

**TRANSFORMAÇÃO DE ALGODOEIRO VIA  
TUBO POLÍNICO:  
OTIMIZAÇÃO E PERSPECTIVAS DE  
APLICAÇÃO<sup>1</sup>**

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 184**

## **TRANSFORMAÇÃO DE ALGODOEIRO VIA TUBO POLÍNICO: OTIMIZAÇÃO E PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO**

Raquel Sampaio de Oliveira  
Osmundo Brillhante de Oliveira Neto  
Ni Wanchao  
Paulo Henrique Alves da Costa  
Isabela Bueno Ribeiro Evangelista  
Eduardo Leonardecz  
Eduardo Romano  
Marise Ventura Coutinho  
Antônio Américo Barbosa Viana  
Maria Cristina Mattar da Silva  
Thales Lima Rocha  
Maria Fátima Grossi de Sá

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*  
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*  
Membros: *Arthur da Silva Marante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*  
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2007):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

T 772 Transformação de algodoeiro via tubo polínico: otimização e perspectivas de aplicação. / Raquel Sampaio de Oliveira ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
30 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 184)

1. Inseto-praga - resistência. 2. Bicudo-do-algodoeiro. 3. Algodão. 4. Melhoramento vegetal. 5. Tubo polínico. I. Oliveira, Raquel Sampaio de. II. Série.

632.7 – CDD 21.

# TRANSFORMAÇÃO DE ALGODOEIRO VIA TUBO POLÍNICO: OTIMIZAÇÃO E PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO<sup>1</sup>

---

Raquel Sampaio de Oliveira<sup>2</sup>  
Osmundo Brillhante de Oliveira Neto<sup>3</sup>  
Ni Wanchao<sup>4</sup>  
Paulo Henrique Alves da Costa<sup>5</sup>  
Isabela Bueno Ribeiro Evangelista<sup>6</sup>  
Eduardo Leonardecz<sup>7</sup>  
Eduardo Romano<sup>8</sup>  
Marise Ventura Coutinho<sup>9</sup>  
Antônio Américo Barbosa Viana<sup>10</sup>  
Maria Cristina Mattar da Silva<sup>11</sup>  
Thales Lima Rocha<sup>12</sup>  
Maria Fátima Grossi de Sá<sup>13</sup>

## Resumo

Desde a introdução do bicudo-do-algodoeiro no Brasil, estudos vêm sendo realizados visando gerar tecnologias que sejam econômica e ecologicamente viáveis para serem utilizadas no seu controle. A maioria dos esforços realizados foi concentrada no aspecto agrônomo, incluindo, manejo integrado de pragas, melhoramento clássico visando o desenvolvimento de cultivares de ciclo curto e maturação rápida, desenvolvimento de armadilhas, apresentação de novos inseticidas, etc. Estes esforços têm sido de grande valia, mas o bicudo-do-algodoeiro ainda se mantém como a praga que mais causa prejuízo à cultura do algodão no Brasil. Do ponto de vista biotecnológico, atualmente, nenhum evento comercial de algodão comercial geneticamente modificado (GM) é capaz de controlar o bicudo-do-algodoeiro. Um dos aspectos importantes na geração de algodão GM é o sistema de transformação genética da planta. A transformação

---

<sup>1</sup> Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Bióloga, Mestranda em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. [raquelsam@gmail.com](mailto:raquelsam@gmail.com)

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Mestre em Bioquímica, Doutor em Biologia Molecular. Pós-Doutorado Empresarial do CNPq na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Professor do Centro Universitário Unieuro. [osmundo@cenargen.embrapa.br](mailto:osmundo@cenargen.embrapa.br)

<sup>4</sup> Professor. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China. [jaasiicb@public1.ptt.js.cn](mailto:jaasiicb@public1.ptt.js.cn)

<sup>5</sup> Biólogo, Mestre em Bioquímica, Doutorando em Biologia Molecular na Universidade de Brasília. [costapha@yahoo.com.br](mailto:costapha@yahoo.com.br)

<sup>6</sup> Engenheira Agrônoma, Especialista em Cultura de Tecidos, Bolsista na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. [isabela@cenargen.embrapa.br](mailto:isabela@cenargen.embrapa.br)

<sup>7</sup> Biólogo, Mestre em Genética, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas. Professor da Universidade Católica de Brasília. [leonardecz@pos.ucb.br](mailto:leonardecz@pos.ucb.br)

<sup>8</sup> Biólogo, Mestre em Genética, Doutor em Biologia Molecular, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. [romano@cenargen.embrapa.br](mailto:romano@cenargen.embrapa.br)

<sup>9</sup> Engenheira Agrônoma, Mestre em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. [marisecv@cenargen.embrapa.br](mailto:marisecv@cenargen.embrapa.br)

<sup>10</sup> Biólogo, Mestre em Biologia Molecular, Bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. [aamerico@gmail.com](mailto:aamerico@gmail.com)

<sup>11</sup> Bióloga, Mestre e Doutora em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. [cristina@cenargen.embrapa.br](mailto:cristina@cenargen.embrapa.br)

<sup>12</sup> Biólogo, Doutor em Bioquímica, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. [thales@cenargen.embrapa.br](mailto:thales@cenargen.embrapa.br)

<sup>13</sup> Bióloga, Mestre e Doutora em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Chefe do Laboratório de Interação Molecular Plantas-Praga. [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br)

de algodão é limitada a algumas variedades e a eficiência é muito baixa e de pouca repetibilidade. A tecnologia de transformação do algodão *via tubo polínico* se apresenta como uma alternativa e sua utilização chega em momento adequado para a cotonicultura brasileira. Atualmente, a cotonicultura se encontra em franco crescimento e os estudos apontam para a necessidade de cultivares de algodão GM totalmente brasileiro para resistência a insetos-praga, com foco principal para o bicudo-do-aldodoeiro. A tecnologia de transformação de algodão via tubo polínico foi divulgada pela primeira vez por Zhou e colaboradores em 1983, e consiste na injeção de DNA na parte superior de maçã jovem, logo após a polinização. O DNA exógeno pode alcançar o ovário através da passagem deixada pelo tubo polínico e integrar-se às células zigóticas fertilizadas, nas quais não houve ocorrência de citocinese. Os estudos aqui apresentados mostram as condições ótimas para a utilização eficiente da técnica de transformação via tubo polínico em cultivares brasileiros de algodão.

## **Abstract**

Since the introduction of the cotton boll weevil in Brazil, studies have been carried out aiming to generate economic and environmentally viable technologies to be used in its control. The majority of the efforts were concentrated on the agronomic aspects, including: integrated handling of pests, classical breeding targeting the development of cultivars of short time cycle and fast maturation, development of traps, and the production of new insecticides etc. These attempts are of great value, but the cotton boll weevil still remains as the insect pest which causes the most severe damage to the cotton culture in Brazil. Presently, on the biotechnological point of view, no commercial event using genetically modified cotton (GM) available in the market is capable of controlling the cotton boll weevil. One of the important aspects in the generation of GM cotton is the plant genetic transformation system. The cotton transformation is limited to some varieties and the efficiency is very low and of little repeatability. The cotton transformation technology using polinic tube technique is an alternative and its use arrives in a very adequate moment for the Brazilian cotton culture. Currently, the cotton culture is in frank development and the studies point to the necessity to obtain Brazilian GM cotton cultivars totally resistant to the insect-pests, with main focus for the cotton boll weevil. The cotton transformation technology utilizing the polinic tube technique was demonstrated for the first time by Zhou and collaborators in 1983, and consists of DNA injection in the superior young bud part, after the polinization process. The hexogen DNA can reach the ovary through the space left for the polinic tube and integrates in the fertilized zygotic cells, in which did not occur citocinese. The studies presented here show the excellent conditions for the use of the transformation technique by polinic tube in Brazilian cotton cultivars.

