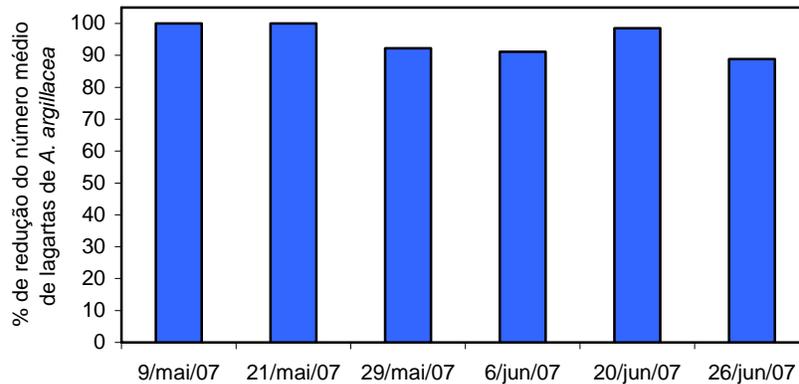


Figura 37 - Porcentagem de redução do número médio de lagartas de *Alabama argillacea* proporcionada pelas plantas de algodão Bt. Indianópolis, MG, 2007.

- **Conclusão**

Nas condições em que o estudo foi conduzido, pode-se concluir que o algodão MXB-13 com o evento 281-24-236/3006-210-23 é eficiente no controle de *S. frugiperda* (lagarta militar), *S. cosmioides*, *H. virescens* (lagarta da maçã) e *A. argillacea* (lagarta curuquerê), evitando danos significativos às estruturas reprodutivas e desfolha.

8.Segurança Alimentar

- **Planta receptora**

A planta receptora, algodoeiro geneticamente modificado (GM), à semelhança do algodoeiro comum, é uma planta produtora de fibras nos frutos, cujas sementes depois de esmagadas produzem vários componentes usados na alimentação humana e animal. A semente do algodão é processada para obter produtos diversos para alimentos e rações, tais como: óleo comestível, farelo e linter.

O algodoeiro GM portador do evento 281-24-236/3006-210-23, não difere da planta comum, tendo as mesmas características morfológicas, vegetativas e reprodutivas. A Tabela 15 abaixo mostra a similaridade entre a variedade receptora MXB-13 e a variedade parental PSC-355. A variedade parental PSC-355 é a linhagem convencional que foi geneticamente modificada com os genes *cryIF* e *cryIAC* para gerar a planta receptora MXB-13. Embora algumas diferenças sejam significativas a 5% de probabilidade os valores estão dentro de valores esperados para características em cultivares recuperadas em programas normais de retrocruzamentos. Uma planta de algodão seja convencional ou geneticamente modificada, como a do evento 281-24-236/3006-210-23, assim como para as características agrônômicas avaliadas, também mostra semelhança com relação a aspectos de alergenicidade. Os tecidos das plantas expostos aos operários tanto no manuseio no campo, como na indústria, ou aos consumidores não tem propriedades alérgicas. A diferença entre a planta receptora e uma

planta de algodão convencional fica restrita à presença das três novas proteínas que somente ocorrem nas plantas receptoras geneticamente modificadas. As proteínas Cry1F, Cry1Ac e PAT presentes na variedade GM e expostas com frequência a humanos e outros mamíferos não tem, até hoje, registros confirmados que possam atuar como substâncias alergênicas.

Tabela 15: Características agrônômicas das linhagens de algodão dos eventos 281-24-236 expressando a proteína Cry1F e MXB-13 (281-24-236/3006-210-23) expressando as proteínas CryF e Cry1Ac, em comparação com a linhagem parental PSC-355 (não GM).

Variável	Unidades	281-24-236 (Cry1F)	MXB-13 (Cry1Ac/Cry1F)	PSC355 (nulo)	Número de Locais
Hábito de Crescimento					
Altura de planta	polegadas	40,8	40,2 *	41,5	17
Total de nós	número por planta	17,7	17,4	17,6	16
Proporção altura/nós	polegadas por planta	2,31	2,32	2,35	17
Nós do 1º ramo de frutificação	nó	6,6	6,8	6,6	17
Ramos de frutificação	número por planta	12,1	11,6 *	12,1	16
Total de posições de frutificação	número por planta	26,9	24,7 *	26,6	17
Brotos vegetativos	número por planta	2,6 *	1,7	1,6	16
Germinação e Emergência					
emergência de campo	%	60,9 *	78,9	82,3	19
Vigor no frio	%	35	36	38	20
4 dias - quente	%	62	64	65	20
7 dias - quente	%	79	80	82	20
Germinação total	%	84	84	87	20
Sementes dormentes	%	0,6	0,5	0,3	20
Vigor vegetativo					
Ramos vegetativos	número por planta	2,9 *	2,8	2,6	16
Período de Florescimento					
Dias para a primeira flor	dias	61,5 *	61,4	60,6	18
Nó de flor branca - 15 dias	nó	13,0	12,9	12,9	17
Nó de flor branca - 30 dias	nó	17,0	16,9	16,8	15
Potencial Reprodutivo					
Porcentagem de retenção - total	%	47,6	45,8	44,4	16
Porcent. de retenção- 1ª posição	%	54,8	62,4 *	54,3	16
Percent. de capulhos abertos	% por planta	75,8	76,5	75,4	17
Peso de Seed cotton/capulhol	gramas por capulhol	5,4 *	5,3 *	5,1	19
Porcentagem de Lint	%	38,1 *	37,1	37,3	19
Índice de Semente	gramas por 100 sem.	10,9	11,3 *	10,7	17
Lint por acre	libras por acre	1007	1000	993	17
Qualidade de Fibra					
Comprimento	Polegadas	1,147	1,177 *	1,147	19
Resistência	gramas por tex	31,4 *	33,0	32,6	19
Micronaire	unidades micronaire	4,67 *	4,51 *	4,96	19
Uniformidade de comprimento	%	85,4 *	85,8	85,7	19
Refletância	%	75,6 *	76 *	74,6	19
Amarelecimento	Escala Hunter's +b	8,5	8,3	8,4	19

* significativamente diferente do parental recorrente (PSC-355) não transgênica usando comparação de médias de acordo com Dunnett-Hsu com $p = 0,05$.

Em ensaios realizados nas unidades operativas de Indianópolis-MG, Jardinópolis-SP e Mogi Mirim-SP, no ano agrícola 2006/2007, referentes ao processo CTNBio nº

01200.006775/2004-37 foram obtidos resultados complementares correspondentes mostrando que as características agronômicas estudadas da cultivar GM, MXB-13, estão dentro da amplitude esperada para variedades de algodão convencional obtidas através de aplicação do método de retrocruzamentos. Os ensaios receberam tratamento com inseticidas apenas para o controle de pulgões e mosca-branca (imidacloprid e thiametoxan) para melhor avaliar a eficácia do evento aos insetos-alvo, lepidópteros-praga, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* e *Alabama argilacea*. Os resultados são mostradas na tabela 16.

Tabela 16: Dados agronômicos médios realizados nas unidades operativas de Indianópolis-MG, Jardinópolis-SP e Mogi Mirim-SP, no ano agrícola 2006/2007, sem tratamento com inseticida para as pragas-alvo.

Cultivares	Evento	Altura da Planta (cm)	Bolas/100 plantas (n ^o)	Florescimento DAP*
MXB-13	Cry1F/Cry1Ac	103,0 b***	397,7 a	64,5 a
PSC-355**	Controle	111,7 a	331.5 b	63,5 b

*DAP: dias após o plantio.

** Parental recorrente da cultivar MXB-13, onde foi inserido o evento Cry1F/Cry1Ac.

*** Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A altura da planta da cultivar controle foi cerca de 8,7 cm superior à cultivar introgridida com os genes *cry1F/cry1Ac*. Já o número de bolas por 100 plantas na cultivar GM foi cerca de 20% superior ao controle indicando um maior potencial produtivo da cultivar transformada. Nos ensaios das tres localidades houve ataque severo da praga bicudo, *Anthonomus grandis*, inseto não-alvo das proteínas Cry1F e Cry1Ac, o que pode em parte explicar a quantidade reduzida de bolas por 100 plantas, pois apenas sugadores foram controlados com inseticidas específicos. O florescimento da 1^a. flor, embora tenha mostrado diferenças significativas pelo teste Tukey foi de apenas 1(um) dia. Para altura de plantas e florescimento as diferenças entre a cultivar transformada e a original controle foram relativamente pequenas indicando que os genes introgrididos não foram suficientes para alterar essas características agronômicas. Dados da tabela (tabela 25 do dossier) envolvendo as mesmas cultivares, MXB-13 e PSC-355 mostraram valores bem mais próximos para várias características agronômicas indicando similaridade entre o OGM e seu controle recorrente.

Outro ensaio para avaliar características agronômicas foi realizado também nas Unidades Operativas da Dow AgroSciences de Indianópolis-MG, Jardinópolis-SP e Mogi Mirim no ano de 2006/7, porém com aplicação de inseticidas para controle de pragas sugadoras e também para controle de outros insetos pragas-alvo, lepidópteros e coleópteros. Para o controle do bicudo foram usados os inseticidas parathion-methyl e endosulfan. Para controle de lepidópteros foi usado o inseticida Tracer. Os resultados desses ensaios são mostrados na tabela 17.

Tabela 17: Dados agronômicos médios realizados nas unidades operativas de Indianópolis-MG, Jardinópolis-SP e Mogi Mirim-SP, no ano agrícola 2006/2007, com tratamento com inseticida para as pragas-alvo.

Cultivares	Evento	Altura da Planta (cm)	Bolas/100 plantas (no.)	Florescimento DAP*
MXB-13	Cry1F/Cry1Ac	109,6 b****	619,5 a	65,0 a
PSC-355**	Controle	121,7 a	540,4 b	63,8 b
CD-406	Controle***	126,7 a	400,8 c	64,8 a

*DAP: dias após o plantio.

** Parental recorrente da cultivar MXB-13, onde foi inserido o evento Cry1F/Cry1Ac.

*** Cultivar comercial não-OGM.

**** Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As características avaliadas nas cultivares MXB-13 e PSC-355 foram muito semelhantes às observadas no ensaio sem controle das pragas-alvo (tabela 16), com exceção do aumento considerável no número de bolas por 100 plantas, devido em parte ao controle do bicudo por inseticidas. Nesse caso houve um aumento de 14,6 % de bolas na variedade MXB-13 em relação à variedade original convencional PSC-355, contra 20% observado no ensaio sem controle químico das pragas lepidópteras-alvo. Interessante notar que mesmo com o controle de sugadores e das pragas-alvo, a variedade transformada MXB-13 mostrou ainda nessas condições um maior potencial produtivo que seu parental convencional PSC-355.

- **Organismos doadores**

Os organismos doadores de genes usados para a construção dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23 são as bactérias de solo não patogênicas *Bacillus thuringiensis* var *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* responsáveis pela produção das proteínas CryF, Cry1Ac que controlam certas espécies de lepidópteros-praga que atacam o algodoeiro e e *Streptomyces viridochromogenes* que produz a proteína PAT que confere resistência ao glufosinato de amônio, que atua nos eventos apenas como um marcador de seleção.

Ao se avaliar o potencial alergênico de um produto é importante considerar a origem biológica do gene introduzido para se antever se o mesmo expressa produto alergênico (FDA, 1992). Nem *Bacillus thuringiensis* (origem dos genes *cry1F* e *cry1Ac*) nem *Streptomyces viridochromogenes* (origem do gene *pat*) apresentam antecedentes como fatores desencadeantes de alergias. Em mais de 30 anos de uso comercial, não foram apresentadas informações concretas de alergenicidade do *B. thuringiensis*, incluindo alergias ocupacionais relacionadas com a fabricação de produtos que contém *B. thuringiensis* (EPA, 1995a).

Embora o organismo doador não seja usado na produção de alimentos o homem ou animais podem consumi-lo agregado a partículas de solo ou aos alimentos como verduras e legumes ou forragens. O microrganismo *Bacillus thuringiensis* se encontra

presente em qualquer ambiente. Tem sido obtidos isolamentos de Bt em solos, poeira, fezes, guano, insetos, ninhos de aves, em criação do bicho da seda e em vegetação natural (Schnepf *et al.*, 1998). Conseqüentemente a dieta humana contém proteínas de diversas espécies de Bt. Não existem provas de que as proteínas inseticidas cristalizadas que se originam no *Bacillus thuringiensis* tenham efeitos tóxicos prejudiciais à saúde do homem ou de animais ou reações de alergenicidade em humanos (EPA, 1995a; EPA, 1996).

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva do solo, descoberta em 1901, no Japão, em bicho da seda doente. Pelo menos 176 diferentes produtos de *Bacillus thuringiensis* foram registrados como pesticidas após 1961 e, até agora, não houve trabalhos que confirmassem a toxicidade alimentar devido a seu uso. Além disso, não foram confirmados efeitos tóxicos imediatos, ou retardados, ou reações de alergenicidade em humanos em conseqüência da exposição a qualquer pesticida derivado de Bt desde o seu registro (EPA, 1995a). As subespécies *aizawai* e *kurstaki*, doadoras dos genes *cryIF* e *cryIAC*, respectivamente, são usadas comercialmente em pulverizações para controlar lagartas-praga e, esse uso mostrou que não são tóxicas para os mamíferos (Cornell University, 1996; McClintock *et al.*, 1995). As proteínas Cry1F e Cry1Ac são ingredientes ativos em pesticidas produzidos a partir do *B. thuringiensis*. Essas substâncias tem toxicidade específica contra certos lepidópteros-praga (organismos-alvo). *Streptomyces viridochromogenes* é um ubíqua bactéria do solo fonte do gene *pat* que codifica a fosfinotricina acetiltransferase (PAT), introduzido no evento 281-24-236 como um marcador para seleção. Esse microrganismo exibe atividade microbiana muito leve, é inibido por estreptomycina e não há relatos de efeitos adversos no homem, animais ou plantas. O *Streptomyces viridochromogenes* não é reconhecido como patógeno humano e não é associado a outras propriedades (*ex.* produção de toxinas) conhecidas por afetar a saúde humana. (Relatório de Biossegurança do Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23, páginas 49-52; processo CTNBio n°: 01200.005322/2006-55)

- **Toxicidade do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23**

A segurança das proteínas Cry1Ac, Cry1F e PAT para o homem e os animais tem sido avaliada e demonstrada com base em:

1. caracterização completa de cada proteína Cry1Ac, Cry1F e PAT individualmente;
2. ausência de homologia dessas proteínas com toxinas e alergênicos conhecidos;
3. rápida digestão em condições gástricas simuladas,
4. ausência de glicosilação;
5. pronunciada termolabilidade;
6. ausência de toxidez aguda quando avaliada, individualmente ou em combinação (Cry1Ac e Cry1F) em roedores, e ;
7. ausência de efeitos adversos em rações para frangos de corte derivadas de algodão 281-24-236/3006-210-23, onde as proteínas Cry1Ac, Cry1F e PAT estão presentes em combinação.

Todas as possíveis interações entre as proteínas Cry1Ac, Cry1F e PAT tem sido avaliadas para estimar a possibilidade de interações imprevisíveis entre as proteínas Cry1Ac, Cry1F e PAT, causar efeitos adversos ao homem e animais. Todos os resultados obtidos suportam as evidências iniciais de que o algodão 281-24-236/3006-210-23 é seguro sob o ponto de vista alimentar.

Estudos de Toxicidade Oral Aguda de Cry1F e Cry1Ac tem sido feitos em vários organismos. Em um estudo com camundongos, cinco machos e cinco fêmeas receberam tratamento, via gavagem (introdução de substância diretamente no estômago), ingerindo separadamente uma dose de 2000 mg/kg de Cry1F e de Cry1Ac produzidas por via microbiana. A proteína Cry1F e a proteína Cry1Ac foram administradas com uma suspensão de metil celulose. Devido ao fato do volume do material de teste exceder 2ml/100g de peso corporal, as doses foram administradas em duas (2) metades com intervalo aproximado de uma hora. As avaliações foram feitas de mudança de peso corporal e observações clínicas detalhadas por um período de 2 semanas. Todos os camundongos sobreviveram até o fim do período de duas semanas de observação. Não houve tratamento relacionado com as observações clínicas. Todos os camundongos ganharam peso durante o estudo. Não houve lesões patológicas graves em nenhum animal deste estudo. Baseada nestes dados, as DL₅₀ oral aguda nos camundongos machos e fêmeas CD-1 foi maior que 2000 mg/kg para Cry1F e acima de 5000 mg/kg para Cry1Ac.

A proteína PAT, uma acetiltransferase, tem sido bem estudada e caracterizada. As acetiltransferases são comuns na natureza e são encontradas em micróbios, plantas e animais. A PAT se degrada rapidamente em temperaturas elevadas (Dobson, 1995). Em 1997, a EPA emitiu uma notificação final isentando a proteína PAT da necessidade de se estabelecer um nível de tolerância em todas as commodities não processadas quando usada incorporada à planta. Para isentar a proteína PAT, a EPA avaliou os dados sobre o comportamento da PAT em fluidos digestivos simulados e dados de sua toxicidade oral aguda. A EPA concluiu que havia informação suficiente para concluir que nenhum dano resultou da exposição agregada. Isto pela ausência de toxicidade em mamíferos observada na forma de proteínas inseticidas e pelo fato da própria PAT não mostrar toxicidade com nenhuma mortalidade no subgrupo de animais no teste de alta dose de 2500 mg/kg; e além do fato dos dados de digestibilidade *in vitro* indicarem que a PAT é rapidamente degradada em fluidos digestivos.

Um estudo para fornecer informações adicionais sobre a segurança do algodão GM com aves, foi conduzido com farelo do algodão do evento 281-24-236/3006-210-23 e com algodão não-transgênico. Frangos de corte por apresentar crescimento rápido são considerados um modelo altamente sensível para estudos de alimentação. Em 42 dias, o frango cresce aproximadamente de 35g a mais de 2 kg, com o consumo de dietas incluindo farelo de sementes de algodão. Conseqüentemente o frango de corte é o animal escolhido quando se avalia a equivalência nutricional da dieta e se avalia os efeitos pleiotrópicos, devido à modificação genética. Nesse estudo não houve diferenças significativas na mortalidade de animais entre qualquer fonte de farelo de algodão, mostrando equivalente desempenho neste teste. Em geral, somente a conversão alimentar foi afetada por fontes diferentes de farelo de algodão embora o ganho de peso corporal e a mortalidade não tenham sido afetados pelas diferentes fontes de farelo de algodão. Os resultados deste estudo confirmam que o algodão 281-24-236/3006-210-23 é nutricionalmente equivalente aos algodoeiros convencionais (não-GM).

Outro ponto importante a considerar é que os teores das proteínas Cry1Ac e Cry1F em produtos processados de sementes de algodão GM, óleo e torta, estão abaixo do nível de detecção do método (Phillips *et.al.*, 2002). Além do fato da quantidade dessas proteínas de algodão na dieta humana ser negligível, Cry1F e Cry1Ac são inativadas por

calor em temperatura acima de 75°C (Herman & Gao, 2001a; Herman & Gao, 2001b). A seqüência ativa de aminoácidos de Cry1F é também encontrada no milho TC1507 (Herculex™ I) e similar seqüência ativa de Cry1Ac é também encontrada nos algodoeiros Bollgard™ I and Bollgard II. Os níveis de expressão das proteínas Cry1F e Cry1Ac variam nos diferentes tecidos das plantas desses algodoeiros GM, mas essas proteínas não são detectadas em produtos processados do algodão 281-24-236/3006-210-23 que são usados em alimentos, portanto em níveis menores ou comparáveis aos encontrados no organismo doador ou em outras plantas transgênicas comerciais.

O consumo de produtos de algodão pelo homem é limitado. Tipicamente, os produtos derivados de algodão ocorrem agregados a outros, e constituem um componente menor no consumo diário. A modificação genética para a expressão das proteínas Cry1F e Cry1Ac não irá alterar os padrões de consumo dos produtos de algodão. Os produtos geneticamente modificados introduzidos não são tóxicos e a exposição nos alimentos será insignificante. A exposição dietética ficará ainda mais restrita pela rápida digestão da proteína Cry1F, no trato digestivo.

Haverá uma exposição insignificante às proteínas Cry1F e Cry1Ac na dieta humana em consequência do pequeno consumo de produtos de algodão. O produto alimentício predominante derivado do algodão na dieta é o óleo da semente, no qual o conteúdo proteico é nulo. Quando se considera o consumo médio estimado na dieta, de produtos e ingredientes alimentícios derivados de algodão, no período de vida da população dos EUA, o consumo diário das proteínas Cry1F e Cry1Ac advindo do uso de produtos de algodão fica bem abaixo de 0,5 ppb (ng/g). A rápida digestibilidade tanto da proteína Cry1F como da Cry1Ac (menos de 1 min) reduz ainda mais a exposição destas proteínas. O evento 281-24-236/3006-210-23 também expressa a proteína PAT como um marcador para seleção. A expressão da proteína PAT confere tolerância à aplicação de glifosinato de amônio. A proteína PAT foi previamente assunto de numerosas avaliações de segurança em outras plantas geneticamente modificadas, tanto pela EPA como por outras agências internacionais, e verificou-se que ela não tem potencial de toxidez ou de alergenicidade ao homem. A proteína PAT é expressa em níveis muito baixos na planta de algodão dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23; portanto a exposição via dieta com produtos de algodão, será insignificante (abaixo de 0,5 ppb). (Relatório de Biossegurança do Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23, páginas 164-165; processo CTNBio nº: 01200.005322/2006-55)

- **Alergenicidade do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23**

As proteínas alergênicas de alimentos são geralmente estáveis na digestão péptica e trípica, e nas condições de acidez do sistema digestivo humano, de modo que podem chegar a passar através da mucosa intestinal para gerar uma resposta alérgica. Foi investigada a sensibilidade de Cry1F, Cry1Ac e PAT à digestibilidade *in vitro* em fluido gástrico simulado. As substâncias controle usadas foram o soro de albumina bovina (controle positivo) e β -lactoglobulina (controle negativo). Em testes todas as três proteínas e substâncias controle foram incubadas em fluido gástrico em pH 1,2 em intervalos específicos de tempo. A proteína Cry1F e Cry1Ac (Korjagin, 2001) foram rapidamente degradadas por pepsina em fluido gástrico simulado em menos de um

minuto; PAT foi digerida em menos de 30 segundos. A digestão foi confirmada por análises SDS-PAGE e Western blot para ambas as proteínas.

Foram determinadas as propriedades estruturais de Cry1F e Cry1Ac. Os estudos de glicosilação mostraram que as proteínas Cry1F e Cry1Ac purificadas por imunofinidade dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23 e, de Cry1F e Cry1Ac derivadas de *Pseudomonas fluorescens* não tinham ligações de carboidratos pós-traducionais covalentes detectáveis. Estudos de termolabilidade conduzidos com Cry1F e Cry1Ac (Herman & Gao, 2001a; Herman & Gao, 2001b) produzidas por *Pseudomonas fluorescens* demonstraram que Cry1F e Cry1Ac são desativadas após a exposição a 75°C por 30 minutos, como determinado em bio-ensaio.

Portanto, os genes introduzidos na linhagem de algodoeiro não codificam alérgenos conhecidos e tanto a proteína Cry1F como a proteína PAT não compartilham seqüências imunologicamente significativas de aminoácidos com alérgenos conhecidos. Estes resultados, junto com a rápida ruptura destas proteínas em condições digestivas, confirmam que as proteínas Cry1F, Cry1Ac e PAT não apresentam nenhum risco alergênico.

Embora as novas proteínas expressas em plantas transgênicas devam ser avaliadas para seu potencial de reações alérgicas em produtos alimentícios, é largamente reconhecido que não há um teste definitivo para predizer a resposta alérgica humana. Uma abordagem via *árvore de decisão* foi proposta pela Junta de Consultores de Especialistas da FAO/WHO em 2001 (FAO/WHO, 2001), com uma revisão posterior, da Força Tarefa do Codex Intergovernamental para Alimentos Derivados da Biotecnologia (Codex, 2002) concluiu que não foi possível chegar a decisões claras tipo sim/não para cada passo na árvore de decisão. Alternativamente, recomendaram que uma ampla faixa de informação, incluindo a fonte da proteína, similaridade de seqüência com alergênicos conhecidos, e propriedades estruturais da proteína, fossem examinadas passo a passo e de modo estruturado.

A avaliação das proteínas Cry1F, Cry1Ac e PAT expressas nos eventos 281-24-236 e 3006-210-23 não indicam potencial de alergenicidade em produtos alimentícios.

Os organismos fonte das proteínas Cry1F e Cry1Ac, *Bacillus thuringiensis* e PAT, *Streptomyces viridochromogenes* não são reconhecidos como alergênicos.

As seqüências de aminoácidos de Cry1F, Cry1Ac e PAT foram comparadas com proteínas conhecidas como alergênicas usando o software da Genetics Computer Group (GCG). Uma identidade de seqüência imunologicamente significativa com a proteína em questão (neste caso Cry1F, Cry1Ac ou PAT) requerem um pareamento de pelo menos oito (8) aminoácidos contíguos idênticos, que é o comprimento de alguns epitopos alergênicos em ligação da célula T. Dois bancos de dados foram gerados usando o software GCG, um sendo o banco de dados não-redundante baseado em bancos de proteínas administrados e publicados de conhecidas proteínas alergênicas, e outro baseado no primeiro banco de dados antes da retirada de duplicatas e entradas adicionais de bancos de dados públicos. A busca não revelou identidade de oito ou mais aminoácidos contíguos entre Cry1F, Cry1Ac ou PAT e qualquer seqüência de alergênicos conhecidos nos dois bancos de dados. Foi investigada a sensibilidade de Cry1F, Cry1Ac e PAT à digestibilidade *in vitro* em fluido gástrico simulado. As substâncias controle usadas foram o soro de albumina bovina (controle positivo) e β -lactoglobulina (controle negativo). Em testes todas as tres proteínas e substâncias controle foram incubadas em

fluido gástrico em pH 1,2 em intervalos específicos de tempo. A proteína Cry1F e Cry1Ac (Korjagin, 2001) foram rapidamente degradadas por pepsina em fluido gástrico simulado em menos de um minuto; PAT foi digerida em menos de 30 segundos. A digestão foi confirmada por análises SDS-PAGE e Western blot para ambas as proteínas.

Foram determinadas as propriedades estruturais de Cry1F e Cry1Ac. Os estudos de glicosilação mostraram que as proteínas Cry1F e Cry1Ac purificadas por imunofinidade dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23, e de Cry1F e Cry1Ac derivadas de *Pseudomonas fluorescens* não tinham ligações de carboidratos pós-traducionais covalentes detectáveis.

Estudos de termolabilidade conduzidos com Cry1F e Cry1Ac (Herman & Gao, 2001a) produzidas por *Pseudomonas fluorescens* demonstraram que Cry1F e Cry1Ac são desativadas após a exposição a 75°C por 30 minutos, como determinado em bioensaio.

(Relatório de Biossegurança do Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23, páginas 165-166; processo CTNBio nº: 01200.005322/2006-55)

- **Equivalência substancial do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23**

À semelhança do algodoeiro comum, o algodão GM é processado na indústria de alimento da mesma forma. Como ocorre equivalência substancial com o produto convencional, não há necessidade de procedimentos especiais para o processamento do produto geneticamente modificado. A equivalência substancial foi demonstrada através de análises composicionais de minerais, de lipídeos, de proteína, carboidrato, fibra bruta, fibra em detergente ácido (ADF) e fibra em detergente neutro (NDF), em amostras de sementes de algodão de linhagem dos eventos Cry1F 281-24-236 e 3006-210-23 em comparação com a linhagem controle. Os resultados das análises, dados abaixo, mostraram que não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23, e a linhagem controle.

Uma análise de cinzas, gordura total, umidade, proteína, carboidrato, calorias, fibra bruta, fibra em detergente ácido (ADF) e fibra em detergente neutro (NDF) em amostras de frações processadas de sementes de algodão incluindo grão, cascas, farelo torrado e óleo refinado, está resumida na Tabela 18. Os resultados da análise foram comparáveis para a linhagem com o evento 281-24-236 e para a linhagem controle, e os valores foram similares às faixas de amplitude relatadas na literatura, exceto para umidade no farelo processado. Os valores de umidade, tanto para o farelo de algodão do controle como para o do evento 281-24-236 foram levemente mais baixos do que os relatados na literatura; mas, como descrito acima, isso é provavelmente consequência de amostragem e preparação, uma vez que os resultados foram comparáveis entre as linhagens controle e transgênicas.

Tabela 18: Análise de grupos de frações processadas do evento 281-24-236 e do controle não-transgênico: grão, cascas, farelo e óleo

Os valores apresentados são amostras compostas de processamento em grupo de 6 locais, coletadas em testes de 2001.

Grupo (% base em peso seco)	Valores da Literatura	Grão Controle	Grão Evento 281-24-236
Umidade	NA ^a	7.6	7.6

Grupo (% base em peso seco)	Valores da Literatura	Cascas Controle	Cascas Evento 281-24-236
Cinzas	2.39-3.97	3.0	3.5
Gordura Total	1.0-3.3	3.0	1.2
Umidade	8.5-12.3	10.3	10.4
Proteína	4.0-6.9	7.1	6.1
Carboidratos	NA	86.8	89.2
Calorias (Kcalorias/100g)	NA	403	392

Grupo (% base em peso seco)	Valores da Literatura	Farelo Torrado Controle	Farelo Torrado Evento 281-24-236
Cinzas	4,6-9,8	6,0	6,6
Gordura Total	0,6-5,0	4,6	3,4
Umidade	8,0-13,3	2,2	5,0
Proteína	43,0-52,4	47,2	49,2
carboidratos	NA	42,1	40,8
Calorias (Kcalorias/100g)	NA	399	390
Fibra Bruta (%)	8,4-15,3	12,4	10,7
Fibra em Detergente Ácido(%)	12,2-23,9	18,5	15,9
Fibra em Detergente Neutro(%)	15,8-32,4	24,2	22,4

Grupo (% base em peso seco)	Valores da Literatura	Óleo Refinado Controle	Óleo Refinado Evento 281-24-236
Gordura Total	NA	100,2	100,1
Umidade	NA	< 0,1	< 0,1
Proteína	NA	< 0,1	< 0,1

^a Valor da literatura não disponível

Uma outra análise de cinzas, gordura total, umidade, proteína, carboidrato, calorias, fibra bruta, fibra em detergente ácido (ADF) e fibra em detergente neutro (NDF) em amostras de frações processadas de sementes de algodão incluindo grão, cascas, farelo torrado e óleo refinado, está resumida na Tabela 19. Os resultados da análise foram comparáveis para a linhagem com o evento 3006-210-23 e para a linhagem controle, e todos os valores para o evento 3006-210-23 ficaram dentro das faixas publicadas na literatura. Apenas para a linhagem controle, os valores de umidade foram levemente

acima da faixa publicada na literatura, e os valores de proteína para cascas foram levemente mais baixos do que os valores publicados na literatura.

Tabela 19: Análise de grupos de frações processadas do evento 3006-310-23 em comparação com o controle não transgênico: grão, cascas, farelo e óleo

Os valores apresentados são amostras compostas do processamento reunindo dados de 6 locais, coletadas no teste de 2001.

Grupo (% de peso seco)	Valores da Literatura	Grão Controle	Grão Evento 3006-310-23
Umidade	NA ^a	7,6	7,8

Grupo (% de peso seco)	Valores da Literatura	Cascas Controle	Cascas Evento 3006-310-23
Cinzas	2,39-3,97	3,0	2,9
Gordura Total	1,0-3,3	3,0	1,8
Umidade	8,5-12,3	10,3	11,4
Proteína	4,0-6,9	7,1	6,4
Carboidratos	NA	86,8	88,8
Calorias	NA	403	397

Grupo (% de peso seco)	Valores da Literatura	Farelo Torrado Controle	Farelo Torrado Evento 3006-310-23
Cinzas	4,6-9,8	6,0	6,7
Gordura Total	0,6-5,0	4,6	2,6
Umidade	8,0-13,3	2,2	9,1
Proteína	43,0-52,4	47,2	51,7
Carboidratos	NA	42,1	38,9
Calorias	NA	399	386
Fibra bruta (%)	8,4-15,3	12,4	9,1
Fibra Deterg. Ac.(%)	12,2-23,9	18,5	14,2
Fibra Det.Neutro (%)	15,8-32,4	24,2	18,8

Grupo (% de peso fresco)	Valores da Literatura	Óleo Refinado Controle	Óleo Refinado Evento 3006-310-23
Gordura Total	NA	100,2	100,1
Umidade	NA	< 0,1	< 0,1
Proteína	NA	< 0,1	< 0,1

^a Valor da literatura não disponível

Desses dados pode-se concluir que a composição centesimal do algodão com os eventos 281-24-236 e 3006-310-23 é equivalente a composição da linhagem controle (convencional).

A composição de tecidos de animais depois de terem consumido o algodão evento 281-24-236 e 3006-310-23 não tem sido determinada diretamente. Entretanto a composição de alimentos derivados do algodão GM e do controle convencional tem sido demonstrada serem equivalentes (Tabelas 18 e 19). A mesma demonstração tem sido feita em estudos comparativos com aves se alimentando de dietas com os dois tipos de algodão. Como mostra a Tabela 20 não houve diferenças significativas na mortalidade de animais entre qualquer fonte de farelo de algodão, mostrando equivalente desempenho neste teste. Em geral, somente a conversão alimentar foi afetada por fontes diferentes de farelo de algodão embora o ganho de peso corporal e a mortalidade não tenham sido afetados pelas diferentes fontes de farelo de algodão. Os resultados deste estudo confirmam que o algodão 281-24-236/3006-210-23 é nutricionalmente equivalente ao algodão convencional (não-GM).

Tabela 20: Estudo de desempenho de frangos de corte. Teste completo (de 0-42 dias). Médias de desempenho.

Crítérios ¹	Controle 1 (Não-GM)	Controle 2 (Não-GM)	Relacionado (Não-GM)	Material Teste (GM)
Peso Inicial (g)	51,44	51,47	51,81	51,11
DMS ¹	ab	ab	a	b
Peso Final (g)	1904,21	1920,92	1924,30	1926,16
DMS ¹	a	a	a	a
Taxa de conversão	1,858	1,845	1,846	1,819
DMS ¹	b	ab	ab	a
Mortalidade (%)	0,833	0,833	1,667	0,833
DMS ¹	a	a	a	a
Ganho Médio (g)	1852,766	1869,455	1872,496	1875,054
DMS ¹	a	a	a	a

¹ Médias dentro de uma fileira com mesma letra não são significativamente diferentes (P<0,05) como base na Diferença Mínima Significativa (DMS).

A termolabilidade do algodão GM acima de 75°C, a rápida digestibilidade das proteínas Cry1F e Cry1Ac, juntamente com a falta de toxicidade do produto geneticamente modificado permitem antever ausência de efeitos negativos na composição de tecidos animais alimentados com o produto GM. A equivalência na composição e nutrição do algodão 281-24-236/3006-210-23 e do controle, em combinação com a instabilidade das proteínas Cry1Ac and Cry1F e o fato de não serem tóxicas nos dá robusta evidência que a composição de animais alimentados com o produto GM é equivalente à composição de animais alimentados com algodão não-transgênico.

A utilização de produtos derivados das sementes de algodão na alimentação humana e animal, se resumem respectivamente em óleo comestível e farelo, sendo que a fração carboidrato ocorre apenas na composição de farelos resultante do processamento da casca rica em celulose. Análise de frações processadas da casca e de farelo derivados dos grãos do eventos 281-24-236 e 3006-210-23 comparadas com o controle não-transgênico das tabelas 18 e 19 mostram que os dois tipos de algodão são equivalentes para carboidratos totais. Não se antecipa nenhuma alteração na fração celulose, carboidrato constitutivo da parede celular.

A fração carboidrato ocorre apenas no farelo resultante do processamento da casca e os valores para o algodão GM e para o algodão não-GM das frações Fibra Total, Fibra Detergente Ácido e Fibra Detergente Neutro são equivalentes pode-se deduzir que a inserção dos genes *cry1F* e *cry1Ac* no algodão 281-24-236/3006-210-23 não afetou a digestibilidade ou a qualidade nutricional do produto transgênico.

Com relação a lipídeos não houve alteração na estrutura, composição ou teor de óleos no algodão 281-24-236/3006-210-23 e em suas partes. Isso é facilmente observado nas Tabelas 18 e 19 e também na composição dos ácidos graxos que é mostrado na tabela 21 para o evento 281-24-236 e tabela 22 para o evento 3006-210-23.

Tabela 21: Análise de ácidos graxos na fração óleo de produtos processados de semente de algodão do evento 281-24-236 e do controle não-transgênico

Os valores dados são amostras compostas de processamento reunido de todo os 6 locais, coletadas no teste de 2001.

Ácidos Graxos (% com base em	Valores da Literatura ^b	Óleo Refinado Controle	Óleo Refinado Evento 281-24-236
8:0 Caprílico	<0,05	< 0,1	< 0,1
10:0 Cáprico	<0,05	< 0,1	< 0,1
12:0 Láurico	<0,05-0,2	< 0,1	< 0,1
14:0 Mirístico	0,5-2,5	0,901	0,858
14:1 Miristoleico	NA ^c	< 0,1	< 0,1
15:0 Pentadecanóico	NA	< 0,1	< 0,1
15:1 Pentadecenóico	NA	< 0,1	< 0,1
16:0 Palmítico	17-29	23,1	22,7
16:1 Palmitoleico	<0,05-1,5	0,536	0,540
17:0 Heptadecanóico	<0,05-0,1	< 0,1	< 0,1
17:1 Heptadecenóico	<0,05-0,1	< 0,1	< 0,1
18:0 Esteárico	1,0-4,0	2,51	2,44
18:1 Oleico	13-44	16,6	16,6
18:2 Linoleico	33-58,2	50,6	50,9
18:3 Gama linolênico	<0,05-2,1	0,104	< 0,1
18:3 Linolênico	NA	0,106	0,108
20:0 Araquídico	<0,5-0,5	0,271	0,253
20:1 Eicosenóico	<0,05-0,1	< 0,1	< 0,1
20:2 Eicosadienóico	<0,05-0,1	< 0,1	< 0,1
20:3 Eicosatrinóico	NA	< 0,1	< 0,1
20:4 Araquidônico	0,1	< 0,1	< 0,1
22:0 Behenico	<0,05-0,6	0,157	0,127

^a Os ácidos graxos totais medidos nas amostras foram iguais a aproximadamente 95%. A gordura total foi igual ao total de conteúdo de lipídios, e o total de ácidos graxos é igual a 0,956 x a gordura total (Danish Food Composition Databank, http://www.foodcomp.dk/fcdb_aboutfooddata_proximates.htm). Portanto, essas unidades divergentes foram usadas para comparação.