## Introdução

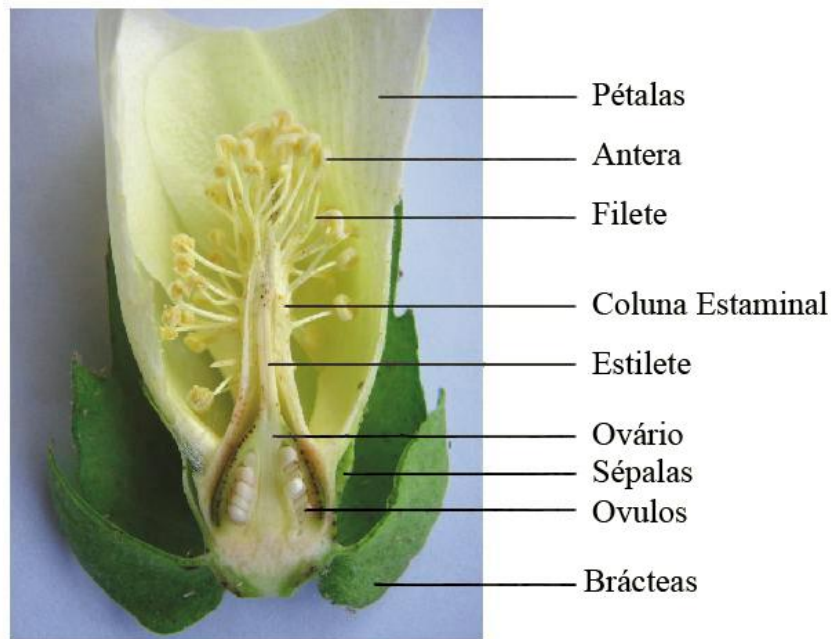
A transformação via tubo polínico (TVTP) de plantas, também chamada de PTP (**Pollen-Tube Pathway**), é um método que permite a inserção de um ou mais genes heterólogos diretamente nas células germinativas das plantas. A técnica TVTP combina técnicas de engenharia genética com o melhoramento tradicional, com o objetivo de gerar plantas geneticamente modificadas (GM) com características agronômicas importantes. Nos últimos anos um grande progresso tem sido alcançado na China, no qual diferentes eventos de algodão GM foram gerados por meio da transformação via tubo polínico; e muitos destes estão atualmente comercializados. A técnica vem sendo aplicada no Brasil desde 2005, onde inicialmente foram realizados experimentos de otimização para adequá-la as condições brasileiras, especialmente de Brasília, no Distrito Federal.

### 1.1 Estrutura reprodutiva do algodoeiro

O algodoeiro possui flores completas, as quais são periantadas, hermafroditas, simétricas e atraentes. Cada ramo frutífero produz, em média, seis a oito botões florais que depois se transformam em flores.

Na **Figura 1** pode ser observado o corte de uma flor do algodoeiro herbáceo destacando-se, além dos verticilos de proteção, o androceu, que possui cerca de dez fileiras de estames, sendo o órgão masculino da flor, com colunas estaminais envolvendo o estilete até a altura do estigma. Cada filete possui uma antera de coloração creme e se encontra alinhado em cinco fileiras duplas longitudinais. As anteras apresentam um lóculo com deiscência longitudinal e são mesofixas. O ovário é súpero, com três a cinco carpelos e três a cinco lóculos, com óvulos de placentação marginal-central e cada lóculo apresenta de oito a dez óvulos. Os grãos de pólen contêm o núcleo vegetativo e o núcleo reprodutivo, os quais têm diâmetro de  $199 \mu$ , enquanto os óvulos são um pouco maiores e estão no interior do ovário, variando de 24 a 50 óvulos por flor.

As flores do algodoeiro apresentam padrão de surgimento característico. Inicialmente surge a flor do primeiro ramo frutífero, posteriormente, a primeira flor do segundo ramo frutífero, e em seguida a primeira flor do terceiro ramo frutífero. A segunda flor do primeiro ramo frutífero, surge durante o intervalo de floração vertical entre os ramos frutíferos e o intervalo de floração horizontal de cada ramo frutífero. Em geral, o tempo decorrido entre o surgimento de uma flor para outra no mesmo ponto de frutificação entre dois ramos é, em média, de três dias e de seis dias entre duas flores no mesmo ramo.

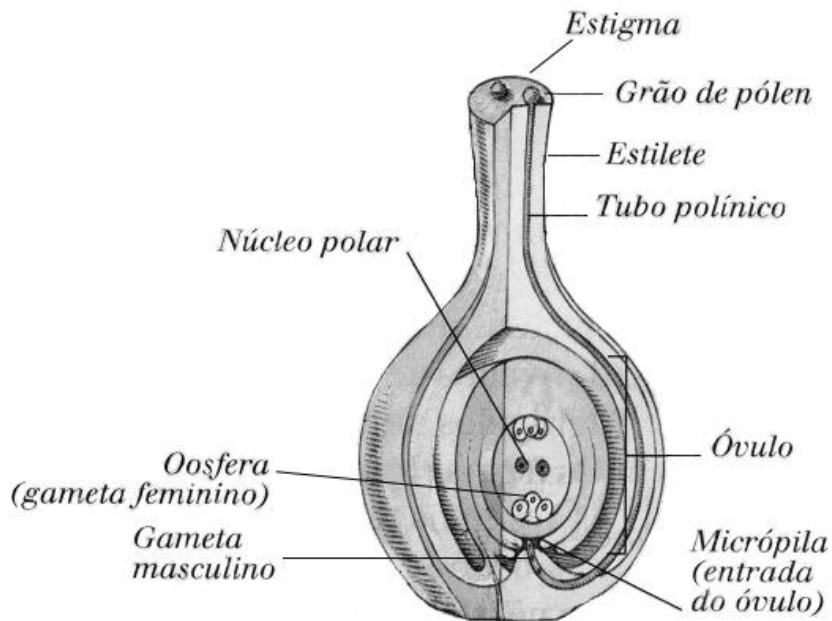


**Figura 1.** Secção longitudinal da flor do algodoeiro após a antese.

Após o processo de fecundação, o ovário se transforma em fruto, ocorrendo um grande aumento daquela parte da flor. Quando jovem e em crescimento, o fruto é conhecido como maçã e após a abertura é chamada de capulho. A semente, que é o óvulo após o processo de fecundação, é coberta de línter e muito rica em óleo.

A estrutura de um óvulo contém um integumento interno, integumento externo, nucelo e saco embrionário (Li, 1979). As células epidérmicas do integumento externo são alongadas e desenvolvem as fibras do algodão. O integumento interno e externo é descontínuo na micrópila, onde o canal é formado pelo acesso do tubo polínico. Durante a fase de reprodução sexual, algumas células do nucelo adjacentes à micrópila são gradualmente degeneradas para formar o canal micropilar, que é o caminho para o tubo polínico germinado passar e entrar no saco embrionário. Esse processo é referido como *vía do tubo polínico*. Segundo observações de Gong (Gong *et al.*, 1988), este canal é muito maior que aquele do tubo polínico em diâmetro. Sendo, também, um caminho para a passagem de outras substâncias, como DNA exógeno, até o saco embrionário (**Figura 2**).





**Figura 2.** Desenho esquemático do ovário indicando o grão de pólen com o tubo polínico desenvolvido.

## 1.2 Desenvolvimento do botão floral e do embrião em função do tempo e a TVTP

Para facilitar o entendimento da TVTP e fenologia do algodão (**Figura 3**), a TVTP foi inserida aos estágios de desenvolvimento do botão floral e do embrião seguindo a interpretação histológica de Quintanilha e colaboradores (Quintanilha *et al.*, 1962). Assim, o início do desenvolvimento do botão floral ocorre entre 30-35 dias após a germinação e é conhecido como o momento a partir do qual este se diferencia morfologicamente do gomo vegetativo. Nos gomos vegetativos o vértice é, e permanece, convexo. Nos botões florais, o vértice vegetativo, primitivamente convexo, sofre em determinado momento uma depressão no seu topo e se torna côncavo. É a partir do momento em que esta depressão se torna aparente que se inicia o desenvolvimento do botão floral.

Do início do desenvolvimento do botão floral até a antese têm-se **26 dias (Dia -26)**. A antese é um momento rigorosamente fixo da vida da flor. Sendo assim, considerando como ponto de referência o dia da antese, o qual pode ser chamado de **dia 0**, tem-se:

**Dia 0:** Os sacos embrionários estão prontos a ser fecundados, mas a fecundação só se dá na noite do **dia 0** para o **dia + 1**, ou no **dia + 1**. Os dois núcleos polares estão juntos no centro do saco embrionário, mas ainda não estão conjugados. Aqui se tem o começo do desenvolvimento da fibra.

**Dia + 1:** A entrada do tubo polínico no óvulo dá-se durante a noite de **0** para **+ 1**. Às 9 horas da manhã geralmente está terminada a dupla fecundação, encontrando-se já realizada a fusão do primeiro núcleo masculino com a oosfera e a do segundo núcleo masculino com os dois núcleos polares. Estes se mantêm juntos, mas independentes, até

ao momento da entrada do núcleo masculino. Imediatamente depois da fusão dos três núcleos dá-se a primeira divisão da célula mãe do albúmen. À tarde, por volta das 18 horas, já se vêem óvulos com dois núcleos do albúmen e outros com quatro núcleos. Neste estágio, o ovo fecundado ainda se encontra indiviso. A fibra continua a crescer.