^b Faixa combinada de dados da literatura .

^c Valor da literatura não disponível

Tabela 22: Análise de ácidos graxos na fração óleo de produtos processados de semente de algodão do evento 3006-210-23 e controle não transgênico.

Os valores apresentados são amostras compostas do processamento reunido de todos os 6 locais, coletadas no teste de 2001.

Ácidos Graxos (% com base no peso) ^a	Literatura ^b	Óleo Refinado Controle	Óleo Refinado Evento 3006-210-23
8:0 Caprílico	<0,05	< 0,100	< 0,100
10:0 Cáprico	<0,05	< 0,100	< 0,100
12:0 Láurico	<0,05-0,2	< 0,100	< 0,100
14:0 Mirístico	0,5-2,5	0,901	0,833
14:1 Miristoleico	NA ^c	< 0,100	< 0,100
15:0 Pentadecanóico	NA	< 0,100	< 0,100
15:1 Pentadecenóico	NA	< 0,100	< 0,100
16:0 Palmítico	17-29	23,1	22,6
16:1 Palmitoleico	<0,05-1,5	0,536	0,525
17:0 Heptadecanóico	<0,05-0,1	< 0,100	< 0,100
17:1 Heptadecenóico	<0,05-0,1	< 0,100	< 0,100
18:0 Esteárico	1,0-4,0	2,51	2,48
18:1 Oleico	13-44	16,6	16,4
18:2 Linoleico	33-58,2	50,6	52,0
18:3 Gama linolênico	<0,05-2,1	0,104	0,104
18:3 Linolênico	NA	0,106	0,128
20:0 Araquídico	<0,5-0,5	0,271	0,255
20:1 Eicosenóico	<0,05-0,1	< 0,100	< 0,100
20:2 Eicosadienóico	<0,05-0,1	< 0,100	< 0,100
20:3 Eicosatrinóico	NA	< 0,100	< 0,100
20:4 Araquidônico	0,1	< 0,100	< 0,100
22:0 Behenico	<0,05-0,6	0,157	0,146

^a A gordura total medida nas amostras foi de aproximadamente 95%. O conteúdo de gordura total é igual ao conteúdo de lipídios, e o total de ácidos graxos é igual a 0,956 x a gordura total (Danish Food Composition Databank, http://www.foodcomp.dk/fcdb_aboutfooddata_proximates.htm). Portanto, essas unidades divergentes foram usadas para comparação.

^b Faixa combinada de dados da literatura ..

^c Valor da literatura não disponível

(Relatório de Biossegurança do Algodão Evento 281-24-236/3006-210-23, páginas 185-187 e 209-211; processo CTNBio n°: 01200.005322/2006-55)

9. Segurança ambiental do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23

- Estudos de ecotoxicidez

A proteína Cry1F ocorre simultaneamente com a proteína Cry1Ac, pois as duas estão presentes no algodoeiro evento 281-24-236/3006-210-23, entretanto muitos dos estudos de ecotoxicidez foram conduzidos apenas com a proteína Cry1F. A Tabela 23

apresenta os resultados da análise de risco nos estudos de ecotoxicidez. Estes resultados envolvem a proteína Cry1F apenas ou em combinação com a proteína Cry1Ac, dependendo do material usado, a estratégia de dosagem e o resultado observado. A Tabela 24 apresenta os resultados da análise de risco para o nível de efeito mais baixo observado nos estudos de ecotoxicidez. Os valores são apresentados envolvendo a proteína Cry1Ac apenas ou em combinação com a proteína Cry1F, dependendo do material usado, da estratégia de dosagem e do resultado observado. Os resultados dos estudos de ecotoxicidez são descritos a seguir.

Os resumos dos testes de risco para os efeitos das proteínas Cry1F e Cry1Ac são mostrados respectivamente nas tabelas 23 e 24.

Tabela 23: Resumo das diretrizes dos testes de risco para os efeitos da proteína Cry1F.

Diretriz	Título do Estudo	Fonte da Proteína	Resultados
OECD 401	Toxidez aguda – camundongo	Proteína Cry1F derivada por via microbiana	DL 50 maior que 600 mg Cry1F/kg
OFPB 71-2	Toxidez dietética aguda Codorna Bobwhite do Norte	Farelo de algodão preparado com algodão 3006-210-23/281-24-236	CL50 –8 dias, maior que 100.000 µg de farelo/kg de dieta
OECD 207	Toxidez aguda-minhoca	Proteína Cry1F derivada por via microbiana, só ou combinada com proteína Cry1Ac derivada por via microbiana	CL50 – 14 dias, maior que 247 mg de Cry1F/kg de solo 762 vezes a CAE no solo.
OECC PROPOSTO	Toxidez crônica – Collembola	Proteína Cry1F derivada por via microbiana, só ou combinada com proteína Cry1Ac derivada por via microbiana	CL50 maior que 702 µg Cry1F/kg e 2167 vezes a CAE no solo.
OECD 202	Toxidez dietética aguda Daphnia magna	Combinação das proteínas Cry1F e Cry1Ac derivadas por via microbiana	EC50 – 48 horas, maior que 510 µg Cry1F/l. e 395 vezes a CAE na água.
OECD 203	Toxidez dietética aguda Truta arco-íris	Farelo de algodão derivado de 3006-210-23/281-24-236	CL50 – 8 dias, maior que 0,209 mg/kg de dieta e 162 vezes a CAE na água.
OPPTS 886.4380	Toxidez dietética aguda DL50 Abelha	Combinação das proteínas Cry1F e Cry1Ac derivadas por via microbiana	CL50, maior que 1,98 µgCry1F/g dieta e 2,8 vezes o limite superior de expressão no pólen.
OPPTS 886.4340	Inseto não-alvo - Crisopa	Combinação das proteínas Cry1F e CryAc derivadas por via microbiana	LD50 maior que 5,2 µg Cry1F/dieta e 7 vezes o limite superior de expressão no pólen. E 4 vezes o limite superior de expressão no néctar.
OPPTS886.4340	Inseto não-alvo – Himenóptero parasita	Proteína Cry1F derivada por via microbiana, só ou combinada com proteína Cry1Ac derivada por via microbiana	LD50 maior que 5,2 µgCry1F/dieta e 7 vezes o limite superior de expressão no pólen. E 104 vezes o limite superior de expressão no néctar
OPPTS 886.4340	Inseto não-alvo Joaninha	Proteína Cry1F derivada por via microbiana, só ou combinada com proteína Cry1Ac derivada por via microbiana	LD50 maior que 300 µgCry1F/ml e 428 vezes o limite superior de expressão no pólen.

Tabela 24: Resumo das diretrizes para testes de risco para efeitos da proteína Cry1Ac.

Diretriz	Título do Estudo	Fonte da Proteína	Resultados
OECD 401	Toxidez aguda – camundongo	Proteína Cry1Ac derivada por via microbiana	DL 50 maior que 700 mg Cry1Ac/kg
OFPB 71-2	Toxidez dietética aguda Codorna Bobwhite do Norte	Farelo de algodão preparado com algodão 3006-210-23/281-24-236	CL50 –8 dias, maior que 100.000 µg de farelo/kg de dieta
OECD 207	Toxidez aguda-minhoca	Proteína Cry1Ac derivada por via microbiana	CL50 – 14 dias, maior que 107 mg de Cry1Ac/kg de solo ; 3.066 vezes a CAE no solo
OECD PROPOSTO	Toxidez crônica – Collembola	Folhas liofilizadas de algodão do evento 3006-210-23	CE50 maior que 164,5 µg Cry1Ac/kg; 5 vezes a CAE no solo
OECD 202	Toxidez dietética aguda <i>Daphnia magna</i>	Combinação das proteínas Cry1Ac e Cry1F derivadas por via microbiana	EC50 – 48 horas maior que 2.500 µg Cry1Ac/l.; 13.000 vezes a CAE na água
OECD 203	Toxidez dietética aguda Truta arco-íris	Farelo de algodão derivado de 3006-210-23/281-24-236	CL50 – 8 dias maior que 0,118 mg/kg de dieta. 618 x a CAE na água.
OPPTS 886.4380	Toxidez dietética aguda DL50 Abelha	Combinação das proteínas Cry1Ac e Cry1F derivadas por via microbiana	CL50 maior que 11,94 µgCry1Ac/g dieta; 58 vezes o limite superior de expressão no pólen
OPPTS 886.4340	Inseto não-alvo - Crisopa	Combinação das proteínas Cry1Ac e Cry1F derivadas por via microbiana	LD50 maior que 4,68 µgCry1Ac/dieta; 2 vezes o limite superior de expressão no pólen; 94 vezes o limite superior de expressão no néctar.
OPPTS 886.4340	Inseto não-alvo – Himenóptero parasita	Proteína Cry1Ac derivada por via microbiana, só ou combinada com proteína Cry1F derivada por via microbiana	LD50 maior que 46,8 µgCry1Ac/dieta; 19 vezes o limite superior de expressão no pólen; 900 vezes o limite superior de expressão no néctar
OPPTS 886.4340	Inseto não-alvo Joaninha	Proteína Cry1Ac derivada por via microbiana, só ou combinada com proteína Cry1F derivada por via microbiana	LD50 maior que 22,5 µgCry1Ac/ml; 9 vezes o limite superior de expressão no pólen.

O detalhamento dos testes de risco realizados para estudar os efeitos das proteínas Cry1F e Cry1Ac são mostrados a seguir para vários organismos não-alvo.

Mamíferos

Uma preparação protéica microbiana contendo 30% de proteína Cry1F (cadeia completa) foi avaliada para toxidez oral aguda por via gavagem a camundongos CD1 machos e fêmeas (Brooks & Andrus, 1999). Todos os camundongos sobreviveram e não houve efeitos adversos em termos de peso corporal, observações clínicas detalhadas e lesões patológicas graves durante um período de observação de duas semanas. Sob as condições deste estudo, a DL50 da proteína microbiana Cry1F em camundongos CD1 machos e fêmeas foi maior que 600 mg i.a./kg.

Em estudo correspondente uma preparação de proteína microbiana contendo 14% de proteína Cry1Ac foi avaliada para toxidez oral aguda por administração forçada a camundongos CD1 machos e fêmeas (Brooks & Yano, 1999). Todos os camundongos sobreviveram e não houve efeitos adversos em termos de peso corporal, observações clínicas detalhadas e lesões patológicas graves durante um período de observação de duas semanas. Sob as condições deste estudo, a DL50 da proteína microbiana Cry1Ac em camundongos CD1 machos e fêmeas foi superior a 700 mg i.a./kg.

Aves

Um estudo nutricional agudo de 8 dias para aves com a codorna Bobwhite investigou o efeito de 10% de farelo de algodão preparado a partir de sementes de algodão expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac. Isso produziu uma dieta contendo 0,021 µg de proteína Cry1F por g em combinação com a proteína Cry1Ac. A CL50 foi maior que 100.000 µg de farelo/g de dieta (maior que 2100 ng de Cry1F per g de dieta) (Gallagher & Beavers, 2002). O farelo de algodão preparado de semente de algodão 281-24-236/3006-210-23 foi usado como 10% da dieta. Este nível de alimentação se aproxima de 400 sementes/kg de peso corporal por ave por dia (Payne, 1995) e representa o máximo de farelo de algodão que pode ser tolerado na dieta da codorna. Baseada na quantidade média de Cry1F na ração, a dieta continha na verdade menos proteína Cry1F do que o valor máximo de exposição à semente do algodão, uma vez que a proteína Cry1F foi degradada quando a semente do algodão foi processada a farelo. Isso é consistente com o destino esperado da proteína quando processada em alimento ou ração. Além do deste estudo, um estudo oral agudo com administração forçada foi feito com codorna Bobwhite, onde a proteína Cry1F foi dada em combinação com a proteína Cry1Ac em uma dose oral única. Nenhuma mortalidade ocorreu e o nível sem efeitos observáveis foi de 113,6 mg /kg (Gallagher & Beavers, 2002).

Da mesma forma um estudo nutricional agudo de 8 dias com a codorna Bobwhite investigou o efeito de uma dieta com 10% de farelo de algodão contendo 0,012 µg da proteína Cry1Ac em combinação com a proteína Cry1 (Gallagher & Beavers, 2002). Foi demonstrado que não houve efeitos adversos com o tratamento e a CL50 foi de 100.000 µg de farelo/g de dieta (maior que 1.200 ng Cry1Ac por g de dieta)

Aves silvestres não consomem sementes de algodão ou de outro modo seriam expostas à proteína Cry1Ac em sua dieta. Baseada na média de Cry1Ac medida na ração, a dieta conteve menos proteína Cry1Ac do que com a exposição máxima na semente do algodão, uma vez que a proteína Cry1Ac foi degradada quando a semente do algodão foi processada para farelo. Isso é consistente com o destino esperado da proteína quando processada em alimento ou ração. Além do estudo presente, um estudo oral agudo com administração forçada foi feito com codorna Bobwhite, onde a proteína Cry1Ac foi dada em combinação com a proteína Cry1F em uma dose oral única. Nenhuma mortalidade ocorreu e o nível sem efeitos observáveis foi de 14,4 mg /kg (Gallagher & Beavers, 2002).

Invertebrados do solo

Minhoca:

A proteína Cry1F derivada por via microbiana, pura ou em combinação com a proteína Cry1Ac, não mostrou toxicidade a minhocas (*Eisenia foetida*). A CL50 foi maior que 247 mg de proteína Cry1F por kg de peso seco de solo (Sindermann *et al.*, 2001). Isso representa concentrações que são 762 vezes a Concentração Ambiental Esperada (CAE), com a incorporação das plantas de algodão do evento 281-24-236 nos 15 cm superiores do solo.

Por outro lado a proteína Cry1Ac derivada por via microbiana, só ou em combinação com a proteína Cry1F, não mostrou toxicidade a minhocas (*Eisenia foetida*). A CL50 foi maior que 107 mg de proteína Cry1Ac por kg de peso seco de solo (Sindermann *et al.*, 2001). Isso representa concentrações que são 3066 vezes a CAE esperada com a incorporação das plantas de algodão do evento 3006-210-23 nos 15 cm superiores do solo.

Collembola:

Collembola tem um papel importante nos ecossistemas do solo devido à sua alimentação em material vegetal em decomposição. Foi conduzido um estudo de laboratório para determinar os efeitos crônicos da proteína Cry1F na sobrevivência e reprodução do invertebrado collembola do solo, *Folsomia candida*, usando Cry1F derivada por via microbiana acrescentada a fermento de cervejaria, alimento padrão de collembola (Teixeira, 2002). A concentração testada foi de 709 mg de proteína Cry1F por kg de dieta ou 702 mg de proteína Cry1F por kg de dieta em combinação com a proteína Cry1Ac. Não houve efeito observável com a exposição à proteína Cry1F na dieta. A CE50 foi maior que 702 mg de proteína Cry1F por kg de dieta, representando uma exposição de 2167 vezes a CAE do solo para o evento 281-24-236 (0,324 mg/kg).

Correspondentemente foi conduzido um estudo de laboratório para determinar os efeitos crônicos da proteína Cry1Ac em *Folsomia candida*, usando Cry1Ac derivada por via microbiana. A concentração maximizada testada foi de 22,6 mg de proteína Cry1Ac por kg de dieta, tanto só como em combinação com a proteína Cry1Ac. O estudo também avaliou os efeitos crônicos de dietas contendo folhas de algodão liofilizadas do evento 3006-210-23 em concentrações de 5% a 50% da dieta. A proteína Cry1Ac não causou efeitos significativos à sobrevivência e reprodução de adultos. No teste com a proteína microbiana, houve, no entanto, um efeito anômalo da proteína Cry1Ac causando uma redução no tamanho da progênie quando administrada na dieta com fermento de cervejaria a concentrações nominais de 22,6 mg Cry1Ac/kg de dieta, um nível 647 vezes acima da CAE para Cry1Ac expressa pelo evento 3006-210-23 no solo. Este efeito não ocorreu com o tecido de folha liofilizado de plantas de algodão 3006-210-23 com níveis de exposição de 5% e 50% de tecido liofilizado em uma dieta de cervejaria, representando aproximadamente 16,45 e 164,5 µg de proteína Cry1Ac por kg de dieta baseado no limite máximo de expressão na folha de Cry1Ac. Os resultados do estudo *in toto* não mostram nenhum efeito da proteína Cry1Ac quando presente em aproximadamente 5 vezes a CAE do solo para o evento 3006-210-23 (34,9 µg/kg). A CE₅₀ foi maior que 164,5 µg de proteína Cry1Ac por kg de dieta.

Efeitos em organismos aquáticos

Daphnia magna.

Não há efeitos adversos das proteínas Cry ao invertebrado aquático *Daphnia magna*. Um teste de limite estático de 48 horas com *Daphnia* foi conduzido com 510 µg/l de proteína Cry1F em combinação com a proteína Cry1Ac (Marino & Yaroch, 2002). Essa taxa de reforço representa 395 vezes a CAE para a proteína Cry1F do evento 281-24-236 na água de superfície (1,21 µg/l). A solubilidade da proteína nessas concentrações não é completa. O estudo foi, portanto, conduzido na concentração máxima praticável, embora esse nível não tenha sido medido. Nenhum efeito foi observado usando-se uma solução saturada. Não houve efeitos do tratamento em termos de imobilidade ou efeitos sub-letais; portanto, a CE50 de 24 e 48 horas ficou acima de 510 µg de Cry1F/l.

Teste semelhante com *Daphnia* foi conduzido com 2.500 µg/l de proteína Cry1Ac em combinação com a proteína Cry1F (Marino & Yaroch, 2002). Esse incremento de dose representa mais de 13.000 vezes a CAE para a proteína Cry1Ac do evento 3006-210-23 na água de superfície. A solubilidade da proteína nessa concentração não é completa. O estudo foi, portanto, feito numa concentração máxima que se poderia realizar, embora esse nível não tenha sido mensurado. Nenhum efeito foi observado usando-se essa solução saturada em termos de imobilidade ou efeitos sub-letais; A CE50 de 24 e 48 horas foi maior que 2.500 µg de Cry1Ac/l.

Peixes.

A toxidez aguda pela dieta com proteína Cry1F à truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) foi determinada para peixes expostos por oito dias a uma dieta peletizada para trutas tipo comercial contendo 10% de farelo preparado com algodão expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac (Marino & Yaroch, 2002). Isso produziu uma dieta contendo uma dosagem inicial de 0,209 g de Cry1F por g de alimento em combinação com a proteína Cry1Ac. A dieta controle consistiu da mesma dieta comercial para peixes preparada com farelo de algodão não transgênico. Nenhuma mortalidade de peixes ou efeitos sub-letais foram observados quer para a dieta controle quer para a do tratamento com o OGM. Baseado, portanto, nas observações biológicas, o valor da CL50 de oito dias com a truta arco-íris é maior que 0,209 mg/kg de dieta, representando 162 vezes a CAE esperada para a proteína Cry1F do evento 281-24-236 na água de superfície.

Da mesma forma foi realizado estudo com a proteína Cry1Ac ministrada à truta arco-íris. Produziu-se uma dieta contendo uma dosagem inicial de 0,118 g de Cry1Ac por g de alimento em combinação com a proteína Cry1Ac. A dieta controle consistiu da mesma dieta comercial para peixes preparada com farelo de algodão não transgênico. Nenhuma mortalidade de peixes ou efeitos sub-letais foram observados quer para a dieta controle quer para a do tratamento. Baseado, portanto, nas observações biológicas, o valor da CL50 de oito dias com a truta arco-íris foi maior que 0,118 mg/kg de dieta, representando 618 vezes a CAE para a proteína Cry1Ac do evento 3006-210-23 na água de superfície.

- **Efeitos em artrópodos não-alvo**

Abelha.

Não houve efeito na sobrevivência média da emergência de abelhas expostas a 2 mg de pólen do evento expressando Cry1F ou a 1,98 µg por ml de proteína Cry1F em combinação com a proteína Cry1Ac (Maggi, 2001). A CL50 para exposição à proteína Cry1F foi maior que 1,98 µg por ml (1,98 µg por g) e representou aproximadamente 3 vezes a expressão máxima encontrada no pólen do evento 281-24-236. Essa dose representa 19,8 ng/larva, uma quantidade equivalente àquela que estaria presente em 28,2 mg de pólen baseado no LSE de 0,7ng/mg de pólen.

Estudo semelhante também mostrou que não houve efeito na sobrevivência média para emergência em abelhas expostas a 2 mg de pólen do evento expressando Cry1Ac ou a 11,94 µg por ml de proteína Cry1Ac em combinação com a proteína Cry1Fc (Maggi, 2001). A CL50 para exposição à proteína Cry1Ac foi maior que 11,94 µg por ml (11,94 µg por g) e representa aproximadamente 5 vezes o maior valor expresso no pólen do evento 3006-210-23.

Crisopa.

A CL50 em dieta para larvas de crisopa (*Chrysoperia carnea*) expostas à proteína Cry1F pura ou em combinação com a proteína Cry1Ac, foi investigada em uma série de estudos com a proteína microbiana administrada em uma dieta de ovos de mariposa (Sindermann *et al.*, 2002a). Não houve efeito de Cry1F a 5,2 microgramas/g em combinação com Cry1Ac em um teste, mas não no segundo teste. O teste com apenas Cry1F não mostrou efeito. A CL50 em dieta para crisopa foi $\leq 5,2$ µg por g nessa base, e representa um nível de exposição à proteína Cry1F de 104 vezes maior que o limite superior do néctar do evento 281-24-236 e acima de 7 vezes o encontrado no pólen. Dados de segurança alimentar, baseados em uma fonte específica de alimento com afídeos consumindo tecido vegetal transgênico, seriam significativamente mais altos (cerca de 100 a 4.000 vezes maior).

Paralelamente foram realizados estudos com larvas de crisopa expostas à proteína Cry1Ac, só ou em combinação com a proteína Cry1F (Sindermann *et al.*, 2002a). Não houve efeito para Cry1Ac em uma concentração de 46,8 µg/g de dieta. Em outro estudo foi encontrado um efeito significativo de Cry1Ac a 46,8 µg/g em combinação com 5,2 µg/g de Cry1F. Entretanto, em um segundo teste, não foi observado efeito tóxico dessas proteínas. Em concentração mais baixa, de 4,68 µg/g de proteína Cry1Ac em combinação com 0,52 µg/g de Cry1F não foi observado toxicidade dessas proteínas. Estudos anteriores demonstraram que Cry1Ac é praticamente não tóxica à Crisopa (USEPA, 1995). A CL50 projetada de maneira conservadora para Crisopa exposto à proteína Cry1Ac foi maior que 4,68 µg/g. O nível de exposição da proteína Cry1Ac representa uma concentração 94 vezes mais alta do que o limite máximo de expressão da proteína no néctar do evento 3006-210-23 e 2 vezes mais alta do que no pólen. Dados de segurança alimentar, baseados em uma fonte típica de alimento da crisopa, ou seja afídeos consumindo tecido vegetal transgênico, seriam significativamente mais altos (de 100 a 4.000 vezes maior). A toxicidade em larvas de crisopa não é considerada ecologicamente relevante para a avaliação

do risco do algodão dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23, uma vez que a exposição, se ocorre, será indireta, e os resultados de censos de campo sobre a abundância de crisopa não mostram impacto tanto da proteína Cry1f como da Cry1Ac como elas se expressam no algodão MXB-13 (Mahill & Storer, 2002).

Vespa parasita.

Himenópteros parasitas (*Nasonia vitripennis*) foram expostos a uma única concentração limite da proteína Cry1F pura e em combinação com a proteína Cry1Ac, em água com açúcar por até 10 dias. Não houve diferenças significativas em mortalidade entre os grupos de tratamentos e um controle negativo de água com açúcar no dia 9, que foi o último dia de observação antes do aumento da mortalidade além do critério estabelecido no protocolo para o controle negativo (20%). Para o ensaio com vespas, além desse ponto, os resultados do teste ficam comprometidos. A CL50 foi maior que 5,2 µg i.a. por ml de proteína Cry1F expressa por via microbiana (Sindermann *et al.*, 2002b). O nível de exposição representa concentrações acima de 104 vezes o limite superior de expressão da proteína Cry1F no néctar do evento 281-24-236 e 7 vezes acima do encontrado no pólen.

Parasita himenóptero, *Nasonia vitripennis*, também foi exposta a uma única concentração limite da proteína Cry1Ac sózinha e em combinação com a proteína Cry1F, em água com açúcar por até 10 dias. Também não houve diferenças significativas em mortalidade entre os grupos de tratamentos e um controle negativo de água com açúcar até o nono dia de teste, que foi o último dia de avaliação antes da mortalidade ficar acima de 20%, limite pré-estabelecido para o controle negativo. Para o ensaio com vespas, além desse ponto, os resultados comparativos do teste ficariam comprometidos. A CL50 foi maior de 46,8 µg i.a./ml de proteína Cry1Ac expressa por via microbiana (Sindermann *et al.*, 2002b). O nível de exposição representa concentrações 900 vezes mais altas do que o limite superior de expressão da proteína Cry1Ac no néctar do evento 3006-210-23 e cerca de 19 vezes mais alta do que no pólen. Fatores de segurança alimentar baseados em um fonte típica de alimento da vespa parasita, ou seja, larvas de lepidópteros consumindo tecido vegetal transgênico, seriam de 9 a 286 vezes mais alto.

Joaninha.

Joaninhas adultas, *Hippodamia convergens* não foram afetadas quando expostas à proteína Cry1F expressa por via microbiana, pura ou combinada com a proteína Cry1Ac (Porch & Krueger, 2001). As Joaninhas alimentadas *ad libitum* por 15-dias com dietas contendo 300 µg de proteína Cry1F por ml de alimento, só ou em combinação com Cry1Ac, foram monitoradas quanto à mortalidade e sinais clínicos de toxidez. A CL50 para exposição à proteína Cry1F foi maior que 300 µg por ml, equivalente a 428 vezes acima do limite superior de exposição ao pólen do evento 281-24-236.

Estudo semelhante com Joaninhas alimentadas *ad libitum* por 15-dias com dietas contendo 22,5 µg de proteína CryAc por ml de alimento, só ou em combinação, foram monitoradas quanto à mortalidade e sinais clínicos de toxidez. A CL50 para exposição à proteína Cry1Ac foi maior que 22,5 µg de proteína Cry1Ac/ml, equivalente a a mais de 9 vezes o limite superior de exposição ao pólen do evento 3006-210-23

Borboleta Monarca.

A exposição incidental do estágio larval sensível de uma borboleta ou mariposa não-alvo à proteína Cry1F pode ocorrer se o pólen do evento 281-24-236 estiver presente nas plantas hospedeiras e for consumido. Larvas de Monarca alimentando-se de Leiteiro (*Asclepias curassavica* L) contendo pólen transgênico foi uma alternativa para se estudar exposição indireta de uma larva de lepidóptero sensível hipotética não-alvo ao pólen do algodão. A resposta da borboleta Monarca de primeiro instar (*Danaus plexippus* L.) exposta a Cry1F em dieta artificial por 7 dias é relatada em estudo de Hellmich *et al.* (2001). Nesse estudo a concentração dietética que resultou em 50% de redução de crescimento relativamente aos controles (CE50) foi de 5.220 ng i.a./ml para Cry1F. Hellmich *et al.* (2001) apresentam cálculos para se converter resultados de dieta artificial, para estimativas superiores dos níveis de efeitos, em termos de consumo de pólen sobre folhas da planta hospedeira da Monarca, o *milkweed* Leiteiro (*Asclepias curassavica* L.). Nessa base, os níveis de efeitos equivalentes, em termos de densidade de pólen sobre as folhas da planta hospedeira foram maiores que $4,5 \times 10^5$ grãos de pólen do evento 281-24-236 por cm² de folha consumida, para a proteína Cry1F. A CE50 para a proteína Cry1F expressa no pólen do algodão, portanto, foi de 450.000 vezes mais alta do que a concentração ambiental estimada no pólen do evento 281-24-236.

Estudos paralelos e correspondentes foram realizados com larvas de Monarca alimentando-se da planta hospedeira Leiteiro (*Asclepias curassavica* L.) contendo pólen transgênico. Essa foi a alternativa para se estudar exposição indireta de uma larva de lepidóptero sensível hipotética não-alvo ao pólen do algodão. A resposta da borboleta Monarca (*Danaus plexippus* L.) em larvas de primeiro instar expostas a Cry1Ac em dieta artificial por 7 dias é relatada em estudo de Hellmich *et al.* (2001). A concentração dietética que resultou em 50% de redução de crescimento relativamente aos controles (CE50) foi de 0,9 ng i.a./ml para Cry1Ac. Hellmich *et al.* (2001) apresentam cálculos para fazer a correspondência dos resultados de dieta artificial com as estimativas superiores dos níveis de efeitos expressos em termos de consumo de pólen sobre folhas de Leiteiro, planta hospedeira da Monarca. Nessa base, os níveis de efeitos equivalentes, em termos de densidade de pólen sobre as folhas da planta hospedeira, foi de 11 grãos de pólen do evento 3006-210-23/cm² de folha consumida, para a proteína Cry1Ac. A CE50 para a proteína Cry1Ac expressa no pólen do algodão, portanto, ficou 10 vezes mais alta do que a concentração ambiental estimada no pólen do evento 3006-210-23.

• **Estudo de Censo de Artrópodes Não-Alvo no Campo**

A ausência de efeitos adversos a não-alvos de Cry1F em exposição a concentrações ambientalmente relevantes é substanciada por estudo de monitoramento de campo do algodão MXB-13, produto piramidado contendo a proteína Cry1F derivada do evento 281-24-236. Os artrópodes benéficos presentes nas parcelas de campo de 281-24-236/3006-210-23 foram comparados com aqueles em parcelas de campo de algodão não transgênico com mesma base genética, com e sem aplicação de inseticida, em locais da Louisiana e Arizona (Mahill & Storer, 2002). Resultados nos EUA mostram ausência de efeito adverso do evento 281-24-236/3006-210-23 no censo de insetos de mais de 50 taxa monitoradas, usando observações, amostragem de organismos em toda a planta e

redes. O tratamento com inseticida sintético, entretanto, reduziu a população de algumas taxa de artrópodes não-alvo em algumas épocas de amostragem. As parcelas de campo foram suficientemente grandes (1.000 m²) para minimizar o movimento da maioria das espécies de uma parcela à outra, embora os insetos mais móveis possam ter se movimentado entre parcelas.

- **Considerações sobre insetos benéficos.**

As conseqüências do cultivo do algodão expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac sobre insetos benéficos foram consideradas por Wolt (2002). Mais de 300 espécies diferentes de insetos benéficos são conhecidos habitando campos de algodão. Artrópodos comuns, predadores e parasitas nos campos de algodão são representantes de ordens que não são sensíveis às proteínas Cry1. Além disso, esses organismos benéficos são predominantemente predadores e parasitas, e somente em poucos casos consomem produtos vegetais (pólen e néctar), e nesses exemplos o consumo é feito por adultos num estágio de vida que não são sensíveis às proteínas. Os riscos diretos aos insetos benéficos, da exposição às proteínas Cry1F e Cry1Ac expressas no algodão dos eventos 281-24-236 e 3006-210-23 são desprezíveis. O risco de exposição indireta às proteínas Cry1F e Cry1Ac através da alimentação tritrófica com insetos hospedeiros/presa também é insignificante, devido aos baixos níveis de exposição esperados em comparação com níveis de efeitos mostrados em testes equivalentes. As margens de segurança apresentadas em estudos de risco com exposição direta são bastante conservadoras, ao passo que em exposição secundária são muito reduzidas como ocorre na alimentação tritrófica de insetos benéficos.

- **Estudo de organismos não-alvo realizado no Brasil**

Um trabalho realizado no Brasil por Gravena *et al* (2007b), na safra de 2006/7, fez parte de um grande estudo para avaliar o efeito do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 em organismos não-alvo com coletas de insetos bem representativas em parcelas grandes de 1.296 m², portanto simulando condições que ocorrem numa lavoura comercial de algodão. Nessa fase é mostrado uma parte desse estudo sobre a comunidade de artrópodes chaves não-alvo nas unidades operativas da Dow AgroSciences de Indianópolis - MG e Mogi Mirim – SP, como parte do processo 01200.006807/2004-02.

O delineamento estatístico utilizado foi de blocos casualizados, com 3 tratamentos e 3 repetições. Cada parcela teve uma área de 1.296 m² (32,4 x 40,0 m). Os tratamentos foram constituídos pela cultivar de algodão Bt MXB-13, contendo o evento cry1F/cry1Ac, pela cultivar convencional PSC-355 sem aplicação de inseticidas para controle de lagartas e pela cultivar convencional PSC-355 com aplicação de inseticidas para controle de lagartas. A cultivar convencional PSC-355 é a mesma que a MXB-13, diferindo apenas no evento introduzido. Os inseticidas aplicados neste último tratamento foram Tracer 0,1 L/ha (spinosade) (1^a Aplicação), Lannate 1,5 L/ha (metomil) (2^a Aplicação), Intrepid 240 SC 0,6 L/ha (metoxifenoazida) (3^a Aplicação), Stallion 0,1 L/ha (gamacialotrina) (4^a Aplicação) e Curacron 500 1,0 L/ha (profenofós) (5^a aplicação - somente em Mogi Mirim).

A avaliação dos artrópodes presentes nas plantas do algodão foi realizada aproximadamente a cada 14 dias. Consistiram na identificação e quantificação de insetos e aranhas não alvo do algodão Bt e das lagartas alvo encontrados na observação visual detalhada de vinte plantas de cada parcela, tomadas ao acaso. Na Tabela 25 estão apresentadas as datas de avaliação, com os respectivos estádios de desenvolvimento do algodão de acordo com a escala BBCH.

Os dados de número de indivíduos foram transformados em raiz quadrada de $(x+1)$ e os de porcentagem de plantas infestadas foram transformados em arcseno da raiz quadrada de (x) , antes de serem submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas por Tukey a 5%. Os dados utilizados na apresentação dos resultados são os não transformados.

Tabela 25: Datas das avaliações e respectivos estádios da cultura de acordo com a escala BBCH (Meier, 2001). Indianópolis - MG e Mogi Mirim - SP, 2007.

Número da Avaliação	Indianópolis		Mogi Mirim	
	Data da Avaliação	Estádio da Cultura	Data da Avaliação	Estádio da Cultura
1	27/03/2007	51	29/03/2007	52
2	03/04/2007	51	12/04/2007	55
3	10/04/2007	55	27/04/2007	60
4	24/04/2007	61	11/05/2007	75
5	08/05/2007	61	24/05/2007	89
6	23/05/2007	63	06/06/2007	94
7	06/06/2007	67	21/06/2007	97
8	20/06/2007	71	29/06/2007	97
9	26/06/2007	79	-	-

Os artrópodes não alvo identificados e quantificados na área de Indianópolis-MG estão divididos em pragas e predadores. As pragas vaquinha (*Diabrotica speciosa*, Coleoptera: Chrysomelidae) e bicudo (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) foram quantificadas pelo número de indivíduos encontrados nas plantas de algodão, assim como os predadores, e os resultados para o total das avaliações estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Número de insetos pragas e inimigos naturais não alvo do algodão Bt encontrados em sessenta plantas, em função dos tratamentos. Indianópolis- MG, Safra 2007.

Ordem	Família	Gênero; Espécie ⁽¹⁾	Cultivar	Cultivar	Cultivar	TOTAL	P ⁽²⁾
			OGM	convencional sem Inseticida	Convencional com Inseticida		
			Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Pragas Não Alvo							
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Diabrotica spaciosa</i>	19 (4,0)	21 (4,2)	36 (9,1)	76 (5,5)	0,35 ns
Coleoptera	Curculionidae	<i>Anthonomus grandis</i>	19 (4,0)	17 (3,4)	6 (1,5)	42 (3,1)	0,08 ns
Percevejos Predadores							
Hemiptera	Anthocoridae	<i>Orius</i> sp.	20 (4,2)	21 (4,2)	15 (3,8)	56 (4,1)	0,88 ns
Hemiptera	Nabidae	<i>Nabis</i> sp.	1 (0,2)	2 (0,4)	0 (0,0)	3 (0,2)	0,44 ns
Hemiptera	Lygaeidae	<i>Geocoris</i> sp.	12 (2,5)	17 (3,4)	7 (1,8)	36 (2,6)	0,15 ns
Hemiptera	Reduviidae	<i>Zelus</i> sp.	0 (0,0)	5 (1,0)	4 (1,0)	9 (0,7)	0,31 ns
Total			33 (7,0)	45 (9,0)	26 (6,6)	104 (7,6)	0,52 ns
Joaninhas Predadora							
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Cycloneda sanguinea</i>	8 (1,7)	8 (1,6)	7 (1,8)	23 (1,7)	0,99 ns
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Scymnus</i> sp.	9 (1,9)	13 (2,6)	10 (2,5)	32 (2,3)	0,90 ns
Total			17 (3,6)	21 (4,2)	17 (4,3)	55 (4,0)	0,92 ns
Aranhas Predadoras							
Aranae	Aracnidae	<i>Chiracantium</i> sp.	60 (12,6)	84 (16,8)	45 (11,4)	189 (13,8)	0,13 ns
Aranae	Aracnidae	<i>Oxyopes</i> sp.	33 (7,0)	35 (7,0)	19 (4,8)	87 (6,4)	0,41 ns
Aranae	Aracnidae	<i>Phidippus</i> sp.	12ab (2,5)	19a (3,8)	8b (2,0)	39 (2,8)	0,03 *
Total			105 (21,9)	138 (27,5)	72 (18,2)	315 (22,9)	0,13 ns
Outros Predadores							
Neuroptera	Chrysopidae	<i>Ceraeochrysa</i> sp.	192 (40,5)	173 (34,5)	175 (44,3)	540 (39,4)	0,94 ns
Dermaptera	Forficulidae	<i>Dorus luteipes</i>	86 (18,1)	81 (16,2)	62 (15,7)	229 (16,7)	0,41 ns
Coleoptera	Carabidae	sp. 1	4 (0,8)	4 (0,8)	1 (0,3)	9 (0,7)	0,57 ns
Hymenoptera	Formicidae	<i>Pheidole</i> sp.	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,1)	0,44 ns

(1) - Para as joaninhas predadoras e para o crisopídeo *Ceraeochrysa* sp. todos os estádios de desenvolvimento foram quantificados (ovo, larva e adulto); para os demais artrópodes foram consideradas somente as ninfas ou larvas e os adultos.