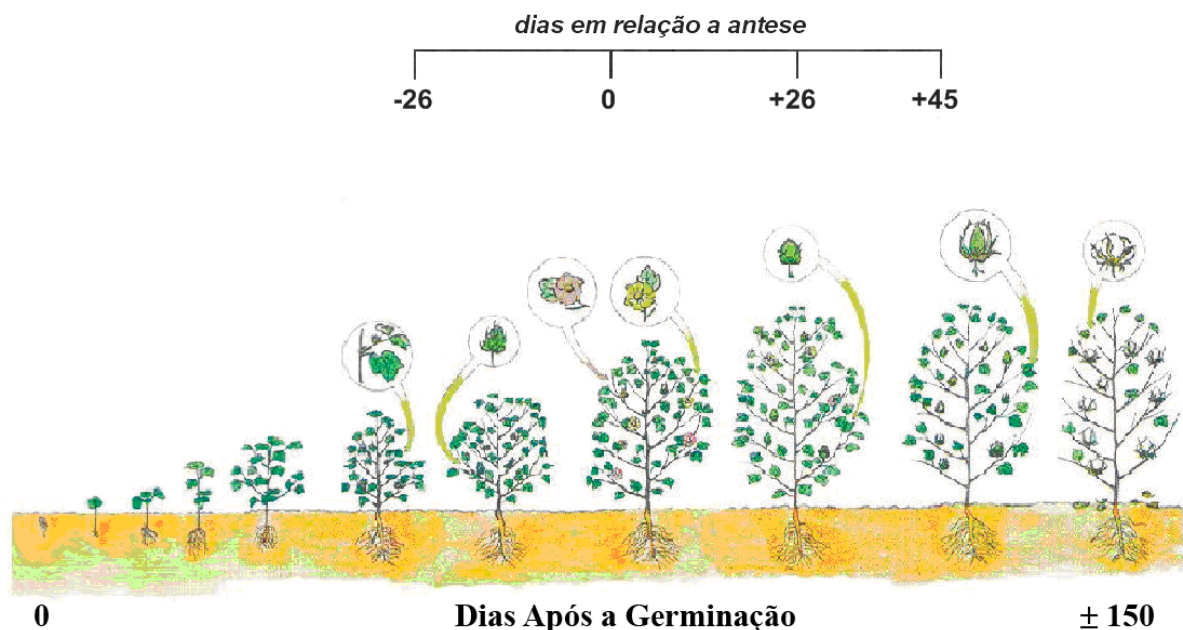
**Dia + 2:** O ovo fecundado permanece indiviso e sem deposição de parede celular. O albúmen continua a desenvolver-se, por meio de divisões rápidas dos seus núcleos, e vai digerindo, pouco a pouco, o tecido do nucelo. Os tegumentos começam a espessar-se. Mesmo em óvulos não fecundados a fibra cresce e se desenvolve normalmente. Em flores castradas a fibra se desenvolve até o sétimo ou oitavo dia, quando o óvulo morre.

**Dia + 3:** O ovo fecundado permanece indiviso até a noite deste dia. A divisão deve se dar da noite de +3 para +4, pois na manhã do dia +4 já se vêem embriões com duas células. Nesta etapa a TVTP já foi feita.

**Dia + 4:** Embrião com duas células.

**Dia + 5:** Embrião com quatro células.

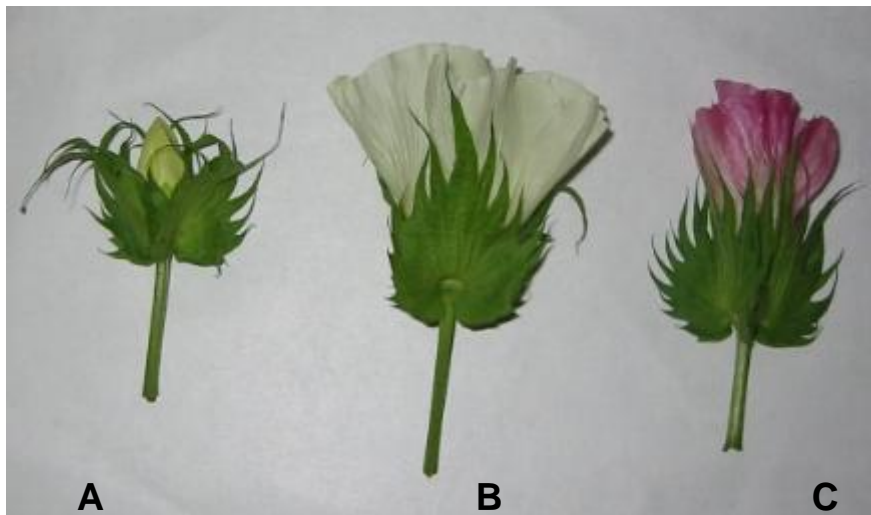
A presença da parede celular que consiste na maior resistência a obtenção de plantas transgênicas, no algodoeiro os seus depósitos se iniciam entre os dias +10 e +12. Assim, a parede celular não constitui um problema na TVTP. Segundo Quintanilha e colaboradores (Quintanilha *et al.*, 1962), as mudanças no desenvolvimento do embrião do algodoeiro continuam até o dia +26. Do dia +26 em diante não ocorrem mais modificações até a completa maturação das maçãs. Nas cultivares moderna a primeira cápsula abre entre os **Dias + 40 e +45** após a antese.



**Figura 3.** Estágios fenológicos do algodoeiro. Na parte superior da figura a antese em relação o desenvolvimento inicial do botão floral (**dia -26**) e a colheita dos

### 1.3 Processo de floração e fecundação do algodoeiro

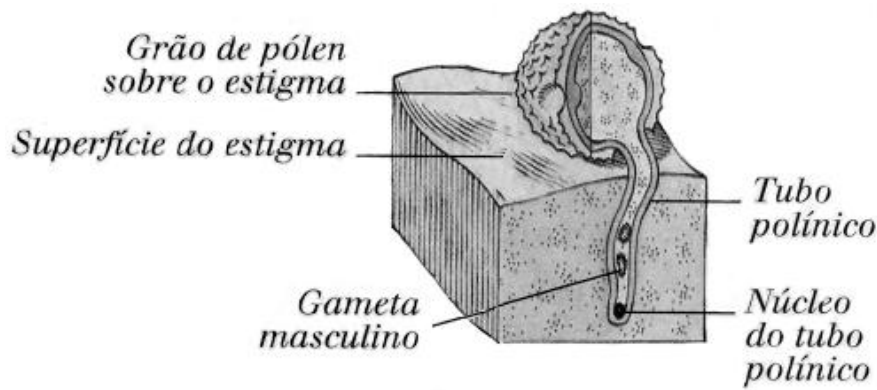
Após cerca de 40 dias da iniciação do botão floral, a flor madura está pronta para a abertura (antese). Na tarde anterior do dia da antese as pétalas se alongam. As flores geralmente abrem das 7 às 9 da manhã do dia seguinte. Temperaturas elevadas irão resultar na antecipação da abertura floral e baixas temperaturas irão atrasar o horário de abertura. Em um período que vai de pouco antes da antese até pouco após a antese, os grãos de pólen deixam as anteras, caem na superfície do estigma e a polinização ocorre. Neste período também ocorre a polinização cruzada. Os grãos de pólen que saem das anteras podem manter a viabilidade por 24 h, com alta atividade dentro de 5 – 6 horas. O estigma tem uma viabilidade maior que o grão de pólen que é mantido por 2 dias. As pétalas que eram de cor creme modificarão de cor à tarde, e ficarão roxas no dia seguinte (**Figura 4**). Finalmente, as pétalas, estames, estilete e estigma caem no terceiro dia.



**Figura 4.** Diferentes estádios apresentados pela flor do algodoeiro. **(A)** Flor antes da antese. **(B)** Flor um dia após a antese. **(C)** Flor dois dias após a antese.

A autopolinização no algodoeiro é mais freqüente, entretanto, a polinização cruzada também é observada a uma taxa que varia de 5 a 20 %. Na presença de polinizadores a polinização cruzada pode ser significativa e alcançar taxas mais elevada.