(2) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

Os predadores encontrados foram os percevejos *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Nabis* sp. (Hemiptera: Nabidae), *Geocoris* sp. (Hemiptera: Lygaeidae) e *Zelus* sp. (Hemiptera: Reduviidae); as joaninhas *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) e *Scymnus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae); as aranhas *Chiracantium* sp. (Aranae: Aracnidae), *Oxyopes* sp. (Aranae: Aracnidae) e *Phidippus* sp. (Aranae: Aracnidae); o crisopídeo *Ceraeochrysa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae); a tesourinha

Dorus luteipes (Dermaptera: Forficulidae); a formiga *Pheidole* sp. (Hymenoptera: Formicidae); e o carabídeo não identificado denominado como Carabidae sp.1 (Coleoptera: Carabidae). O crisopídeo *Ceraeochrysa* sp. foi a espécie mais abundante, com 39,4% do total encontrados; seguido por *Dorus luteipes*, com 16,7%; e pela aranha *Chiracantium* sp., com 13,8%. Dentre os predadores, ocorreu diferença significativa entre os tratamentos somente para o número de aranhas *Phidippus* sp. O algodão convencional com inseticidas apresentou menor número desta aranha que o algodão convencional sem inseticida. Este resultado poderia ser explicado pela aplicação de inseticidas não seletivos, no entanto, as populações dos tratamentos não diferiram ao longo das datas de avaliação (Tabela 27), indicando que o efeito não foi importante. Além disso, as maiores densidades populacionais e diferenças numéricas ocorreram na segunda avaliação, quando ainda não haviam sido aplicados os inseticidas no devido tratamento.

Tabela 27: Números médios de aranhas *Phidippus* sp. (ninfas e adultos) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	<i>Phidippus</i> sp.			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão Convencional sem Inseticidas	Algodão Convencional com Inseticidas	
27/03/2007	0,0	0,7	0,0	0,111 ns
03/04/2007	1,3	2,3	0,3	0,104 ns
10/04/2007	0,7	1,0	0,7	0,694 ns
24/04/2007	0,3	0,0	0,0	0,444 ns
08/05/2007	1,3	1,3	1,0	0,694 ns
23/05/2007	0,0	0,7	0,7	0,309 ns
06/06/2007	0,0	0,0	0,0	-
20/06/2007	0,3	0,0	0,0	0,444 ns
26/06/2007	0,0	0,3	0,0	0,444 ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

As outras pragas, pulgão (*Aphis* sp., Hemiptera: Aphidae), tripes (*Thrips tabaci*, Thysanoptera: Thripidae), mosca branca (*Bemisia* sp., Hemiptera: Aleyrodidae) e larva minadora (*Liriomyza huidenbrenses*, Diptera: Agromyzidae), foram quantificadas quanto a presença ou ausência nas plantas, determinando-se a porcentagem de plantas infestadas, e os resultados estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Porcentagem de plantas com presença de pulgão (*Aphis* sp.), tripses (*Thrips tabaci*), mosca branca (*Bemisia* sp.) e larva minadora (*Liriomyza huidobrensis*), em função dos tratamentos. Indianópolis- MG, Safra 2007.

Ordem	Família	Gênero; Espécie	Cultivar OGM	Cultivar convencional sem Inseticida	Cultivar Convencional com Inseticida	MÉDIA	P ⁽¹⁾
Hemiptera	Aphidae	<i>Aphis</i> sp.	27,4	24,3	25,2	25,6	0,65 ns
Thysanoptera	Thripidae	<i>Thrips tabaci</i>	35,4	30,4	35,6	33,8	0,21 ns
Hemiptera	Aleyrodidae	<i>Bemisia</i> sp.	1,5	0,9	0,6	1,0	0,15 ns
Diptera	Agromyzidae	<i>Liriomyza huidobrensis</i>	7,4	8,2	7,6	7,7	0,92 ns

(1) - Valor da probabilidade (*P*) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Esses dados permitem concluir que nas condições do experimento na Unidade Operativa de Indianópolis não foi constatada diferenças entre os percevejos predadores, joaninhas predadoras, aranhas predadoras e outros predadores estudados de outras ordens de insetos não-alvo entre a cultivar GM, MBX-13 e seu parental convencional sem tratamento inseticida (Tabelas 26, 27 e 28).

Uma outra forma de ver o efeito dos tratamentos sobre os artrópodes não-alvo é através da densidade populacional nas diferentes avaliações ao longo do estudo. Na Tabela 29 estão apresentadas as densidades populacionais do total de aranhas predadoras obtidas nas diferentes avaliações. O número total de aranhas diferiu entre tratamentos na segunda avaliação, com o algodão convencional sem inseticidas apresentando maior número de indivíduos que o algodão convencional com inseticidas. No entanto, destaca-se que a aplicação dos inseticidas para controle de lagartas foi realizada posteriormente a esta avaliação. Assim, a diferença nesse ponto específico pode ser atribuída ao acaso, pois até então os tratamentos estiveram nas mesmas condições com relação à aplicação do inseticida.

Tabela 29: Números médios de aranhas predadoras (*Chiracantium* sp., *Oxyopes* sp. e *Phidippus* sp.) (ninfas e adultos) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	Aranhas predadoras			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão	Algodão	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas	
27/03/2007	1,0	2,7	0,3	0,381 ns
03/04/2007	6,3ab	11,0a	2,7b	0,029 *
10/04/2007	5,3	7,7	5,7	0,634 ns
24/04/2007	4,7	4,7	1,7	0,363 ns
08/05/2007	6,7	8,0	6,3	0,875 ns
23/05/2007	0,7	4,0	4,0	0,103 ns
06/06/2007	4,7	2,3	1,3	0,474 ns
20/06/2007	3,0	3,7	1,3	0,310 ns
26/06/2007	2,3	2,0	0,7	0,211 ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

As populações totais de percevejos predadores (Tabela 30) e de joaninhas predadoras (Tabela 31) não diferiram entre os tratamentos em todas as avaliações. Já para a tesourinha *Dorus luteipes* (Tabela 32) e para o crisopídeo *Ceraeochrysa* sp. (Tabela 33) ocorreu diferença em uma única avaliação de um total de 9 estudadas, mas quando as populações eram relativamente baixas e, portanto, de pouco significado.

Tabela 30: Números médios de percevejos predadores (*Orius* sp., *Nabis* sp., *Geocoris* sp. e *Zelus* sp.) (ninfas e adultos) encontrados em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	Percevejos Predadores			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão	Algodão	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas	
27/03/2007	0,0	0,0	0,3	0,444 ns
03/04/2007	0,3	0,3	1,0	0,858 ns
10/04/2007	0,7	1,0	0,3	0,340 ns
24/04/2007	5,7	6,0	2,7	0,420 ns
08/05/2007	0,7	2,3	1,0	0,138 ns
23/05/2007	1,7	3,3	2,3	0,684 ns
06/06/2007	1,7	1,0	1,0	0,262 ns
20/06/2007	0,0	1,0	0,0	0,140 ns
26/06/2007	0,3	0,0	0,0	0,444 ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 31: Números médios de joaninhas predadoras (*Cycloneda sanguinea* e *Scymnus* sp.) (ovos, larvas e adultos) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	Joaninhas Predadoras			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão	Algodão	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas	
27/03/2007	0,7	1,3	0,0	0,250 ns
03/04/2007	0,3	0,0	1,3	0,369 ns
10/04/2007	1,0	0,7	1,0	0,841 ns
24/04/2007	1,7	3,7	2,0	0,476 ns
08/05/2007	0,0	0,7	1,0	0,147 ns
23/05/2007	0,7	0,0	0,0	0,111 ns
06/06/2007	0,7	0,7	0,3	0,938 ns
20/06/2007	0,7	0,0	0,0	0,444 ns
26/06/2007	0,0	0,0	0,0	-

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 32: Números médios de tesourinhas (*Dorus luteipes*) (ninfas e adultos) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	<i>Dorus luteipes</i>			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão Convencional sem Inseticidas	Algodão Convencional com Inseticidas	
	27/03/2007	0,0	0,0	
03/04/2007	0,3	0,0	0,0	0,444 ns
10/04/2007	0,0	0,0	0,0	-
24/04/2007	0,0	0,7	1,0	0,525 ns
08/05/2007	1,7a	1,7a	0,0b	0,012 *
23/05/2007	11,0	11,3	13,0	0,731 ns
06/06/2007	11,0	8,3	5,3	0,152 ns
20/06/2007	2,0	2,0	0,3	0,605 ns
26/06/2007	2,7	3,0	1,0	0,516 ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

Tabela 33: Números médios de crisopídeos (*Ceraeochrysa* sp.) (ovos larvas e adultos) encontrados em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	<i>Ceraeochrysa</i> sp.			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão Convencional sem Inseticidas	Algodão Convencional com Inseticidas	
	27/03/2007	1,3	0,7	
03/04/2007	6,0	2,3	2,3	0,091 ns
10/04/2007	3,0	7,7	5,7	0,241 ns
24/04/2007	20,0	10,7	9,3	0,417 ns
08/05/2007	18,7	18,3	19,3	0,956 ns
23/05/2007	2,3	0,0	2,3	0,084 ns
06/06/2007	6,7	7,3	7,0	0,942 ns
20/06/2007	4,3	5,7	9,0	0,420 ns
26/06/2007	1,7b	5,0a	1,7b	0,026 *

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

Nesse ensaio para avaliação de artrópodes não-alvo foi também estudado a densidade populacional das principais pragas-alvo do algodão. A Tabela 34 mostra as densidades populacionais do total de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* e *Alabama argillacea*. A principal delas foi a *A. argillacea*, representando 92% do total encontrado. As densidades de lagartas no algodão evento 281-24-236/3006-210-23 foram menores que nos demais tratamentos, com diferença estatística na terceira e quinta avaliações, mostrando aqui também o benefício das proteínas Cry1F e Cry1Ac integradas nas plantas. Após a quarta avaliação, que coincide com o início da aplicação de inseticidas, ocorreu queda natural das populações de lagartas, conforme constatado no tratamento de algodão convencional sem inseticidas.

Tabela 34: Números médios de lagartas pragas (*Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* e *Alabama argillacea*) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Indianópolis - MG, safra 2007.

Avaliação	Total de <i>Spodoptera frugiperda</i> + <i>Heliothis virescens</i> + <i>Alabama argillacea</i>			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão Convencional sem Inseticidas	Algodão Convencional com Inseticidas	
27/03/2007	0,0	0,3	1,3	0,444 ns
03/04/2007	0,3	1,3	3,0	0,342 ns
10/04/2007	0,3b	12,0a	14,7a	0,016 *
24/04/2007	0,0	10,7	18,3	0,176 ns ⁽²⁾
08/05/2007	0,0b	3,0a	1,3ab	0,026 *
23/05/2007	0,0	0,7	0,3	0,660 ns
06/06/2007	0,0	1,0	0,0	0,444 ns
20/06/2007	0,0	0,3	0,0	0,444 ns
26/06/2007	0,0	0,0	0,0	-

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

(2) - A infestação de lagartas foi muito irregular nesta data de avaliação, concentrando-se apenas em uma parcela de cada tratamento com algodão convencional (coeficiente de variação = 142%).

Os artrópodes não alvo identificados e quantificados na área de Mogi Mirim-SP estão divididos em pragas e predadores. A praga bicudo (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) foi quantificada pelo número de indivíduos encontrados nas plantas de algodão, assim como os predadores, e os resultados para o total das avaliações estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35: Número de insetos pragas e inimigos naturais não alvo do algodão Bt encontrados em sessenta plantas, em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, Safra 2007.

Ordem	Família	Gênero; Espécie ⁽¹⁾	Cultivar OGM	Cultivar convencional sem Inseticida	Cultivar Convencional com Inseticida	TOTAL	P ⁽²⁾
			Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Pragas Não Alvo							
Coleoptera	Curculionidae	<i>Anthonomus grandis</i>	103 (18,5)	143 (19,4)	159 (24,2)	405 (20,8)	0,27 ns
Percevejo Predadores							
Hemiptera	Anthocoridae	<i>Orius</i> sp.	10 (1,8)	20 (2,7)	13 (2,0)	43 (2,2)	0,20 ns
Hemiptera	Nabidae	<i>Nabis</i> sp.	0 (0,0)	3 (0,4)	1 (0,2)	4 (0,2)	0,27 ns
Hemiptera	Lygaeidae	<i>Geocoris</i> sp.	8 (1,4)	8 (1,1)	7 (1,1)	23 (1,2)	0,95 ns
Total			18b (3,2)	31a (4,2)	21b (3,2)	70 (3,6)	0,01 **
Joaninhas Predadora							
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Cycloneda sanguinea</i>	83 (14,9)	154 (20,9)	143 (21,8)	380 (19,5)	0,34 ns
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Scymnus</i> sp. <i>Hyppodamia</i>	72 (12,9)	100 (13,5)	40 (6,1)	212 (10,9)	0,10 ns
Coleoptera	Coccinellidae	<i>convergens</i>	10 (1,8)	31 (4,2)	11 (1,7)	52 (2,7)	0,20 ns
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Stetorus</i> sp.	6 (1,1)	1 (0,1)	0 (0,0)	7 (0,4)	0,20 ns
Total			171 (30,8)	286 (38,7)	194 (29,6)	651 (33,4)	0,29 ns
Aranhas Predadoras							
Aranae	Aracnidae	<i>Chiracantium</i> sp.	90 (16,2)	71 (9,6)	74 (11,3)	235 (12,1)	0,46 ns
Aranae	Aracnidae	<i>Oxyopes</i> sp.	20 (3,6)	21 (2,8)	14 (2,1)	55 (2,8)	0,32 ns
Aranae	Aracnidae	<i>Phidippus</i> sp.	4 (0,7)	9 (1,2)	4 (0,6)	17 (0,9)	0,19 ns
Aranae	Aracnidae	<i>Misumenopsis</i> sp.	8 (1,4)	4 (0,5)	5 (0,8)	17 (0,9)	0,75 ns
Aranae	Aracnidae	<i>Latrodectus</i> sp.	4 (0,7)	1 (0,1)	5 (0,8)	10 (0,5)	0,47 ns
Total			126 (22,7)	106 (14,4)	102 (15,6)	334 (17,1)	0,14 ns
Outros Predadores							
Neuroptera	Chrysopidae	<i>Ceraeochrysa</i> sp.	92 (16,5)	131 (17,8)	145 (22,1)	368 (18,9)	0,05 ns
Dermaptera	Forficulidae	<i>Dorus luteipes</i>	2 (0,4)	2 (0,3)	2 (0,3)	6 (0,3)	0,44 ns
Diptera	Syrphidae	<i>Toxomerus dispar</i>	43 (7,7)	38 (5,2)	33 (5,0)	114 (5,8)	0,93 ns
Coleoptera	Carabidae	sp. 1	1 (0,2)	1 (0,1)	0 (0,0)	2 (0,1)	0,69 ns

(1) - Para as joaninhas predadoras e para o crisopídeo *Ceraeochrysa* sp. todos os estádios de desenvolvimento foram quantificados (ovo, larva e adulto); para os demais artrópodes foram consideradas somente as ninfas ou larvas e os adultos.

(2) - Valor da probabilidade (*P*) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade; ** = significativo a 1% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

Os predadores encontrados foram os percevejos *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Nabis* sp. (Hemiptera: Nabidae) e *Geocoris* sp. (Hemiptera: Lygaeidae); as joaninhas *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae), *Scymnus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) e *Stetorus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae); as aranhas *Chiracantium* sp. (Aranae: Aracnidae), *Oxyopes* sp. (Aranae: Aracnidae), *Phidippus* sp. (Aranae: Aracnidae), *Misumenopsis* sp. (Aranae: Aracnidae) e *Latrodectus* sp. (Aranae: Aracnidae); o crisopídeo *Ceraeochrysa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae); a tesourinha *Dorus luteipes* (Dermaptera: Forficulidae); o sirfídeo *Toxomerus dispar* (Diptera: Syrphidae); e o carabídeo não identificado denominado como Carabidae sp.1 (Coleoptera: Carabidae). Considerando-se somente os predadores, a joaninha *Cycloneda sanguinea* foi a espécie mais abundante, com 19,5% do total encontrado; seguida pelo crisopídeo *Ceraeochrysa* sp., com 18,9%; pela aranha *Chiracantium* sp., com 11,3%; e pela joaninha *Scymnus* sp., com 10,9%. Ocorreu diferença significativa entre os tratamentos somente para o número total de percevejos predadores. O algodão convencional sem inseticidas apresentou maior número de percevejos que os demais tratamentos.

As outras pragas, pulgão (*Aphis* sp., Hemiptera: Aphidae), tripses (*Thrips tabaci*, Thysanoptera: Thripidae), mosca branca (*Bemisia* sp., Hemiptera: Aleyrodidae) e larva minadora (*Liriomyza huidenbrenses*, Diptera: Agromyzidae), foram quantificadas quanto a presença ou ausência nas plantas, determinando-se a porcentagem de plantas infestadas, e os resultados estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 - Porcentagem de plantas com presença de pulgão (*Aphis* sp.), tripses (*Thrips tabaci*), mosca branca (*Bemisia* sp.) e larva minadora (*Liriomyza huidenbrenses*), em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, Safra 2007.

Ordem	Família	Gênero; Espécie	Cultivar OGM	Cultivar convencional sem Inseticida	Cultivar Convencional com Inseticida	MÉDIA	P ⁽¹⁾
Hemiptera	Aphidae	<i>Aphis</i> sp.	62,1	68,3	64,0	64,8	0,14 ns
Thysanoptera	Thripidae	<i>Thrips tabaci</i>	5,0	5,8	4,6	5,1	0,86 ns
Hemiptera	Aleyrodidae	<i>Bemisia</i> sp.	9,0	8,5	7,9	8,5	0,24 ns
Diptera	Agromyzidae	<i>Liriomyza huidobrensis</i>	13,1	12,5	11,7	12,5	0,71 ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Esses dados da unidade de Mogi Mirim-SP, à semelhança do que ocorreu na unidade de Indianópolis-MG, permite concluir que não foi constatada diferenças entre as várias espécies de percevejos predadores, joaninhas predadoras, aranhas predadoras e outros predadores estudados de outras ordens de insetos não-alvo entre a cultivar GM, MBX-13 e seu parental convencional sem tratamento inseticida (Tabelas 35 e 36).

Como no caso de Indianópolis, em Mogi Mirim também se analisou a densidade populacional ao longo do experimento. Quando se considera os dados das diferentes datas de avaliação de percevejos predadores observa-se que não houve diferenças

significativas (Tabela 37). Esses números mostram que as diferenças significativas registradas para total de percevejos na tabela 35 são irrelevantes.