Durante a polinização, o grão de pólen é depositado no estigma e geralmente germina, lançando o tubo polínico, dentro de 01 h. O tubo polínico penetra no estigma e cresce ao longo do estilete até o ovário (**Figura 5**). Durante o processo de alongamento, a extremidade do tubo polínico formada por um citoplasma denso, contem um núcleo vegetativo e dois núcleos espermáticos que percorrem o estilete: enquanto na parte superior do tubo polínico ocorre à produção de calose que separa o tubo polínico em duas partes. Logo após a divisão do tubo polínico pela presença da calose, o citoplasma da parte superior é gradualmente degenerado.



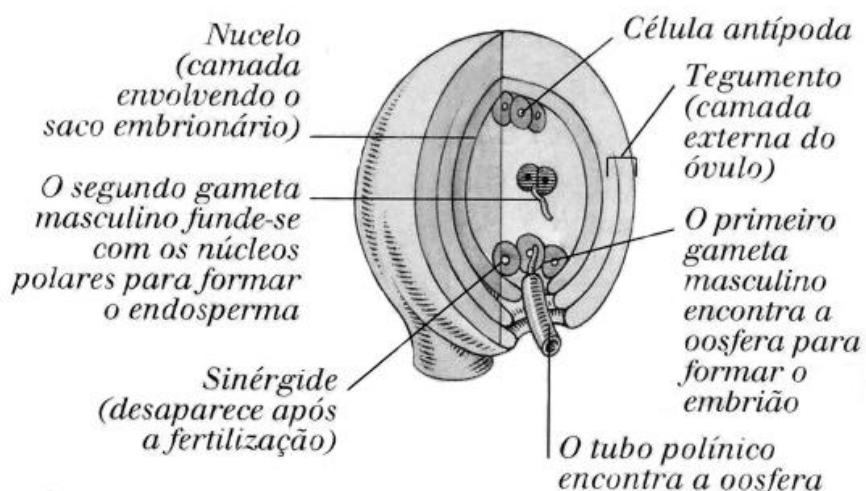
**Figura 5.** Desenho esquemático de um grão de pólen sobre o estigma iniciando o desenvolvimento do tubo polínico.

Em geral, quanto mais pólen é depositado no estigma, mais grãos de pólen são germinados, e a atividade do pistilo é muito maior. O tubo polínico chega ao ovário em cerca de 8h. Cada parte do estigma tem correspondência com uma parte específica do estilete e do lóculo do ovário, formando um caminho contínuo a um único carpelo. Ou seja, cada carpelo tem a sua porção correspondente no estigma.

Depois de entrar na placenta central, o tubo polínico continua a crescer até mudar a direção de crescimento em direção ao óvulo e entrar em contato com o mesmo.

Paralelamente, uma degeneração induzida das células do tecido da nucela ocorre para formar um canal que é originalmente fechado.

O tubo polínico carregando os gametas masculinos penetra no saco embrionário e libera os dois núcleos espermáticos (**Figura 6**). Um núcleo espermático se combina com o óvulo para formar o zigoto e desenvolver o embrião. O outro núcleo se combina com dois núcleos polares para formar o endosperma nuclear e desenvolver o endosperma. Este processo é chamado de dupla fecundação. Todo o processo da polinização até a fertilização ocorre em aproximadamente 24 – 28 horas, com algumas variações para diferentes cultivares e condições ambientais.



**Figura 6.** Desenho esquemático do processo de fertilização da flor do algodoeiro.

#### 1.4 Mecanismo de TVTP

Após o término da dupla fecundação, uma grande quantidade de substâncias e energia é necessária para a primeira divisão do zigoto. Neste estágio, as células são desprovidas de parede celular intacta e membrana nuclear, onde a troca de substâncias entre as células e seus arredores ocorre livremente. Então, é possível para fragmentos de um DNA exógeno entrar no saco embrionário e finalmente, integrar-se no genoma da planta, por um mecanismo ainda desconhecido.

Com base nas observações das variações fenotípicas resultantes da hibridização natural, Zhou e colaboradores (1983) levantaram a hipótese da hibridização de fragmentos de DNA. Combinando o conhecimento da anatomia do processo de fertilização, os pesquisadores sugeriram que o DNA de genes heterólogos pode entrar no saco embrionário fertilizado, por meio do caminho do tubo polínico e propôs a *transformação mediada pela via do tubo polínico* (Zhou *et al.*, 1983). Sendo assim, deu-se início a uma nova forma de transformação genética em plantas. Depois de muitos anos de experimentos e modificações, a tecnologia foi gradualmente aperfeiçoada e atualmente, tem um importante papel no melhoramento genético dos cultivares da China.

Nos estudos iniciais, usou-se o DNA total de *Gossypium barbadense* para transformar *Gossypium hirsutum* por TVTP. Deng e colaboradores (Deng *et al.*, 1999) comprovaram a possibilidade de transferir genes exógenos via TVTP, analisando as plantas por meio da técnica de microscopia confocal de varredura a laser. Um DNA exógeno marcado com uma sonda fluorescente de alta afinidade (TOTO-3), foi introduzido em ovário polinizado, sendo observado que enquanto o tubo polínico penetra na placenta central junto com o estilete, este desenvolve e cresce em direção ao óvulo, girando, então, para alcançar a micrópila (**Figura 2**). O DNA exógeno segue então pelo caminho do tubo polínico, e finalmente entra no saco embrionário, sendo, então, inserido diretamente nas células reprodutivas sem parede celular.

#### 1.5 Transformação do algodão via tubo polínico

Desde 1993, Ni e colaboradores no Institute of Cash Crops (ICC), Jiangsu Academy of Agriculture Science (JAAS), utilizando a tecnologia TVTP, vem introduzindo diferentes genes em cultivares de algodão da China, incluindo genes para proteínas Cry, CpTI (inibidor de proteinase), quitinase,  $\beta$ -glucanase, glicose oxidase e proteínas anti-fúngicas (AFP), entre outros. Como resultado, uma série de eventos de algodão GM foi gerada com resistência para lagartas do algodoeiro (Ni *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1999; Jia *et al.*, 2004), e fungos. Análises moleculares, biológicas e genéticas dos transformantes confirmam a integração e a expressão dos genes alvo, indicando a transformação via tubo polínico como um sistema eficiente.

## **1.6 Fatores que afetam a eficiência da tecnologia TVTP**

**1** – As etapas do processo de fertilização da espécie recipiente e a determinação do momento apropriado para a microinjeção do DNA exógeno são pontos chave para o sucesso da técnica de TVTP. Em média o canal da nucela no algodão é formado de 12 a 28 horas após a polinização.

**2** – A pureza do DNA a ser microinjetado é outro fator que afeta a eficiência da transformação. É recomendado evitar contaminações por DNA bacteriano.

**3** – Durante a microinjeção é importante reduzir o dano mecânico ou dano no ovário para evitar o abortamento da maçã.

### **1.6.1 Vantagens da utilização da TVTP**

**1** – Não há necessidade do emprego de cultura de tecido e de regeneração de plantas.

**2** – Possibilidade de expansão das espécies receptoras para transformação de plantas, uma vez que a hibridização de plantas via tubo polínico existe naturalmente nas plantas e, teoricamente, pode ser utilizada para qualquer planta que produz flores.

**3** – O processo total tem duração de cerca de 4 meses, desde as etapas iniciais de injeção de DNA a obtenção de planta transformada. A frequência de transformação pelo TVTP é geralmente de 0,5 – 1 %, baseado nos cálculos de plântulas positivas do total de sementes germinadas (Gong *et al.*, 1988).

**4** – A técnica é simples e fácil de manuseio; sendo adequada para a transformação em larga escala e para se alcançar um grande número de transformantes (Ni, 1998). As análises moleculares e agronômicas das plantas GM podem ser feitas paralelamente.

### **1.6.2 Desvantagens da utilização da TVTP**

**1** – O tempo de floração da espécie receptora é um fator limitante para o uso da TVTP. O conhecimento da biologia floral, do processo de floração e fertilização para cada espécie é de extrema importância.

**2** – As etapas de microinjeção e manipulação das plantas são influenciadas por condições ambientais e pela experiência e habilidade do manipulador.

**3** – Espécies de plantas com flores pequenas constituem também uma limitação para a microinjeção.

## **1.7 Procedimentos para aplicação das microinjeções**

Os procedimentos gerais que devem ser observados para a aplicação das microinjeções de DNA nas maçãs são descritas abaixo.