Tabela 37: Números médios de percevejos predadores (*Orius* sp., *Nabis* sp. e *Geocoris* sp.) (ninfas e adultos) encontrados em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, safra 2007.

Avaliação	Percevejos Predadores				$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão		Algodão	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas		
29/03/2007	0,7	2,7	1,7	0,336	ns
12/04/2007	3,7	4,3	3,7	0,607	ns
27/04/2007	0,7	1,7	1,3	0,629	ns
11/05/2007	0,3	1,0	0,3	0,647	ns
24/05/2007	0,7	0,3	0,0	0,444	ns
06/06/2007	0,0	0,3	0,0	0,444	ns
21/06/2007	0,0	0,0	0,0	-	
29/06/2007	0,0	0,0	0,0	-	

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Nas Tabelas 38 a 41 estão apresentadas as densidades populacionais das principais espécies ou grupos de artrópodes predadores encontradas nas avaliações, além dos percevejos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para as populações de joaninhas (Tabela 38), aranhas (Tabela 39), crisopídeos *Ceraeochrysa* sp. (Tabela 40) e sirfídeos *Toxomerus dispar* (Tabela 41).

Tabela 38: Números médios de joaninhas predadoras (*Cycloneda sanguinea*, *Scymnus* sp., *Hyppodamia convergens* e *Stetorus* sp.) (ovos, larvas e adultos) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, safra 2007.

Avaliação	Joaninhas Predadoras			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão	Algodão	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas	
29/03/2007	25,7	54,3	24,3	0,414 ns
12/04/2007	12,3	19,0	18,7	0,598 ns
27/04/2007	7,3	13,0	14,3	0,420 ns
11/05/2007	4,0	2,7	2,7	0,500 ns
24/05/2007	0,0	0,3	1,0	0,173 ns
06/06/2007	2,0	1,3	1,7	0,925 ns
21/06/2007	3,3	3,3	0,7	0,267 ns
29/06/2007	2,3	1,0	1,3	0,582 ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 39: Números médios de aranhas predadoras (*Chiracantium* sp., *Oxyopes* sp., *Phidippus* sp., *Misumenopsis* sp. e *Latrodectus* sp.) (ninfas e adultos) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, safra 2007.

Avaliação	Aranhas Predadoras			$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão	Algodão	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas	
29/03/2007	3,7	6,3	4,3	0,674 ns
12/04/2007	4,7	5,7	4,3	0,669 ns
27/04/2007	9,3	4,7	6,7	0,449 ns
11/05/2007	9,3	8,7	3,7	0,128 ns
24/05/2007	3,3	3,0	4,7	0,672 ns
06/06/2007	11,3	7,0	10,3	0,317 ns
21/06/2007	0,3	0,0	0,0	0,444 ns
29/06/2007	0,0	0,0	0,0	-

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 40: Números médios de crisopídeos (*Ceraeochrysa* sp.) (ovos, larvas e adultos) encontrados em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, safra 2007.

Avaliação	<i>Ceraeochrysa</i> sp.				$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão		Algodão Convencional com Inseticidas	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas		
29/03/2007	1,3	0,0	5,0	0,273	ns
12/04/2007	4,7	10,7	8,3	0,205	ns
27/04/2007	5,0	9,7	11,0	0,330	ns
11/05/2007	8,0	9,7	10,7	0,526	ns
24/05/2007	6,3	9,0	6,7	0,799	ns
06/06/2007	5,3	4,0	5,3	0,825	ns
21/06/2007	0,0	0,7	1,0	0,282	ns
29/06/2007	0,0	0,0	0,3	0,444	ns

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 41 - Números médios de sirfídeos (*Toxomerus dispar*) (larvas e adultos) encontrados em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, safra 2007.

Avaliação	<i>Toxomerus dispar</i>				$P^{(1)}$
	Algodão Bt	Algodão		Algodão Convencional com Inseticidas	
		Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas		
29/03/2007	2,7	1,3	1,0	0,560	ns
12/04/2007	8,7	9,7	7,3	0,882	ns
27/04/2007	1,3	0,7	2,0	0,542	ns
11/05/2007	0,0	0,0	0,3	0,444	ns
24/05/2007	1,7	1,0	0,3	0,686	ns
06/06/2007	0,0	0,0	0,0	-	
21/06/2007	0,0	0,0	0,0	-	
29/06/2007	0,0	0,0	0,0	-	

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade.

A flutuação populacional do total de lagartas alvos *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* e *Alabama argillacea* encontradas encontrada no ensaio de Mogi Mirim é mostrada na tabela 42 . Como em Indianópolis a principal lagarta foi *A. argillacea*, representando 65% do total encontrado. A cultivar Bt com as proteínas

Cry1F e Cry1Ac integradas, confirma os resultados de Indianópolis, mostrando a sua eficácia no controle das lagartas alvo do algodoeiro.

Tabela 42: Números médios de lagartas pragas (*Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* e *Alabama argillacea*) encontradas em vinte plantas nas avaliações em função dos tratamentos. Mogi Mirim - SP, safra 2007.

Avaliação	Total de <i>Spodoptera frugiperda</i> + <i>Heliothis virescens</i> + <i>Alabama argillacea</i>			P ⁽¹⁾
	Algodão		Algodão	
	Algodão Bt	Convencional sem Inseticidas	Convencional com Inseticidas	
29/03/2007	0,00	0,00	0,33	0,444 ns
12/04/2007	0,00	0,00	0,67	0,111 ns
27/04/2007	0,00	1,00	4,00	0,224 ns
11/05/2007	0,00	7,33	2,33	0,083 ns
24/05/2007	0,00b	20,00a	2,00b	0,009 **
06/06/2007	0,00b	7,67a	0,33b	0,004 **
21/06/2007	0,00	0,67	0,00	0,111 ns
29/06/2007	0,00	0,00	0,00	-

(1) - Valor da probabilidade (P) de F obtido na análise de variância. ns = não significativo a 5% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Médias seguidas me mesma letra não diferiram entre si por Tukey a 5%.

Os principais artrópodes predadores, encontrados nas avaliações nas duas localidades estudadas, foram os percevejos (*Orius* sp., *Nabis* sp., *Geocoris* sp. e *Zelus* sp.), as joaninhas (*Cycloneda sanguinea*, *Scymnus* sp., *Hyppodamia convergens* e *Stetorus* sp.), as aranhas (*Chiracantium* sp., *Oxyopes* sp., *Phidippus* sp., *Misumenopsis* sp. e *Latrodectus* sp.), o crisopídeo *Ceraeochrysa* sp., a tesourinha *Dorus luteipes* e o sirfídeo *Toxomerus dispar*. Tanto as análises individuais da quantidade dos predadores encontrados, como o estudo da flutuação populacional dentro de cada grupo mostraram que não houve diferenças significativas entre a abundância de artrópodes em plantas do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 e a cultivar convencional sem tratamento com inseticida. Os resultados obtidos são coerentes com os encontrados na literatura. Trabalhos similares por Naranjo (2005 a,b) e Whitehouse *et al.* (2005) mostraram que o algodão Bt causa pouco ou nenhum efeito sobre os artrópodes não alvo avaliando os mesmos tratamentos. Verificaram que a influência do algodão Bt na abundância de artrópodes não-alvo foi pequena em comparação ao algodão convencional sem inseticidas.

No presente estudo, o tratamento com inseticidas não prejudicou significativamente a ocorrência de predadores. Muitos fatores podem estar relacionados a este resultado, dentre eles a frequência e o tipo de inseticidas aplicados. Cabe destacar que a maioria dos predadores teve sua população naturalmente reduzida logo após o início do período de aplicação de inseticidas, mesmo nos tratamentos que não receberam inseticidas. Portanto, estes predadores estiveram menos expostos à ação dos inseticidas.

Nos trabalhos de Naranjo (2005 a,b) e Whitehouse *et al.* (2005) foi constatado que a aplicação de inseticidas para o controle de lagartas pode causar grande impacto sobre a abundância do artrópodes não alvo, seja em relação ao algodão Bt ou algodão convencional sem inseticidas. Head *et al.* (2005) e Torres & Ruberson (2005) tiveram as mesmas conclusões em estudos similares nos quais compararam somente algodão Bt com algodão convencional recebendo aplicação de inseticidas para o controle de lagartas. Nestes trabalhos, de modo geral, os autores constataram que o algodão Bt não causou impacto negativo às populações de inimigos naturais, podendo inclusive favorecer o controle biológico. Head *et al.* (2005) destacaram também que o impacto dos inseticidas foi maior nos locais onde o uso deles foi mais freqüente.

Nas condições em que foi conduzido o estudo para avaliar o efeito do algodão geneticamente modificado MXB-13, que expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac, sobre a comunidade de organismos não-alvo que habitam as plantas do algodoeiro e a coerência dos resultados de Indianópolis e Mogi Mirim permite concluir que o algodão geneticamente modificado evento 281-24-236/3006-210-23 não causa impacto significativo nas populações de artrópodes chaves não-alvo.

- **Destino das proteínas Cry1F e Cry1Ac incorporadas ao solo**

As condições favoráveis à degradação das proteínas Cry1F e Cry1Ac no solo foram reportadas em estudos onde as proteínas Cry1F e Cry1Ac derivadas de plantas ou derivadas por via microbiana foram misturadas no solo, incubadas sob condições padrão de laboratório e amostradas para bio-ensaios em vários intervalos de tempo (Herman *et al.*, 1999; Herman & Collins, 2001). Bioensaios com insetos foram conduzidos para medir a degradação da proteína, como perda da atividade biológica pela aplicação de mistura aquosa de agar e amostras de solo colocadas sobre as dietas artificiais, deixando as lagartas neonatas de *Heliothis virescens* se alimentarem desse meio. Baseado nos resultados do bio-ensaio (GI₅₀) em solo contendo a proteína Cry1F, derivada por via microbiana, a meia-vida foi estimada em 1,3 dias sob condições de laboratório, indicando uma rápida taxa de decomposição no solo. Essa rápida decomposição foi confirmada em tecido liofilizado de plantas de algodão contendo a proteína Cry1F em combinação com a proteína Cry1Ac, onde a meia vida da bio-atividade foi inferior a (1) um dia. Bio-ensaios com a proteína Cry1F truncada também mostraram uma meia vida no solo de menos de 1(um) dia (Herman *et al.*, 2002).

Um solo representativo do agro-ecossistema do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 foi examinado em um estudo de laboratório. A decomposição da proteína foi muito rápida e foi consistente com o que foi visto para outras proteínas Bt em solos variados (Herman *et al.* 2001; 2002; Herman & Scherer 2002). O estudo submetido demonstrou a habilidade dos micróbios do solo em rapidamente efetuar a degradação das proteínas Bt. Adicionalmente, estudos de campo abrangendo vários locais e vários tipos de solos foram planejados para avaliar a acumulação potencial das proteínas Cry1F e Cry1Ac expressas no algodão evento 281-24-236/3006-210-23. Um relato publicado em um desses estudos de múltiplas localidades mostrou que não houve acumulação (Head *et al.*, 2002.) e serviu de modelo para o estudo conduzido no algodão 281-24-236/3006-210-23.

Bio-ensaios foram também conduzidos, em condições de laboratório, para medir a degradação da proteína Cry1Ac, através da perda da atividade biológica, usando-se uma mistura aquosa de agar e amostras de solos colocadas sobre a dieta artificial e permitindo lagartas neonatas de *Heliothis virescens* se alimentarem dos tratamentos em estudo. A proteína microbiana Cry1Ac não se decompôs quando aplicada em um solo estéril, portanto sem atividade microbiana (Herman *et al.*, 2001), mas ocorreu rápida decomposição quando o tecido de folha de algodão liofilizado do algodão MXB-13, contendo as proteínas Cry1F e Cry1Ac foi aplicado a um solo com atividade microbiana (Herman & Collins, 2001). Esses resultados são consistentes com a degradação da proteína Cry1Ac em solo mediada por microorganismos. Baseada nos resultados do bio-ensaio (GI₅₀), em solo acrescido de tecido de algodão liofilizado, a meia-vida das proteínas inseticidas cristalizadas Cry1F/Cry1Ac foi de 1,3 dias sob condições de laboratório, indicando uma rápida taxa de decomposição no solo.

O GI₅₀ para a proteína cristalizada Cry1Ac derivada por via microbiana foi previamente determinado como sendo 0,028 ng ai/cm² (Herman & Collins, 2002); portanto, a mais alta concentração de pó de planta usado neste estudo (167 ug/cm²), conteve acima de 17 vezes a quantidade de Cry1Ac necessária para inibir 50% do crescimento de um organismo altamente sensível.

Estudos prévios mostraram que a proteína Cry1Ac expressa por via microbiana exibiu meia-vida no solo de 9 a 20 dias comparada com a meia vida de 41 dias do tecido de algodão B.t. expressando a proteína Cry1Ac (citado em Head *et al.*, 2001).

10. Manejo de Resistência de Insetos (MRI)

A Dow AgroSciences fez um estudo das pragas alvo do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 nos EUA e considerou os riscos de adaptação desses insetos pragas a este algodão *Bt*. O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 tem apresentado naquele país controle efetivo contra oito insetos pragas avaliados: lagartas da maçã (Lagarta da Maçã, *Heliothis virescens*), *Heliothis virescens*(F.) e Lagarta da Maçã, *Helicoverpa zea*(Boddie)); Lagarta Rosada, *Pectinophora gossypiella* (Saunders); Lagarta Militar da Beterraba, *Spodoptera exigua* (Hubner); Lagarta Militar do Sul, *Spodoptera eridania* (Stoll); Lagarta do Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith); Curuquerê da Soja, *Pseudoplusia includens* (Walker); e Curuquerê da Couve, *Trichoplusia ni* (Hubner).

A Dow AgroSciences elaborou um plano de manejo da resistência do produto, acordado pelo EPA, com o objetivo de promover a durabilidade da resistência às três pragas principais de lepidópteros, causadoras dos maiores prejuízos econômicos e ambientais nos EUA: Lagarta da Maçã, *Heliothis virescens*, Lagarta da Maçã, *Helicoverpa zea*, e Lagarta Rosada, *Pectinophora gossypiella*, as quais também são relevantes no Brasil. Um plano que focalize Lagarta da Maçã, *Heliothis virescens*, Lagarta da Maçã, *Helicoverpa zea*, e Lagarta Rosada, *Pectinophora gossypiella* deve também ser adequado para manter a susceptibilidade nas pragas secundárias.

Dados de eficácia de cinco testes, por um período de dois anos, realizados pela Dow AgroScience nos EUA indicaram que a MXB-13 fornece um alto nível de controle da Lagarta da Maçã, *Heliothis virescens*. A eficácia contra *Heliothis virescens* foi demonstrada tanto no desenvolvimento precoce do fruto como no estágio de maturação

do capulho, no final da safra. Também foi mostrado que a MXB-13 controla eficazmente a Lagarta da Maçã, *Helicoverpa zea*. O nível de controle é pelo menos igual e em muitos casos superior a ótimos programas de aplicação de inseticidas usados em condições ambientais ideais. Os resultados também indicaram que a MXB-13 ultrapassou em qualidade a eficácia dos programas de pulverização em condições ambientais não ideais, tais como períodos contínuos de chuva.

A MXB-13 proporcionou um excelente controle da Lagarta Rosada, *Pectinophora gossypiella*, com nenhuma infestação mensurável, comparada com 23-75% da linhagem controle não transgênica. Tanto em testes de campo como em bio-ensaios, a MXB-13 foi efetiva no controle de várias espécies de lagartas militares, incluindo Lagarta Militar da Beterraba, Lagarta Militar do Sul, e Lagarta do Cartucho do Milho. Além disso, dados de testes de campo indicaram que a MXB-13 controla duas espécies de curuquerês: Curuquerê da Soja e Curuquerê da Couve.

Para elaborar um programa de MRI para *Heliothis virescens*, *Pectinophora gossypiellae* e para a *Helicoverpa zea*, a Dow AgroSciences considerou o modo de ação das proteínas inseticidas Cry1F e Cry1Ac, a magnitude das doses dessas proteínas, a dominância funcional, o potencial para resistência cruzada e estratégias de refúgios. Considerou ainda fatores biológicos como movimento das larvas, movimento de adultos, hospedeiros alternativos, dinâmica da população, fatores genéticos como dominância, frequência inicial de genes para resistência, resistência cruzada entre proteínas inseticidas de Bt, resistência cruzada com outros mecanismos de controle, e finalmente modelos de manejo de resistência para as tres espécies.

Desses estudos a Dow AgroSciences nos EUA tem sugerido a seguinte estratégia de refugio:

A. Para a praga Lagarta Rosada, *Pectinophora gossypiella*:

1. Refúgio externo. Nesse caso é recomendado 5% da cultivar convencional com um mínimo de 2 ha, e 95% da cultivar de algodão evento 281-24-236/3006-210-23. É recomendado plantar o refúgio adjacente ao campo do evento 281-24-236/3006-210-23 ou numa distância inferior a 400m. Sugere também uma largura de pelo menos 45m ao refúgio dando preferência para 90m. A cultivar convencional deve ter maturação semelhante à da cultivar de algodão do evento 281-24-236/3006-210-23 e ter a mesma tecnologia de produção.
2. Refúgio externo com inseticida. Nesse caso é recomendado o uso de cerca de 8 ha de refúgio com cultivar convencional e 32 ha de evento 281-24-236/3006-210-23 ou seja 80% de OGM. Preferencialmente o refúgio deverá estar pelo menos há 800 m de distância do OGM e de ser tratado com inseticidas, ferormônios ou insetos estéreis para controle das pragas alvo. Como no caso anterior, a cultivar convencional deve ter maturação semelhante à da cultivar de algodão do evento 281-24-236/3006-210-23 e ter a mesma tecnologia de produção.
3. Refúgio alternado. Recomenda-se alternância de faixas de 2 ha da cultivar convencional com 40 ha do evento 281-24-236/3006-210-23. Em campos menores recomenda-se o uso de faixas de pelo menos 45m de largura da cultivar convencional. A área de refúgio pode ser tratada com inseticidas, ferormônios ou insetos estéreis para controle das pragas alvo. A cultivar convencional deve ter maturação semelhante à da cultivar de algodão do evento 281-24-236/3006-210-23 e ter a mesma tecnologia de produção.

B. Refúgio para as pragas: Lagarta da Maçã, *Heliothis virescens* e Lagarta da Maçã, *Helicoverpa zea*. Apenas refúgio natural.

11. Benefícios do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 no Brasil

- **Dois genes para controle das pragas alvo: *cry1F* e *cry1Ac***

Consequentemente os tecidos das plantas do evento 281-24-236/3006-210-23, expressam as duas proteínas inseticidas, Cry1F e Cry1Ac, que efetivamente controlam *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides* e *Alabama argillacea*, com controle adicional de outras pragas esporádicas de lepidópteros. Assim atuando, espera-se que essa tecnologia seja mais duradoura para oferecer vantagens ao produtor de algodão no Brasil.