- 1 – No algodoeiro, a autopolinização acontece antes da antese, preferencialmente, podendo ocorrer também a fecundação cruzada parcial.
- 2 – Após de 20 – 24 horas da antese, os ovários jovens que estão localizados nos ramos reprodutivos são selecionados. Deve-se sempre selecionar a primeira ou a segunda flor no mesmo ramo.
- 3 – Para a aplicação das microinjeções deve-se utilizar uma microseringa de 50 ou 100  $\mu\text{L}$ . As microseringas devem ser limpas com detergente comum diluído e, então, lavadas com água destilada antes e após o uso.
- 4 – As pétalas devem ser removidas, ficando exposto apenas o ovário jovem (maçã jovem) (**Figura 7**). A excisão das pétalas leva, conseqüentemente, a remoção dos estames e estilete. Este procedimento deve ser feito com cuidado para evitar dano na epiderme do ovário jovem quando as pétalas forem removidas.



**Figura 7.** Preparação de uma maçã para a microinjeção. Pétalas com estigma e estames são retiradas para a exposição da jovem maçã.

- 5 – A agulha da seringa deve ser inserida no estilete até alcançar 2/3 do comprimento de todo o ovário, retornando para 1/3, para a injeção do DNA no ovário (**Figura 8**). A concentração do DNA plasmidial deve ser de 0,1 a 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ou seja, 1 a 2  $\mu\text{g}$  de DNA por ovário.



**Figura 8.** Microinjeção de DNA em maçã jovem. Durante a manipulação, a

6 – Cada botão microinjetado deve ser etiquetado com a identificação da construção gênica utilizada, a data da aplicação da microinjeção e se necessário o nome do manipulador. Procurar deixar apenas uma maçã microinjetada por ramo e podar o ápice do ramo. Isto fará com que mais nutrientes sejam mobilizados para flor.

7 – As cápsulas e sementes da maçã que foram submetidas a microinjeção devem ser colhidas separadamente para futura seleção. Procurar fazer a seleção com as sementes bem secas.

## 1.8 Caracterização do gene alvo nos transformantes

O cultivar original deve ser utilizado como controle na caracterização da progenia do algodão GM. A detecção da expressão de um gene marcador seletivo ou um gene repórter que seja de rápida e fácil detecção e de baixo custo pode ser utilizado para identificar os transformantes. A expressão do gene alvo e a expressão do gene marcador e/ou gene repórter nem sempre estão associados. Os marcadores utilizados em algodão GM têm sido o GUS (Kim *et al.*, 2002; Ul-Haq, 2004; Yuceer e Koc, 2006) e o AHAS (Rajasekaran *et al.*, 1996).

O fenótipo que o gene alvo confere pode ser, às vezes, utilizado para identificação de plantas GM como uma forma de caracterização biológica. Por exemplo, a mortalidade de larva recém eclodida que se alimenta de folhas de algodão GM são utilizadas para o desafio das plantas quanto à resistência a pragas-alvo.

A integração e a expressão do gene alvo em plantas GM podem ser analisadas por métodos moleculares incluindo PCR, *Southern blot*, *northern blot*, *western blot*, ELISA, etc.

## 2.0 Otimização da técnica de TVTP em plantas de algodoeiro cv. Cedro às condições brasileiras

No Brasil, a técnica de TVTP foi introduzida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a partir de 2005, no Laboratório de Interação Molecular Planta Praga. Entretanto, após experimentos preliminares foi verificada a necessidade de estudos para otimização da técnica às condições ambientais de Brasília. Os estudos de otimização foram necessários devido à elevada taxa de abortamento observada, a qual ultrapassava a 90 %, das maçãs microinjetadas.

O foco da pesquisa foi avaliar o efeito de diferentes variáveis na aplicação das microinjeções e o seu efeito no abortamento de maçãs de *G. hirsutum* cultivar Cedro. Os estudos realizados contribuíram para o estabelecimento de um protocolo confiável e repetitivo de transformação de plantas de algodão via microinjeção, com capacidade de gerar um grande número de plantas transformadas com características agrônômicas de importância importantes como a resistência às pragas primárias da cotonicultura, incluindo o bicudo do algodoeiro, lagartas do cartucho, lagartas do botão e lagartas foliares.



Atualmente o Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia conta com vários genes codificadores de proteínas entomotóxicas ( $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* e inibidores de enzimas digestivas), que são candidatos potenciais a serem usados na transformação do algodão através da transformação via tubo polínico (Oliveira Neto *et al*, 2003; Franco *et al.*, 2004; Oliveira Neto *et al*, 2004a, 2004b; Silva *et al* 2004; Grossi-de-Sa *et al.*, 2007).

Assim, com este trabalho se espera que seja introduzida com eficiência à tecnologia de transformação do algodão via tubo polínico no País com o objetivo de obter plantas GMs resistentes as principais pragas da cotonicultura.

## Material e Métodos

### 2.1.1 Material vegetal

O experimento foi realizado com plantas de algodão (*G. hirsutum*) da cultivar BRS Cedro provenientes da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. As plantas foram mantidas durante todo o experimento em casa-de-vegetação, com ventilação e luz natural. Não foi feito controle da temperatura e da umidade relativa. As sementes foram semeadas em sacos plásticos de 10 kg contendo solo autoclavado. As plantas foram regadas três vezes por semana e, conforme a necessidade, adubada. Foram aplicados alguns métodos fitossanitários para o controle de pragas. Cada planta foi identificada individualmente.

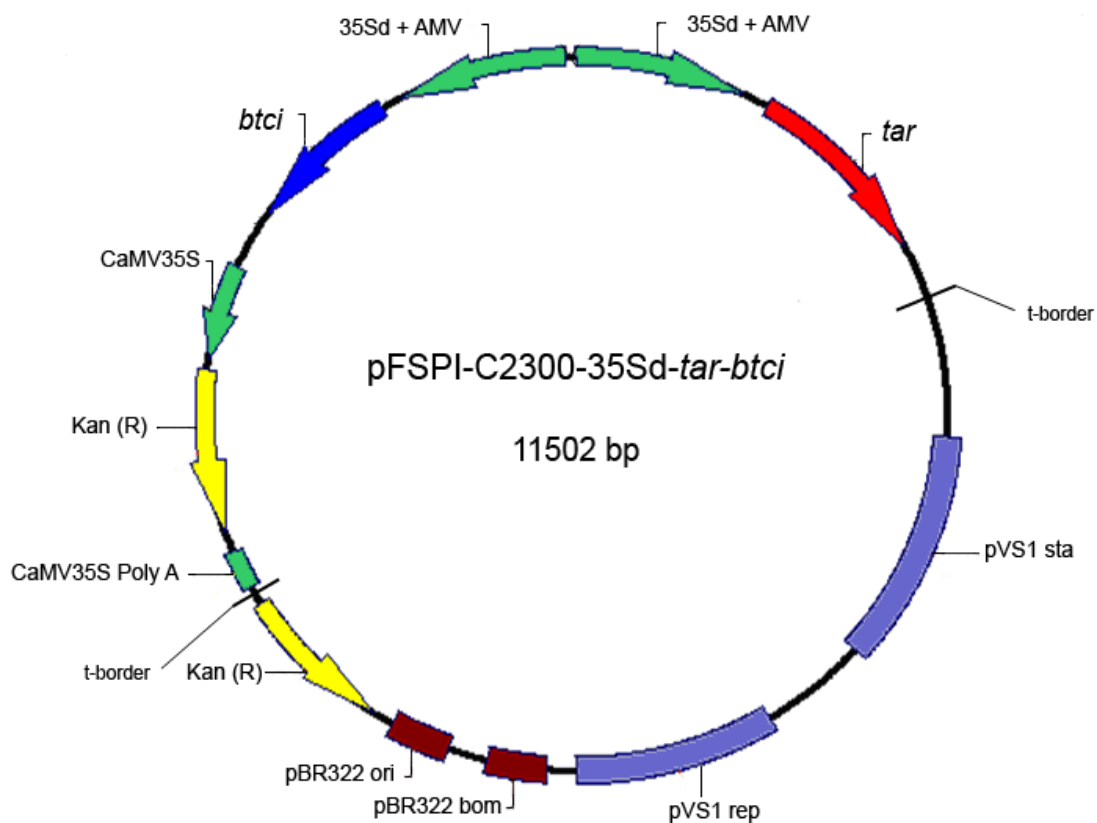
### 2.1.2 Desenho experimental

O experimento foi realizado com 240 plantas, sendo 40 plantas para cada tratamento e com 10 microinjeções por planta. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Os tratamentos utilizados no experimento incluíram:

- 1 – Controle (CONT): plantas cujas maçãs não foram submetidas à microinjeção, mas tiveram 10 de suas maçãs etiquetadas e acompanhadas até a produção de sementes;
- 2 – Agulha (SER): grupo de plantas que tiveram 10 maçãs submetidas à perfuração com a agulha da microseringa no período de 20 às 23:00 h do dia, entretanto, nenhum material foi microinjetado na maçã;
- 3 – DNA Noturno (DNAN): grupo de plantas que tiveram 10 maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 20 às 23:00 h;
- 4 – Água (ÁGUA): grupo de plantas que tiveram 10 maçãs microinjetadas com água no período de 20 às 23:00 h;
- 5 – DNA Vaselina (DNAV): grupo de plantas que tiveram 10 maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 20 às 23:00 h, e após a microinjeção tinha o orifício deixado pela agulha selado com vaselina;
- 6 - DNA Matutino (DNAM): plantas que tiveram 10 maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 08 as 11:00 h.