- **Controle de lagartas mais eficiente**

Os inseticidas indicados para o controle de lagartas no algodoeiro normalmente apresentam uma boa eficiência, porém, dificilmente alcançam o nível de 100% de controle, pois sua eficiência é influenciada por fatores não relacionados com o produto, tais como chuvas, temperaturas altas ou baixas demais para a boa performance do produto, aplicação inadequada através do uso de água de qualidade inadequada, vazão, má calibração do equipamento, momento de aplicação com lagarta fora do estágio de ação do inseticida, etc. Um outro fator importante que prejudica o controle com inseticidas é a dificuldade de se atingir determinadas pragas pelo seu hábito de ataque. Por exemplo, a *Spodoptera* faz sua postura nas partes inferiores da planta, o que torna extremamente difícil realizarmos uma pulverização eficiente que atinja estas lagartas.

A utilização do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 supera essas dificuldades de manejo das pragas. Pois controla efetivamente a maioria das lagartas do algodoeiro no Brasil, expressando o inseticida durante todo o ciclo da lavoura e em todas as partes da planta, independentemente das condições climáticas, do estado nutricional da planta ou da qualidade operacional do agricultor. Esses pontos dão uma segurança muito grande para o cotonicultor em relação ao controle dessas pragas.

- **Redução no custo de produção**

O uso do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 vai possibilitar uma redução significativa no número de aplicações de inseticidas para controle de lagartas. Esta redução vai variar de região para região. Por exemplo, nos Estados do Paraná, São Paulo, parte do Mato Grosso do Sul, parte de Goiás e Minas Gerais, a intensidade de ataque da *Pectinophora gossypiella* é muito maior do que no restante do Brasil.

De acordo com planilhas de custos da Ide Consultoria, provavelmente a redução nos custos de controle de pragas com a utilização do algodão evento 281-24-236/3006-210-23, vai variar de US\$ 35,00 a US\$ 70,00/ hectare, considerando-se a redução de produto e aplicação. Caso 50% da área do Brasil, aproximadamente 500 mil hectares, fosse cultivada com o algodão evento 281-24-236/3006-210-23, ter-se-ia uma economia

de aproximadamente US\$ 35 milhões na aplicação de inseticidas, considerando-se uma economia média de US\$ 70,00/ hectare. Na China, as aplicações para *Helicoverpa armigera* diminuíram de 20 para 6 vezes com a introdução do algodão Bt (Huang *et al.* 2002), com uma redução de 28% no custo de controle de pragas.

Na Índia a redução foi de 60% no custo das aplicações de inseticidas, com a introdução do algodão Bt (Neilson – ORG MARG, 2004, Barwale *et al.* 2004). Segundo o Journal for Occupational & Environmental Health (2004), em pesquisa com 400 produtores das províncias de Hebei e Shandong, no norte do país, concluiu que a adoção do algodão Bt proporcionou uma redução de 57% no uso de pesticidas na cultura do algodão na China. Estudos também realizados pela FAO na China, na Argentina, no México, na África do Sul e na Índia, indicaram que o uso do algodão Bt reduziu o uso de produtos químicos em cerca de 50 a 70%, particularmente na China e na África do Sul.

- **Aumento do potencial de produtividade**

Atualmente, cerca de 30% da produção agrícola mundial é perdida por danos de pragas, doenças e ervas daninhas, demandando pesadas aplicações de defensivos. Na Índia, as perdas por *Helicoverpa armigera* atingem a cifra de US\$300 milhões. As perdas na cultura do algodão no Brasil também são elevadas, visto o grande número de pragas que atacam as lavouras de algodão no País. Além disso, a maior parte de nossas lavouras são de sequeiro, onde as condições climáticas muitas vezes, não permitem um controle adequado das pragas. É, portanto, esperado que com a utilização do algodão evento 281-24-236/3006-210-23, no controle da maioria das lagartas que causam importantes danos ao algodoeiro no Brasil, ter-se-á um aumento na produtividade devido a diminuição nos danos às estruturas reprodutivas (botões e maçãs) e também uma menor desfolha. Esta menor desfolha proporcionará à planta, melhores condições de elaborar fotoassimilados, que reverterão em maior produção. Portanto haverá um aumento do potencial da planta para maior produtividade.

- **Aumento da rentabilidade**

O aumento da produtividade aliada à diminuição de custo, proporcionará ao cotonicultor brasileiro, um ganho significativo na rentabilidade de sua lavoura de algodão. O aumento da rentabilidade na Índia, com a introdução do algodão Bt foi de 78% (Neilson – ORG MARG, 2004, Barwale *et al.* 2004). Segundo Jikun Huang, o uso do algodão Bt na China, proporcionou um ganho líquido de US\$170,00/hectare.

Pesquisadores chineses estimam que o ganho econômico neste setor chegou a US\$ 5 bilhões ao ano, sem os ganhos no setor agrícola, com os cultivos do algodão e arroz transgênico. Aumento de rentabilidade similar ocorrerá com a utilização do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 no Brasil, dando ao produtor brasileiro de algodão, maior competitividade no cenário internacional, aumentando o potencial para crescimento das exportações e diminuindo a necessidade de utilização de defensivos. Também ter-se-á maior sustentabilidade da cotonicultura brasileira, permitindo ao produtor e ao governo, traçar planos de longo prazo para a produção de algodão no Brasil.

- **Melhoria na qualidade da fibra**

O melhor controle das lagartas promoverá como consequência, além do aumento de produtividade, uma melhora na qualidade da fibra, pois, o número de maçãs com injúrias será reduzido, danos que prejudicam a qualidade da fibra ou dificultam a abertura completa das maçãs.

- **Maior segurança e redução de operações no campo**

O controle de lagartas do algodoeiro através do algodão evento 281-24-236/3006-210-23, além de possibilitar maior eficiência, proporcionará aos agricultores maior segurança, pois o mesmo pode despreocupar-se com estas pragas sem correr o risco de prejuízos. Além disso, o número de operações de pulverizações diminuirá muito, economizando-se combustível, facilitando o gerenciamento de máquinas e equipamentos. Poderá inclusive, ocorrer uma diminuição no parque de máquinas e equipamentos para pulverização, reduzindo o custo fixo para o produtor.

- **Simplificação da logística de insumos**

A diminuição na quantidade de aplicações para controle de lagartas trará uma diminuição na quantidade de inseticidas adquiridos pelo produtor. Isto facilitará a logística, principalmente pelos riscos atuais de armazenamento de produtos químicos na fazenda, seja pelos riscos ao ambiente, seja pelos riscos de assaltos.

- **Contribuição no controle biológico de pragas**

A menor quantidade de inseticidas aplicados no controle de lagartas do algodoeiro em função da utilização do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 e a especificidade do modo de ação da toxina produzida pelo evento 281-24-236/3006-210-23, vão incrementar o controle biológico, pois não teremos ação dessas toxinas (*cryIF* e *cryIAC*) agindo sobre os insetos não-alvos, como no caso do uso de inseticidas químicos. O aumento da quantidade de insetos benéficos na lavoura deverá ser mais um dos benefícios desta tecnologia. Este maior equilíbrio da população de inimigos naturais vai fomentar o controle biológico, contribuindo para se reduzir as possibilidades de aparecimento de outras pragas, como por exemplo, os ácaros.

- **Qualidade do meio ambiente**

A diminuição da quantidade de inseticidas aplicados na cultura e a rápida degradação das proteínas Bt no solo, serão também um efeito do evento 281-24-236/3006-210-23 no sentido de contribuir para amenizar ações que alteram a qualidade do meio ambiente do campo, pois, será reduzido o potencial de contaminação do solo e água por defensivos. Sabe-se que muitos pesticidas são persistentes no solo e podem atingir o lençol freático, causando sua contaminação. Também, através da erosão laminar, os inseticidas químicos podem atingir os mananciais d'água, poluindo-os.

Com um número menor de aplicações tem-se menor queima de combustíveis e conseqüentemente uma emissão menor de CO₂ na atmosfera e também uma menor quantidade de resíduos industriais, embalagens vazias, quando comparado com a quantidade de resíduos deixados em uma lavoura convencional.

- **Manutenção da biodiversidade**

Nessa linha, estudo realizado por G. Head; J.B. Surber; J.A.Watson; J.W. Martin & J.J.Duran,2001, mostrou que o cultivo contínuo de algodão Bt, e subsequente incorporação no solo dos resíduos vegetais, através da aração, a quantidade da proteína Cry1Ac acumulada é extremamente baixa e não resulta em atividade biológica detectável. As quantidades menores de defensivos aplicados nas lavouras de algodão evento 281-24-236/3006-210-23 pode ser mais uma tecnologia contribuindo para a conservação da biodiversidade dando maior sustentabilidade à atividade agrícola. Por outro lado o aumento do potencial de produtividade do algodão através da tecnologia do evento 281-24-236/3006-210-23 pode contribuir para amenizar a pressão para expansão de novas fronteiras agrícolas para atender a demanda mundial por fibras de algodão.

- **Redução do risco de intoxicações**

O cultivo do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 irá proporcionar a diminuição da quantidade de inseticidas aplicados à cultura e isto reduz a exposição dos trabalhadores, tanto os que efetivamente aplicam os produtos, quanto os outros trabalhadores que efetuam as demais operações, como capina, monitoramento de pragas e operações de máquinas em geral. Para os pequenos agricultores, onde a maioria das operações é manual ou com tração animal, os efeitos benéficos serão ainda maiores, pois o grau de exposição dos trabalhadores nesta modalidade de produção é muito maior.

- **Melhoria no manejo da resistência**

O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 possui dois genes diferentes que codificam as proteínas Cry1F e Cry1Ac, que se expressam com diferentes modos de ação. Isto reduz em muito a probabilidade de desenvolvimento de resistência das lagartas a estas toxinas. Portanto o manejo do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 para evitar o aparecimento da resistência das lagartas é mais recomendado, tornando a produção de algodão mais sustentável, além da facilidade de manejo no campo pelo agricultor.

- **Melhoria da qualidade de vida do agricultor**

O cultivo de algodão é uma atividade que demanda muita mão de obra e contínuo acompanhamento, do início ao fim do ciclo. Isto deve, principalmente, ao grande número de pragas que atacam o algodoeiro, exigindo controle rigoroso dos mesmos para que se tenha sucesso nesta atividade. O plantio do algodão evento 281-24-236/3006-210-23, com resistência à maioria das lagartas que atacam o algodoeiro no Brasil, vai dar ao

agricultor maior tranquilidade em relação ao controle de pragas. Como consequência o cotonicultor poderá se dedicar a outras atividades de sua empresa rural ou a outras atividades mais prazerosas.

- **Acessibilidade também a pequenos produtores**

Esta é uma tecnologia que atende também pequenos produtores, pois têm na atividade os mesmos problemas de lagartas e necessitam realizar o mesmo tipo de controle. O acesso à essa tecnologia tem a vantagem de ser feito através da aquisição de sementes, insumo obrigatório para a instalação da cultura. Portanto todo o segmento dos produtores poderá usufruir da vantagem econômica proporcionada por esta tecnologia. O pequeno produtor terá benefícios diretos ainda maiores, pois é ele que realiza, muitas vezes, o serviço de aplicar os inseticidas na lavoura, como já constatado em outros países que adotaram as linhagens Bt de algodão, como a Índia e China.

12. Conclusão

A Dow AgroSciences Industrial Ltda tem o firme propósito de contribuir para o desenvolvimento da cotonicultura nacional através da introdução da tecnologia do evento 281-24-236/3006-210-23 no país. Dos diversos estudos realizados no Brasil e em outros países, relativos à biossegurança do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23, pode-se destacar os seguintes pontos:

Características do produto:

- O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 protege as plantas contra um amplo espectro de insetos-praga, notadamente a Lagarta da Maçã, a Lagarta do Cartucho do Milho e o Curuquerê, importantes pragas da cultura no Brasil.
- A tecnologia evento 281-24-236/3006-210-23 é um exemplo da utilização de duas proteínas naturais contribuindo para uma agricultura mais sustentável.
- O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 foi aprovado para cultivo nos EUA em 2004. O México teve a aprovação para importação como alimento no mesmo ano. No Canadá a importação para alimento e alimentação animal foram aprovadas em 2005. O Japão teve a importação aprovada em 2006 para alimento, alimentação animal e para o meio ambiente. Para a Coreia e Austrália a importação aprovada para alimento ocorreu em 2005.

Condições para aprovação do produto:

- A Dow AgroSciences tem desenvolvido no Brasil, em suas unidades operativas com CQB nos Estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Paraná, pesquisas de eficácia no controle das principais pragas lepidópteras do algodoeiro, realizando estudos de características agrônômicas comparativas com o algodoeiro convencional, pesquisas de composição e de expressão das proteínas Cry1F e Cry1Ac, e estudos de impacto do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 em comunidades de artrópodes não-alvo e estudos de degradação das proteínas no solo. Essas pesquisas tem sido realizadas para demonstrar, como tem sido feito em outros países, que o algodão evento 281-24-236/3006-210-23 não causa dano à saúde humana e animal e não é potencialmente degradador do meio ambiente.

- A Dow Agrosiences tem o compromisso, através de seus programas internos de saúde, segurança e meio ambiente e de sua Comissão Interna de Biossegurança de fiscalizar seus produtos derivados de biotecnologia nas fases de pesquisa, desenvolvimento e também na fase comercial.
- As características do Algodão evento 281-24-236/3006-210-23, com relação à segurança e à saúde, têm sido exaustivamente testadas e cuidadosamente avaliadas por órgãos de vigilância pública nos países onde já foi aprovado ou ainda se encontra em avaliação. Este acompanhamento se dá desde a fase de pesquisa até a fase de comercialização do produto geneticamente modificado.

Segurança à saúde:

- As três proteínas encontradas no algodão evento 281-24-236/3006-210-23, Cry1F, Cry1Ac e PAT, estão presentes em bactérias de solo não patogênicas para o homem e animais.
- Proteínas Bt, como a Cry1F e Cry1Ac tem sido usadas há muitos anos como bioinseticidas em agricultura comercial.
- Estudos demonstraram que as proteínas Cry1F, Cry1Ac e PAT não tem potencial alergênico.
- A utilização da tecnologia do evento 281-24-236/3006-210-23 ajudará a reduzir a dependência de inseticidas químicos no controle de pragas do algodoeiro.
- O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 agregará ao sistema produtivo mais uma tecnologia para reduzir o risco de intoxicações.

Segurança alimentar

- Estudos de características agrônômicas de plantas de algodão evento 281-24-236/3006-210-23 demonstraram também no Brasil, que são similares às características observadas em plantas do algodão convencional indicando uma possível similaridade nutricional.
- As análises da composição e valor nutricional do algodão evento 281-24-236/3006-210-23 comparadas com as do algodão convencional confirmaram que os nutrientes não diferem nos dois tipos de algodão. Os resultados mostram que o algodão evento 281-24-236/3006-210-23 e o algodão convencional são equivalentes.
- A equivalência substancial foi demonstrada através de análises composicionais de minerais, de lipídeos, de proteínas, carboidratos, fibra bruta, fibra em detergente ácido (ADF) e fibra em detergente neutro (NDF), e em sementes de algodão evento 281-24-236/3006-210-23 comparadas com algodão convencional.
- Vários estudos tem demonstrado que as proteínas Cry1F, Cry1Ac e PAT presentes no algodão evento 281-24-236/3006-210-23 são seguras para o consumo humano e animal.

Segurança Ambiental

- Simplificação da logística de insumos com diminuição na quantidade de aplicações para controle de lagartas trará uma diminuição na quantidade de inseticidas reduzindo o risco de impacto ao meio ambiente.
- O aumento do potencial de produtividade do algodão através da tecnologia evento 281-24-236/3006-210-23 pode contribuir para amenizar a pressão para expansão de novas fronteiras agrícolas com a utilização de áreas frágeis ou áreas de florestas.
- O algodão evento 281-24-236/3006-210-23 não difere do algodão convencional para características botânicas e portanto não tem características de planta invasora.
- O algodão evento 281-24-236/3006-210-23, como outros produtos melhorados geneticamente, tem potencial para transferir seus genes para espécies selvagens ou aselvajadas do Brasil. Portanto deverá observar o zoneamento para manutenção da identidade dos parentes mais próximos que ocorrem em regiões já delimitadas no país.
- Estudo em bioensaios, com proteínas microbianas Cry1F e Cry1Ac, em solo com atividade microbiana, agregado com tecido liofilizado de plantas, mostraram que essas proteínas foram degradadas com uma vida média de 1 a 2 dias, indicando uma rápida taxa de decomposição no solo.
- As comparações das comunidades de artrópodes numa análise visual de parcelas experimentais de algodão evento 281-24-236/3006-210-23 e do algodão convencional, com e sem aplicação de inseticidas, realizados nas unidades de Indianópolis-MG e Mogi Mirim-SP, mostraram que as comunidades nos tres tipos de parcelas foram similares quanto à presença dos artrópodes mais abundantes .
- Estudos realizados em mamíferos: camundongo, em aves: codorna, em invertebrados do solo: minhoca e collembola, em organismos aquáticos: Daphnia e truta, em artrópodes não-alvo: abelhas, crisopa, himenópteros parasitas, joaninha e borboleta Monarca, mostraram que as proteínas Cry1F e Cry1Ac presentes no algodão evento 281-24-236/3006-210-23 não causam danos a esses organismos indicadores.

12. **Referência bibliográfica**

Abbott, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, n.1, p. 265-267. 1925.

AL-Jibouri, H.A.; Miller, P.A.; Robinson, H.F. Genotypic and environmental variances and covariances in an upland cotton cross of interspecific origin. **Agronomy Journal**, 50:623-636, 1958.

Allard, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo. 381p. 1960.

- Amorim-Neto, M.S.; Araújo, A.E.; Caramori, P.H.; Gonçalves, S.L.; Wrege, M.S.; Lazzarotto, C.; Lamas, F.M.; Sans, L.M.A. Zoneamento agroecológico e definição da época de semeadura do algodoeiro no Brasil. **Revista brasileira de agrometeorologia**, Passo Fundo, 9 (3):422-428, 2001.
- Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp J.D. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. **Plant Mol. Biol.** 2:335-350, 1983.
- Barroso, P.A.V.; Freire, E.C.; Amaral, J.A.B.; Silva, M.T. Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas. **Comunicado Técnico** 242. Embrapa-Algodão. 7p. 2005.
- Beasley, J.O. Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids and induced polyploids of *Gossypium*. **Genetics**, 27:25-54, 1942
- Borém, A., Freire, E.C., Penna, J.C.V. ; Baroso, P.A.V. Considerations about cotton gene escape in Brazil: a review. **CBAB**, 3: 315-332., 2003.
- Brooks, K. J.; Andrus, A. K. Cry1F Microbial Protein (FL): Acute Oral Toxicity Study in DC-1 Mice. Study ID: 991178, **unpublished Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation technical report**, 1999.
- Brooks, K. J.; Yano B.L. Cry1F-(synpro) microbial protein (+) Cry1Ac-(synpro) microbial protein: Acute oral toxicity study in mice. Study ID: 011127, **unpublished Dow AgroSciences LLC/Mycogen Corporation technical report**, 2001.
- Brubaker, C.L.; Bourland, F.M.; Wendel, J.F. *In: Cotton: Origin, History, Technology and Production* Smith, W.C.; Cothren, J.T., eds. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA, pp 3-32. 1999.
- Carvalho, L.P. Manutenção e multiplicação de cultivares e sementes genéticas de algodoeiro. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, 29p. 2001.
- Castro, E.M.; Gridi-Papp, I.M.; Paterniani, L. Eficiência de barreiras vegetais no isolamento de parcelas de algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 17:1155-1161, 1982.
- Christensen, A. H.; Sharrock, R A.; Quail, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, 18(4):675-689, 1992.
- Codex. Report of the third session of the Codex AD HOC Intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. **Codex Alimentarius Commission**, Alinorm 03/34, Yokohama, Japan, 4-8 March 2002. WHO/FAO, Rome, 2002.