### 2.1.3 Construção gênica utilizada

Foram selecionados dois genes a serem introduzidos no algodão, cultivar BRS Cedro: o gene codificador do inibidor *btc1* (inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk) e da Tarina (*tar1*), devido às suas atividades contra o bicudo-do-algodoeiro e lepidópteros, respectivamente. Porém, visando à transformação de algodão através da tecnologia TVTP faz-se necessário a introdução destes genes em vetores de expressão de plantas. Ambos os genes foram inseridos sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor duplicado (CaMV35Sd), com o *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa (AMV), de expressão constitutiva, num vetor de subclonagem. O cassete contendo os genes *tar1* e *btc1* foi então inserido no vetor da série pCAMBIA (pC2300) (Figura 9), o qual foi utilizado nos experimentos de transformação de plantas de algodão via microinjeção.



**Figura 9.** Construção com os genes *btc1* e *tar*, codificadores de proteínas inseticidas sob domínio do promotor 35Sd.

### 2.1.4 Aplicação das microinjeções

Para a aplicação das microinjeções, as plantas eram selecionadas previamente. A seleção consistiu em etiquetar as flores de cor roxa (flores fecundadas) nas plantas floridas. O algodoeiro é bem peculiar quanto às características da flor, passando pela etapa de botão floral e, após a antese, pelas etapas de flor de pétalas brancas/creme e flor de pétala roxa. Para os procedimentos da técnica de TVTP é necessário que já tenha ocorrido polinização,

com conseqüente desenvolvimento do tubo polínico e fecundação. Após 20 – 24 horas da antese, os ovários jovens que estão localizados nos ramos reprodutivos devem ser selecionados para a microinjeção. Geralmente, a primeira ou a segunda flor no mesmo ramo foi escolhida.

Para a aplicação das microinjeções foi utilizada uma micro-seringa de 50 µL. As microseringas foram lavadas com detergente diluído e então rinsadas com água destilada antes e após o uso. Em seguida, as pétalas foram removidas, deixando apenas o ovário jovem (maçã jovem) exposto. A excisão das pétalas leva também, conseqüentemente, a remoção dos estames e estilete. Este procedimento foi feito com cuidado para evitar dano na epiderme do ovário jovem.

Para a aplicação da microinjeção propriamente dita, a agulha foi inserida verticalmente no estilete, sendo pressionada à frente até alcançar 2/3 do comprimento de todo o ovário, retornando posteriormente para 1/3, deixando, assim, espaço para a injeção do DNA.

Em seguida, o êmbolo foi movido o suficiente para que 10 µL da solução do DNA fosse liberado no ovário. A concentração do DNA plasmidial utilizada foi de 0,1 a 0,2 µg/ µL, ou seja, 1 a 2 µg de DNA por ovário. Cada botão microinjetado foi etiquetado identificando a construção utilizada, a data, o horário e quando necessário o nome do manipulador.

O ápice do ramo foi podado para mobilizar mais nutriente e melhorar a taxa de maturação das cápsulas transformadas. Foi deixada apenas uma maçã microinjetada por ramo. As cápsulas foram colhidas e as sementes das maçãs microinjetadas foram separadas para futura seleção.

## **Resultados e Discussão**

Uma das limitações do uso da engenharia genética para o melhoramento de plantas se refere ao número limitado de genes isolados que regulam caracteres agrônômicos relevantes. No entanto, o desenvolvimento tecnológico recente vem aumentando a velocidade de identificação e isolamento de genes de plantas, criando novas oportunidades científicas e técnicas para o auxílio do melhoramento de plantas por meio da engenharia genética.

Um outro problema enfrentado é a certeza quanto ao uso de um método eficiente para a introdução de ácidos nucléicos nas células vegetais. Neste caso específico se ressalta o impedimento da parede celular na transformação das plantas e como conseqüência a diminuição do uso da engenharia genética para o melhoramento de plantas, entre elas a do algodão.

Nossos estudos, na tentativa de desenvolver uma estratégia molecular de controle das pragas do algodoeiro, culminaram também com problemas de adoção de uma técnica eficiente de transformação. A tecnologia da transformação do algodoeiro *via tubo polínico* vem sendo feita no Laboratório de Interação Molecular Planta Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desde agosto de 2005 e se trata de uma ferramenta com grande potencial para a geração de plantas transgênicas de algodoeiro. A TVTP dispensa os

protocolos de cultura de tecido, o que mostra a princípio ser uma grande vantagem, uma vez que, a cultura de tecido demanda muito tempo nos protocolos de transformações de plantas, eleva o custo por planta transformada, necessita de mais infra-estrutura e o tempo para transformação também é maior.

A utilização da TVTP exigiu antes de tudo um estudo sobre a otimização da técnica para as condições ambientais de Brasília. Este estudo se deveu sobretudo devido à baixa umidade relativa do ar e elevadas temperaturas em Brasília durante o período das aplicações das microinjeções e o conhecimento de que a técnica potencializa o abortamento de maçãs no algodoeiro, que naturalmente é elevada. Sendo assim, alguns ajustes foram necessários para a aplicação da técnica de transformação via tubo polínico em nosso laboratório.

A TVTP consiste na aplicação de uma microinjeção de uma construção gênica na parte superior de uma maçã jovem, ou seja, de uma flor já fecundada de plantas de algodoeiro. No momento de utilização da TVTP a polinização já tem ocorrido com a *germinação* do grão de pólen no estigma originando o tubo polínico, o qual se desenvolve até atingir o saco embrionário e como consequência desses eventos, a fecundação. Neste estágio de desenvolvimento, apesar da fecundação ter ocorrido o que se tem são células zigóticas não divididas e sem a presença de parede celular o que facilita a integração do DNA exógeno no genoma da planta hospedeira. Esta parte do procedimento técnico é a mais delicada uma vez que lesões deixadas na maçã podem levar ao abortamento das mesmas.

A análise final do experimento foi feita quando todos os capulhos já tinham sido colhidos, as sementes deslindadas e contadas. Nesta avaliação já tinha sido aplicadas 2.390 microinjeções das 2.400 microinjeções previstas o que correspondia a 99,583 % das microinjeções programadas (**Tabela 01**). Houve a perda de uma planta, de tal modo que dez microinjeções deixaram de ser feitas, assim sendo, o experimento foi concluído com 2.390 microinjeções.

**Tabela 01: Efeito da microinjeção no abortamento de maçã de algodão. CONT, Controle, plantas que não tinha suas flores microinjetadas; SER, Agulha, maçãs submetidas apenas a perfuração com a agulha da microseringa; DNAN, DNA Noturno, maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 20 às 23:00 h; ÁGUA, maçãs microinjetadas com água no período de 20 às 23:00 h; DNAV, DNA Vaselina, maçãs que após a microinjeção tinha o orifício deixado pela agulha selado com vaselina; DNAM, DNA Matutino, maçãs microinjetadas com a**

<b>Tratamento</b>	<b>Nº de Microinj.</b>	<b>Maçãs Fixas</b>	<b>Nº de Abortos</b>	<b>Taxa de Abortamento %</b>
<b>CONT</b>	400	215	185	46,25
<b>SER</b>	400	217	183	45,75
<b>DNAN</b>	400	172	228	57,00
<b>ÁGUA</b>	390	171	219	56,13
<b>DNAV</b>	400	186	214	53,50
<b>DNAM</b>	400	135	265	66,25
<b>Total</b>	<b>2390</b>	<b>1096</b>	<b>1294</b>	<b>54,12</b>

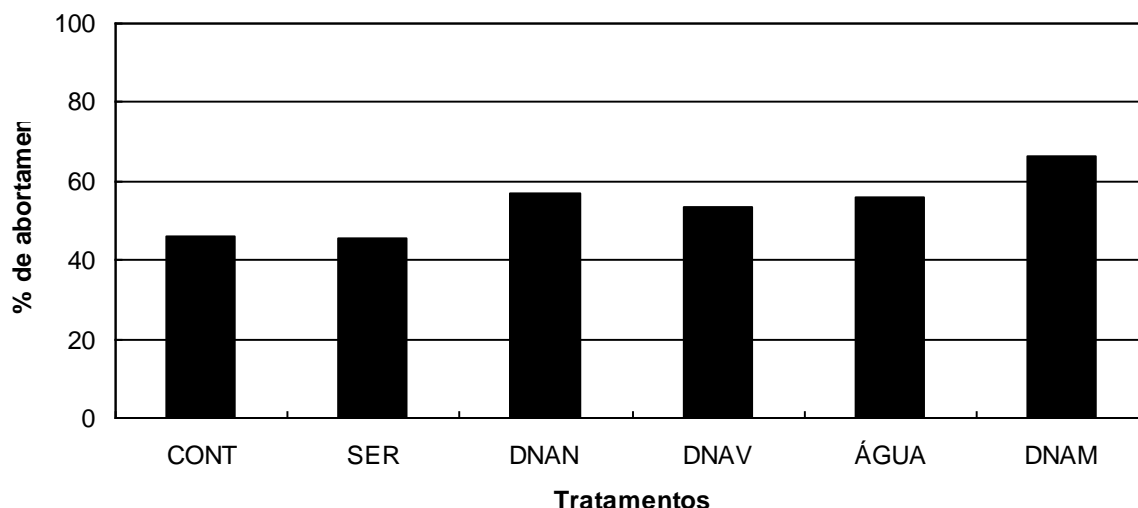
A menor taxa de abortamento observada foi no tratamento CONT com 46,25 % (**Tabela 01**). Neste tratamento as maçãs eram apenas etiquetadas e não foram submetidas à aplicação de microinjeções. O objetivo do tratamento controle foi verificar a taxa de abortamento natural no algodoeiro, nas nossas condições, durante o experimento e servir de referência para as comparações com os tratamentos utilizados no experimento e, conseqüentemente, avaliar o efeito das microinjeções no abortamento. Este tratamento foi feito no período de 19 às 21 horas.

**Tabela 02:** P-Valor, por meio do teste de Qui-Quadrado, entre os tratamentos utilizados, para a variável *taxa de abortamento*.

Tratamento	CONT	SER	DNAV	DNAN	DNAA
<b>DNAM</b>	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	0,0071	0,0088
<b>CONT</b>		0,8872	0,0403	0,0024	0,0054
<b>SER</b>			0,0284	0,0015	0,0035
<b>DNAV</b>				0,3195	0,4537
<b>DNAN</b>					0,8104

Os resultados encontrados para o tratamento Controle estão de acordo com aqueles encontrados na literatura. A quantidade de flores que geralmente surge no algodoeiro é maior do que o número de capulhos produzidos. O abortamento de botões florais e maçãs jovens é uma ocorrência natural no algodoeiro podendo chegar a 60 % (Oosterhuis e Jernstedt, 1999). Quanto mais novos são os botões florais maior é o abortamento. O abortamento é influenciado pelas condições ambientais adversas, como excesso de temperatura, estresse hídrico, problemas na fecundação, a competição por fotoassimilados, condições edafoclimáticas, manipulação, ataques de pragas e doenças. Os capulhos efetivamente responsáveis pela produção são os resultantes dos primeiros dias de floração. Cerca de 80 % das maçãs retidas resultam dos primeiros dias da floração, que podem ocorrer entre 21 e 42 dias após a semeadura (Grimes e El-Zik, 1990).

Os resultados mostram também que a influência do dano físico tem pouco ou nenhuma influência no abortamento (**Tabela 01 e Figura 10**), ou seja, o fato de introduzir a agulha da seringa na maçã, não é a causa do seu abortamento. Os resultados são corroborados quando se verifica que não existe diferença significativa entre o tratamento Controle e o tratamento SER (**Tabela 02**). Porém, os resultados não descartam que o procedimento da microinjeção deve ser feito com cuidado para evitar danos na epiderme do ovário, quando as pétalas juntamente com estigma e estames são removidas. Esses danos sim, podem levar a uma taxa de abortamento superior aqueles do orifício deixado pela microinjeção.



**Figura 10:** Taxa de abortamento de maçãs de algodão. CONT, Controle, plantas que não tinha suas flores microinjetadas; SER, Agulha, maçãs submetidas apenas a perfuração com a agulha da microseringa; DNAN, DNA Noturno, maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 20 às 23:00 h; ÁGUA, maçãs microinjetadas com água no período de 20 às 23:00 h; DNAV, DNA Vaselina, maçãs que após a microinjeção tinha o orifício deixado pela agulha selado com vaselina; DNAM, DNA Matutino, maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 08 às 11:00 horas

Os tratamentos que foram feitos no horário de 19 às 21 horas e em que se microinjetou DNA (DNAN), água (ÁGUA) e DNA seguido de vaselina selando o orifício da microinjeção (DNAV) não apresentaram diferenças significativas. O efeito da vaselina foi pouco evidenciado, ou seja, a aplicação da vaselina como meio de vedar o orifício deixado pela agulha e evitar o abortamento da maçã devido o dessecamento excessivo não foi observado. Apesar desses tratamentos não apresentarem diferenças significativas entre si, é possível afirmar com base nos resultados que quando comparados com o tratamento Controle todos os três tratamentos aumentaram a taxa de abortamento, sendo possível afirmar que a microinjeção potencializa o abortamento.

Um das causas do abortamento devido o ataque do bicudo-do-algodoeiro é o dessecamento causado pela invasão do inseto a maçã. Entretanto, o orifício deixado pela seringa não seria suficiente para causar um dessecamento na maçã que levasse a sua queda. É possível também que o efeito da vaselina pode ser eficiente no controle do abortamento para aplicações de microinjeções em períodos diurnos, entretanto, tal tratamento não foi testado nos nossos experimentos. No período diurno foram encontrados os menores valores de UR durante a realização do experimento.

No tratamento ÁGUA, em que apenas água era microinjetada nas maçãs, o abortamento foi 56,13 %, permanecendo na mesma taxa do tratamento em que foi aplicado DNAN (57,00 %) (**Tabela 01**), quando maçãs foram microinjetadas com DNA. Ambos os tratamentos foram feitos no período entre 18 e 21 horas do dia. A não existência de diferenças significativas entre os tratamentos ÁGUA, em que apenas água era microinjetada nas maçãs, e DNAN, no qual DNA era microinjetado nas maçãs, mostram que a construção gênica em si não é o fator principal para o abortamento da maçã. Esses

resultados apontam que o abortamento independe do que estava sendo microinjetado nas maçãs (**Tabela 02**).

A maior taxa de abortamento observada no experimento foi no tratamento DNAM, no qual as maçãs eram microinjetadas no período das 08 às 11 horas da manhã, com uma taxa de 66,25 % (**Tabela 01**). Este foi o único tratamento que foi feito no período matutino, em todos os outros as maçãs foram submetidas às microinjeções no período noturno (19 às 21:00 h). Esses resultados foram 20,00 % acima do abortamento natural do algodoeiro, como pode ser visto no tratamento Controle (46,25 %). Analisando as médias dos dados de umidade relativa e de temperatura no período correspondente ao experimento (dados não mostrados), pode ser visto que os menores valores de umidade relativa (45,00 %) e os maiores de temperatura (30° C) foram encontrados no período em que era aplicado o tratamento DNAM. Estes dados sugerem uma relação entre baixa umidade relativa, altas temperatura e abortamento em maçãs microinjetadas.

Segundo os dados acima poderia ser sugerido que experimentos visando à transformação de algodoeiro utilizando a TVTP fossem feitos no horário noturno onde as temperaturas são mais amenas e os valores de umidade relativa mais elevados, o que contribuiria para menores taxas de abortamento.

Durante a execução do experimento foi feita além da análise final, uma análise inicial do experimento que foi feita um mês após a aplicação da primeira microinjeção e uma intermediária feita dois meses após a aplicação da primeira microinjeção.

Na primeira análise já tinha sido aplicadas 1.558 microinjeções das 2.400 previstas o que correspondia a 64,90 % das microinjeções. A esta altura tinham sido feitas 6,49 microinjeções por planta de um total de 10 por planta que estavam previstas. Quando da análise intermediária, 2.260 microinjeções tinha sido aplicada das 2.400 previstas o que correspondia a 98,20 % das programadas, com 9,41 microinjeções por planta.