- Companhia Nacional de Abastecimento – **CONAB. Estimativa de safra:** algodão em pluma - comparativo de área, produtividade e produção safras 2004/2005 e 2005/2006. Indicadores da agropecuária, ano XV n. 04, maio, 2006. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/indicadores/pubindicadores.pdf>, Acesso em: 07 jun. 2006.
- Companhia Nacional de Abastecimento – **CONAB. Série histórica de grãos - Safra 1976/77 a 2005/06**, safras, levantamento abril 2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/AlgodaoSerieHist.xlsf>>, Acesso em:07 jun. 2006.
- Crisóstomo, J.R.; Chiavecato, E.J.; Gridi-Papp, I.L.; Fuzatto, M.G.; Vencovsky, R.; Pereira, M.B. Taxa de fertilização cruzada e níveis de endogamia no algodoeiro herbáceo em Campinas. *In Reunião Nacional do Algodão*. Campina Grande. Resumos. Campina Grande. EMBRAPA - CNPA, p.31. 1988.
- Davidson, A.; Seara, H.S. The incidence and losses caused by pink bollworm and other pests on cotton yield in northeast Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, 14:80-85, 1966.
- Degrande, P.E. **Guia prático de controle das pragas do algodoeiro**. Dourados,UFMS, 1998. 60p.
- Dobson, C. Glufosinate Ammonium-Tolerant Canola HCN92. Safety Assessment Summary Submitted to the FDA. **AgrEvo Canada Inc.** 1995.
- Eastick, R. The potential weediness of transgenic cotton in Northern Australia. **Technical Bulletin 305**. SCIRO – Australian Cotton Cooperative Research Centre. 199p. 2002.
- Eckes, P. ; Uijtewaal B. ; Donn, G. A Synthetic Gene Confers Resistance Against The Broad Spectrum Herbicide L-Phosphinothricin in Plants. **Journal of Cellular Biochemistry**. Abstract M516, 13D: 334, 1989.
- Ellis, J.G. ; Llewellyn, D.J. ; Walker, J.C. ; Dennis, E.S. ; Peacock, W.J. The ocs element: a 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer. **EMBO Journal**, 6:3203-3208, 1987.
- EPA. Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants; exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. **Fed. Reg.**, 62, 70:17717-17720, 1997.
- FAO/WHO. Evaluation of Allergenicity of genetically modified foods. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology**, 22-25 January 2001, Pp. 1-29, 01/22/01 – 01/25/01, 2001.
- FDA. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. **Fed. Reg.**, 57, 104:22984-23005, 1992.

- Freire, E.C. Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. **Série Documentos** n. 78. EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, PB. 22p, 2000.
- Freire, E. C. Fluxo gênico entre algodoeiros convencionais e transgênicos. **Revista Oleaginosas e Fibrosas**, 6(1):471-482, 2002a
- Freire, E.C. Fluxo gênico no gênero *Gossypium*. In Fontes, E.M.G. *et al.* Painel de especialistas sobre impactos ambientais do algodão geneticamente modificado resistentes aos insetos. **Séries documentos** 81. Embrapa, Brasília. 52p. 2002b
- Freire, E.C.; Barroso, P.A.V.; Penna, J.C.V.; Borém, A. Fluxo gênico: análise de caso do algodão no Brasil. **Biociência, ciência e desenvolvimento**, 29:104-113, 2003.
- Fryxell, P. A. Mode of reproduction of higher plants. **Bot. Rev.**, 23:135 – 233, 1957.
- Fryxell, P.A. A redefinition of the tribe Gossypieae. **Botanical Gazette**, 129: 296-308. 1968.
- Fryxell, P. A. The Natural History of the Cotton Tribe (Malvaceae, Tribe Gossypieae). **Texas A&M University Press**. College Station and London. 245 p. 1979.
- Gallagher S.P. ; Beavers J.B. Cry1F (synpro) and Cry1Ac (synpro): an acute oral toxicity study with the Northern Bobwhite. Study ID: 021124, **unpublished Dow AgroSciences report contracted to Wildlife international**, Ltda., 2002.
- Gravena, S.; Gravena, R.; Batistela, M.J. Eficiência e praticabilidade agrônômica de Algodão Geneticamente Modificado expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac no manejo do Curuquerê, Alabama argillacea Hueb, da Lagarta-da-Maçã, *Heliothis virescens* Fabr, e da Lagarta Militar, *Spodoptera frugiperda* Smith. **Relatório Técnico Interno da Dow AgroSciences não publicado**, 2006.
- Gravena, S.; Gravena, R.; Batistela, M.J.; Benvenga, S.R.; Araujo Junior, N.; Fracasso, G.V.; Cordioli V.H. Eficiência e praticabilidade agrônômica do algodão geneticamente modificado MXB-13, que expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac, no controle de *Spodoptera* spp., *Heliothis virescens* Fabr. e *Alabama argillacea* Hueb. **Relatório Técnico Interno da Dow AgroSciences não publicado**, 2007a.
- Gravena, S.; Gravena, R.; Batistela, M.J.; Benvenga, S.R.; Araujo Junior, N.; Fracasso, G.V.; Cordioli V.H; Amorim L.C.S. Efeito do algodão geneticamente modificado MXB-13, que expressa as proteínas Bt Cry1F e Cry1Ac, sobre a comunidade de artrópodes chaves não alvo nas plantas. **Relatório Técnico Interno da Dow AgroSciences não publicado**, 2007b.
- Green, J.M.; Jones, M.D. Isolation of Cotton for Seed Increase. **Agronomy Journal**, 45:366-368, 1953.

- Green, S. B.; Ernest, A.D.; Bevan, S.A. Molecular Characterization of Cry1F (sympro)/Cry1Ac (sympro) Stacked Transgenic Cotton Line 281-24-236/3006-210-23. **Dow AgroSciences LLC Internal Confidential Report #010075.01**, 2002.
- Head, G.; Brown, C. R.; Groth, M. E.; Duan, J. J. Cry1Ab protein levels in phytophagous insects on transgenic corn: Implications for secondary exposure risk assessment. **Entomol. Exper. Applicana**, 99:37-45, 2001.
- Head, G.; Moar, W.; Eubanks, M.; Freeman, B.; Ruberson, J.; Hagerty, A.; Turnipseed, S. A multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed Bt and non-Bt cotton fields. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1193-1210, 2005.
- Hellmich, R. L.; Siegfried, B. D.; Sears, M. K.; Stanley-Horn, D. E.; Daniels, M. J.; Mattila, H. R.; Spencer, T.; Bidne, K. G.; Lewis, L. C. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 98 (21): 11925-11930, 2001.
- Herman, R. A.; Young, D.L. Microbial B.t. Cry1F (full length) Delta Endotoxin: Cotton-Insect-Pest Susceptibility Study. Study ID: 990049, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 1999.
- Herman, R.A.; Gao, Y. Thermolability of Cry1Ac (sympro) Delta-Endotoxin. Study ID: GH-C 5281, **unpublished Dow AgroSciences internal report**, 2001.
- Herman, R.A.; Collins, R.A. Degradation of Cotton-Produced *B.t.* Cry1Ac (synpro) and Cry1F (synpro) in a Representative Cotton Soil. Study ID: 010113, **unpublished Dow AgroSciences internal report**, 2001.
- Herman, R. A.; Collins, R. A. Biological Equivalency of Event 3006-210-23 Cotton- and *Pseudomonas*-Expressed Cry1Ac (synpro) B.t. Insecticidal Crystal Protein. Study ID: 020069, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 2002
- Herman, R. A.; Buehrer, T. J.; Young, D. L. Degradation of Microbial B.t. Cry1F (full length Delta-Endotoxin in a Representative Cotton Soil. Study ID: 990039, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 1999.
- Herman, R.A.; Evans, S.L.; Shanahan, D.M.; Mihaliak, C.A.; Bormett, G.A.; Young, D.L.; Buehrer, J. Rapid degradation of Cry1F delta-endotoxin in soil. **Environ. Entomol.** 30: 642-644, 2001.
- Herman, R.A.; Wolt, J.D.; Halliday, W.R. Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil. **J. Agric. Food Chem.**, 50:7076-7078, 2002a.
- Herman, R.A.; Scherer, P.N.; Wolt, J.D. Rapid Degradation of a Binary, PS149B1, σ -Endotoxin of *Bacillus thurigiensis* in Soil, and a Novel Mathematical Model for Fitting Curve-Linear Decay. **Environ. Entomol.**, 31(2):208-214, 2002b.

- Huang, J.; Rozelle, S.; Pray, C.; Wang, Q. Plant Biotechnology in China. *Science Magazine*, China, v. 295, p. 674-677. Jan. 2002. Disponível em: <http://www.stradanove.net/news/testi/bio-02b/cina.pdf> Acesso em: 10 maio 2006.
- King Cotton Magazine <<http://cotton.net/>> acesso em 20/06/2006
- Korjagin, V.A. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1Ac (sympro). ID: GH-C 5282, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 2001.
- Llewellyn; D.; Fitt, G. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding*, 2:157-166, 1996.
- Maggi, V.L. Microbial Cry1F Delta Endotoxin, Microbial Cry1Ac Delta-Endotoxin, Pollen Expressing Cry1Ac Delta-Endotoxin and Pollen Expressing Cry1Ac Delta Endotoxin: Evaluation of Dietary Exposure on Honeybee Development. Study ID: CAR 128-01-01098, **unpublished Mycogen c/o Dow AgroSciences technical report contracted to Department of Agricultural Research Inc**, 2001.
- Mahill, J. F.; Storer, N. P. 2002 Field Survey to Evaluate Effects on Non-Target Beneficial Arthropods of Cry1F/Cry1Ac Bt Cotton MXB-13. Study ID: GH-C 5578, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 2002.
- Marchini, L.C. **Avaliação de dano do curuquerê do algodoeiro (Alabama argillacea) (Hubner, 1818) (Lepidoptera:Noctuidae) em condições simuladas e redução de sua população através de iscas tóxicas**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 1976.
- Marino, T.A.; Yaroeh, A.M. Cry1F (synpro) and Cry1Ac (synpro) insecticidal crystal proteins: an acute toxicity study with the daphnid, *Daphnia magna* Strauss. Study ID: 021112, **unpublished Dow AgroSciences internal report**, 2002.
- McGregor, S.E. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. **Agriculture Handbook nº 496. U.S. Government Printing Office**. Washington, DC, 1976.
- Medeiros, R.S.; Ramalho, F.S.; Zanúncio, J.C.; Serrão, J.E. Estimate of Alabama argillacea (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) development with nonlinear models. **Brazilian Journal of Biology**, 63: 589-598, 2003.
- Meier, U. **Growth stages of mono- and dicotyledonous plants**: BBCH-Monograph. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, 2a Ed., 2001. 158p.
- Moreira, J.D.N.; Freire, E.C.; Santos, J.W.; Vieira, R.M. Use of numerical taxonomy to compare Moco cotton with other cotton species and races. **Revista Brasileira de Genética**, 18: 99-103, 1995.

- Namken, L.N.; Heilman; M.D.; Dilday, R.H.. Arrangement of sympodia and earliness potential of cotton. **Crop Science**, 19:620-622, 1979.
- Naranjo, S. E. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* Cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1193-1210, 2005a.
- Naranjo, S. E. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* Cotton on the function of the natural enemy community. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1211-1223, 2005b.
- Narva, K.; Palta, A.; Pellow, J. Product Characterization Data for *Bacillus thuringiensis* var. aizawai Cry1F (synpro) Insect Control Protein as Expressed in Cotton. Study ID: GC-C 5304/GH-C 5304, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 2001a.
- Narva, K.; Palta, A.; Pellow; J. Product Characterization Data for *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki Cry1Ac (synpro) Insect Control Protein as Expressed in Cotton. Study ID: GH-C 5303, **unpublished Dow AgroSciences LLC internal report**, 2001b
- NCPA. Cottonseed oil. **National Cottonseed Products Association**, <http://www.cottonseed.com/publications/csobro.asp>, 2004
- Niles, G.A.; Feaster, C.V. Breeding in cotton. *In*: Kohel, R. J.; Lewis, C. W. Ed. **American Society of Agronomy**. Madison, Wisconsin USA, 1984a.
- Niles, G.A.; Feaster, C.V. Cotton, Agronomy Monograph, nº 24, pp. 201-231, **American Society of Agronomy**, Crop Science Society of America, CSSA, Soil Science Society of America, 1984b.
- Oosterhuis, D.M.; Jernstedt, J. Morphology and anatomy of the cotton plant. *In*: **Cotton: origin, history, technology and production**. Smith, C.W., Cothren, J.T (editors). Chapter 2.1, 175-206, 1999.
- Penna, J.C.V. Melhoramento do Algodão. *In*: **Melhoramento de espécies cultivadas**. Borém, A.(Ed.) Viçosa; Ed. UFV. p. 15-53. 2005. 969p.
- Penna, J.C.V.; Miranda, A.R. ; Santos, E.O. Controle artificial de polinização em algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 26:347-352. 1991.
- Percival, A.E.; Wendel, J.F.; Stewart, J.M. Taxonomy and germplasm resources. *In*: **Cotton: origin, history, technology, and production**. Smith, C.W. & Cothren, J.T (editors). Chapter 1.2, 1999, 33-64 p.

- Phillips, A.M.; Embrey, S.K.; Shan, G.; Korjagin, V.A. Field expression of Cry1F (synpro), Cry1Ac (synpro) and phosphinothricin acetyltransferase (PAT) proteins in transgenic cotton plants, cottonseed, and cottonseed processed products; and compositional analysis of cottonseed and cottonseed processed products. Study ID: 010015.02, **unpublished Dow AgroSciences internal report**, 2002.
- Pitelli, R. R., Pavani, M.C.M.D. Feralidade. In: Biotecnologia e Meio Ambiente. Borém, A. (Ed.). Viçosa: Editora Folha de Viçosa. 425p. 363-412, 2005.
- Poehlman, J.M. **Breeding field crops**. Third Edition. Iowa State University Press, 1994.
- Pope, O.A.; Simpson, D.M.; Duncan, E.N. Effect of corn barriers on natural crossing in cotton. **Journal of Agriculture Research**, 68:347-361, 1944.
- Porch, J.R. ; Krueger, H.O. Cry1F (Synpro) Delta Endotoxin and Cry1AC (Synpro) Delta Endotoxin: A Dietary Toxicity Study with the Ladybird Beetle. DECO HET T3.02-000-000-332. **Unpublished study of Toxicology & Environmental Research and Consulting**. The Dow Chemical Company Midland, Michigan 48674. 2001.
- Queiroga, V.P.; Menezes Neto, J.; Matos, V.P. Determinação da taxa de dispersão do pólen, em algodoeiro arbóreo, com o uso do azul de metileno. **Revista Ceres**, 40 (230):413-417, 1993.
- Resende, M.A.V.; Fallieri, J. Determinação da taxa de fecundação cruzada em algodoeiro herbáceo no Norte de Minas Gerais. In: **Reunião Nacional do Algodão VIII**. Londrina. **Resumos**, IAPAR, Londrina. p.27. 1995.
- Santos, W.J. **Efeitos da simulação dos danos da lagarta das maçãs *Heliiothis virescens* (Fabr. 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) na produção do algodoeiro**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil. 1977
- Sindermann, A.B.; Porch, J.R.; Krueger H.O. Cry1F (synpro) d endotoxin and Cry1Ac (synpro) d endotoxin: acute toxicity to the earthworm in an artificial soil substance. Study ID:379-117, **unpublished Dow AgroSciences report contracted to Wildlife international**, 2001.
- Sinderman, A.B.; Porch, J.R.; Krueger, H.O. Cry1F (synpro) ICP and Cry1Ac (synpro) ICP: Dietary toxicity to parasitic Hymenoptera (*Nasonia vitripennis*). Study ID: 02116, **unpublished Dow AgroSciences internal report contracted to Wildlife International, Ltd.**, 2002a
- Sinderman, A.B.; Porch, J.R.; Kwrueger, H.O. Cry1F(synpro) ICP and Cry1Ac (synpro) ICP: Dietary toxicity to Green Lacewing larvae (*Chrysoperla carnea*). Study ID: 021125, **unpublished Dow AgroSciences internal report contracted to Wildlife international Ltd.**, 2002b.

- Small, R.L.; Wendel, J.F. Phylogeny, duplication and intraspecific variation of Adh sequences in New World diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 16:73-84, 2000.
- Texeira, D. Assessment of chronic toxicity of diets containing Cry1F and Cry1Ac microbial proteins, lyophilized Cry1Ac cotton leaf tissue or PSC-355 control cotton leaf tissue to collembola, Study ID: 021123A. **Unpublished Dow AgroSciences report contracted to Sprinborn Smithers Laboratories**, 2002.
- Torres, J. B.; Ruberson, J. R. Canopy and ground-dwelling predatory arthropods in commercial *Bt* and non-*Bt* cotton fields: patterns and mechanisms. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1242-1256, 2005.
- Turcotte, E.L.; Percy, R.G. Genetics of kidney seed in *Gossypium barbadense* L. **Crop Science**, 30:384-386, 1990.
- Umbeck P.F. ; Barton K.A. ; Nordheim E.V. ; McCarty, J.C ; Parrott, W.L. ; Jenkins, J.N. Degree of Pollen Dispersal by Insects from a Field Test of Genetically Engineered. **Cotton. J. Econ. Entomology**, 84:1943-1991, 1991.
- USEPA. Biopesticide Fact Sheet: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry1Ac Delta-Endotoxin and Its Controlling Sequences as Expressed in Cotton (006445) USEPA, OPP, BPPD, Washington, DC., 1995. Accessed electronically 18 Sep 02, <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/factsheets/fs006445t.htm>.
- Ward, R.N.; Ward, K.E. Impact of honey bee pollination activities on *B.t.* cotton production in Northern Alabama. 2002. Source: http://home.hiwaay.net/~martinb/impact_of_honey_bee_pollination_.htm
- Watt, G. **The wild and cultivated cotton plants of the world**. Longmans, Green and Co., London. 1907
- Wendel, J.F.; Rowley, R.; Stewart, J.M. Genetic diversity in and phylogenetic relationships of the Brazilian endemic cotton, *Gossypium mustelinum* (Malvaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 192:49-59,1994.
- Whitehouse, M.E.A.; Wilson, L.J.; Fitt, G.P. A comparison of arthropods community in transgenic *Bt* and conventional Cotton in Australia. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1224-1241, 2005.
- Wolt, J. D. Ecological Risk Assessment of Cotton Expressing Cry1F and Cry1Ac Insecticidal Crystalline Proteins to Non-target, Beneficial, and Endangered Insects. Study GH-C 5569. **Unpublished study of Regulatory Laboratories. Dow AgroSciences LLC**, Indianapolis, Indiana, 2002.