O que foi visto entre a primeira e a segunda análise é o aumento da taxa de abortamento à medida que o número de microinjeções por planta vai aumentando. De acordo com os valores apresentados seria possível sugerir que à medida que o número de microinjeções por planta aumenta também se tem um aumento nos valores de abortamento. Nestas análises, com 6,49 microinjeções por planta o abortamento era de 28,99 % enquanto que com 9,41 microinjeções por planta a taxa de abortamento era de 50,42 %. Entretanto, as conclusões gerais da primeira e da segunda análise são exatamente as mesmas encontradas no resultado final, sugerindo não haveria necessidade da realização de um experimento tão logo.

Ao final do experimento as plantas do tratamento Controle apresentaram em média 5,3 maçãs por plantas, enquanto, as do tratamento DNAN e do tratamento DNAM, 4,2 e 3,3 maçãs por planta, respectivamente. Esses resultados sugerem também que existe um número ideal de microinjeções por planta, o qual não deveria ser ultrapassado sob pena do trabalho estar sendo inútil. No nosso experimento o número ideal apontado é de 4,2 microinjeções por planta, entretanto, em caso de abortamento nessas maçãs, nova microinjeção deverá ser feita para substituir a maçã abortada.

No final do experimento ficou evidente a diferença significativa entre as taxas de abortamento entre os tratamentos em que as maçãs eram microinjetadas com DNA no período da manhã (DNAM) e com DNA no período noturno (DNAN). As diferenças entre esses tratamentos foram de 9,25 %.

Uma outra observação feita foi que o abortamento em maçãs microinjetadas levava em média 10 dias para ocorrer. Entretanto, era possível fazer a previsão do abortamento tendo em vista que nessas maçãs o ovário não desenvolvia e a maçã permanecia do mesmo tamanho do dia da microinjeção. No dia seguinte após a aplicação da microinjeção, as maçãs submetidas à microinjeção e que não abortavam, já se apresentava em franco crescimento. Assim, em trabalhos futuros de transformação de algodão via tubo polínico é possível sugerir a poda de maçã que foram submetidas a aplicação da microinjeção e não se desenvolveram no período de 10 dias. A poda tornaria o processo mais eficiente. O estabelecimento das condições ótimas para a tecnologia de microinjeções em algodão foi de fundamental importância para os experimentos futuros que visam à transformação em massa através da TVTP, uma que o nosso intuito é produzir uma planta de algodão GM expressando proteínas entomotóxicas, visando resistência contra o bicudo-do-algodoeiro e outras pragas do algodoeiro.

## **2.3 Conclusões**

1. A técnica de microinjeção que é utilizada para a transformação de algodoeiro via tubo polínico induz um aumento na taxa de abortamento natural de maçãs do algodoeiro;
2. O abortamento nas maçãs microinjetadas não é devido ao dano físico deixado pela agulha da seringa utilizada na microinjeção;
3. Não foi detectado diferenças entre as microinjeções feitas com água, que é o diluente da construção gênica, de microinjeções em que aplica DNA na maçã do algodoeiro;
4. Para as condições ambientais de Brasília as microinjeções devem ser feitas em horários noturnos, onde são encontrados valores mais elevados de umidade relativa do ar e temperaturas amenas, evitando assim níveis maiores de abortamento.
5. Sugere manter quatro maçãs microinjetadas por planta, número considerado ideal para evitar o abortamento.

## **AGRADECIMENTOS**

Fundo de Apoio à Cultura do Algodão – FACUAL.

Fundo de Incentivo a Cultura do Algodão em Goiás – FIALGO

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF

Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq



## Referências

- Deng, D. W.; Guo, S. D. and Yang, Z. M. Study on the molecular cytological mechanism of cotton transformation by pollen tube pathway. **Scientia Agricultura Sinica**, 32(6), 113-114. 1999.
- Franco, O. L., Dias, S. C., Magalhães, C. P., Monteiro, A. C. S., Bloch Jr., C., Melo, F. R., Oliveira-Neto, O. B., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sa, M. F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry** 65, 81-89. 2004.
- Gong, Z. Z., Shen, W. F., Zhou, G.Y. Techniques of foreign DNA transfer in fertilized plant: DNA entered embryo sac through pollen-tube pathway. **Scientia Sinica (B)**, 611-614. 1988.
- Grimes, D. W., El-Zik, K. M. Cotton. In: Stewart, B. A.; Nielsen, D. R. **Irrigation of agricultural crops**. Wisconsin: [s.n.], 741-773 (Série Agronomy, 30). 1990.
- Grossi-de-Sa, M. F. ; Magalhães, M. T. Q. ; Silva, M. S. ; Silva, S. M. B. ; Dias, S. C. ; Nakasu, E. Y. T. ; Brunetta, P. S. F. ; Oliveira, G. R. ; Oliveira Neto, O. B. ; Oliveira, R. S. ; Soares, L. H. B. ; Ayub, M. A. Z. ; Siqueira, H. A. ; Figueira, E. L. . Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, submetido, 1, 3-7. 2007.
- Guo, S. D., Cui, H. Z., Ni, W.C., *et al.* Development of bivalent insect-resistant transgenic cotton plants. **Scientia Agricultura Sinica**, 32(2), 1-7. 1999.
- Jia, S. R. Mechanism of T-DNA transfer. **Plant Physiol Commun**, 30(4), 306-312. 2004.
- Kim, H. J., Williams, M. Y. and Triplett, B. A. A Novel Expression Assay System for Fiber-Specific Promoters in Developing Cotton Fibers. **Plant Molecular Biology Reporter**, 20, 7-18. 2002.
- Li, Z. L. **Cotton Morphology**. Beijing: Science Press, 113-126. 1979.
- Ni, W. C., Huang, J. Q., Guo, S. D., *et al.* New germplasm of bollworm-resistant cotton derived from *Bt* gene transfer. **Jiangsu Agri Sci**, 12(1), 1-6. 1996.
- Ni, W. C., Zhang, Z., Guo, S. D. Development of transgenic insect-resistant cotton plants. **Scientia Agricultura Sinica**, 31(2), 8-13. 1998.
- Oliveira-Neto, O. B., Batista, J. A., Rigden, D. J., Fragoso, R. R., Silva, R. O., Gomes, E. A., Franco, O. L., Dias, S. C., Cordeiro, C. M., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sa, M. F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochem Mol Biol**. 34(9), 903-18. 2004b.
- Oliveira-Neto, O. B., Batista, J. A., Rigden, D. J., Franco, O. L., Fragoso, R. R., Monteiro, A. C., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sa, M. F. Molecular cloning of a cysteine proteinase

cDNA from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) **Biosci Biotechnol Biochem.** 68(6),1235-42. 2004a.

Oliveira-Neto, O. B., Batista, J. A., Rigden, D. J., Franco, O. L., Falcão, R., Fragoso, R. R., Mello, L. V., dos Santos, R. C., Grossi-de-Sa, M. F. Molecular cloning of alpha-amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. **J Protein Chem.** 22(1), 77-87. 2003.

Oosterhuis, D. M., Jernstedt, J. Morphology and Anatomy of the Cotton Plant. In: Smith, C. W., Cothren, J.T. eds. **Cotton: Origin, History, Technology, and Production**, New York. 175-206. 1999.

Quintanilha, A., D´Eça, L. S., Cabral, A. Desenvolvimento do botão floral do algodoeiro em função do tempo. **Boletim da Sociedade Broteriana**, 36(2), 189-215. 1962.

Rajasekaran K., Grula J. W. and Hudspeth R. L. Herbicideresistant Acala and Coker cottons transformation with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase. **Mol. Breeding**, 2, 307-319. 1996.

Silva, S. M. B., Silva-Werneck, J. O., Falcão, R., Gomes, A. C., Fragoso, R. R., Magalhães, M. T. Q., Oliveira-Neto, O. B., Aguiar, J. B., Grossi-de-Sa, M. F., Bravo, A., Monnerat, R. G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **J. Appl. Ent.** 128, 102-107. 2004.

Ul-Haq, I. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via vacuum infiltration. **Plant Molecular Biology Reporter**, 22, 279–288. 2004.

Yuceer, S. U., Koc, N. K. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, 53(3), 413-417. 2006.

Zhou, G., Wang, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., Liu, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Meth. in Enzymol.** 101, 433-448. 1983.