

**RAQUEL SAMPAIO DE OLIVEIRA**

**OTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE TRANSFORMAÇÃO  
GENÉTICA VIA TUBO POLÍNICO EM VARIEDADE BRASILEIRA DE  
ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

**Orientadora:** Dra. Maria Fátima Grossi de Sa  
**Co-orientador:** Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto

**Brasília  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

O48o	<p>Oliveira, Raquel Sampaio de. Otimização e utilização de técnica de transformação genética via tubo polínico em variedade brasileira de algodoeiro / Raquel Sampaio de Oliveira. – 2007. 137 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2007. Orientação: Maria Fátima Grossi de Sá Co-orientação: Osmundo Brilhante de Oliveira Neto</p> <p>1. Gossypum hirsutum. 2. Anthonomus grandis. 3. Spodoptera frugiperda I. Sá, Maria Fátima Grossi de, orientador. II. Oliveira Neto, Osmundo Brilhante de III. Título.</p> <p>CDU 582.685.2</p>
------	--

Ficha elaborada pela Coordenação de Processamento do Acervo do SIBI – UCB.

27/05/2009

Dissertação de autoria de Raquel Sampaio de Oliveira, intitulada “OTIMIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA TUBO POLÍNICO EM VARIEDADE BRASILEIRA DE ALGODOEIRO”, requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada, em 29 de novembro de 2007, pela banca examinadora constituída por:

---

Dra. Maria Fátima Grossi de Sa  
Orientadora

---

Dr. Osmundo Brilhante de Oliveira Neto  
Co-Orientador

---

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

---

Dr. Eduardo Romano de Campos Pinto

Brasília  
2007

À minha família pelo amor, força, incentivo e  
confiança em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sa que me ofereceu a oportunidade de fazer parte da equipe do seu laboratório, acreditando em mim e no meu trabalho. Seu apoio ao meu ingresso no mestrado, suas observações, sugestões e “puxões de orelha”, foram fundamentais para que eu “mandasse brasa” e seguisse em frente;

Agradeço ao Dr. Osmundo Brillhante, co-orientador dessa dissertação, por me ensinar o “caminho das pedras” com muito carinho, competência, amizade e paciência ao longo de mais de dois anos de trabalho. Fique certo de que adorei cada momento dessa jornada aprendi muito com você e que sempre vou lembrar da sua ajuda!

À Dra. Liziane Lima, pelas observações ao preparar minha qualificação, me ajudando a “enxergar” certos pontos relevantes, pelo carinho e pelo “ombro amigo” em um dos momentos mais difíceis que passei;

À profa. Carla Araújo, pelos ensinamentos durante o tempo que a acompanhei como “*teacher assistant*” nas aulas de parasitologia;

Ao prof. Eduardo Leonardecz pela ajuda nas análises estatísticas;

Ao Márcio Diógenes, tão longe, mas tão perto. Melhor amigo de todas as fases, de tantos anos, que me viu crescer, compartilhando diversas emoções, que me agüentou durante todo esse tempo e que nem a distância de 862 km consegue separar;

Ao Itayguara Ribeiro, o “Ursinho Gummy Bronquinha” mais querido e grande incentivador dessa empreitada ao mestrado;

À Keline Lisboa, outra culpada por eu ter vindo parar aqui;

À Nathalie Ommundsen, uma amiga especial, iluminada, alegre, descontraída e “alto astral”. Obrigada pelo incentivo, pela força e amizade, pelas nossas “conversas da meia noite” compartilhando minhas dúvidas, angústias, alegrias e conquistas;

À Cristina Rafaela, minha primeira amiga brasiliense. Obrigada por todos os momentos agradáveis que passamos, pelos conselhos, pelas tentativas de praticar Yoga, Tai Chi Chuan e tantas outras coisas;

À Mariana Quezado (Mari), essa amiga do coração que aprendi a admirar a cada dia. Por todo carinho, amizade, paciência, conselhos, pelas histórias vividas e registradas, por toda ajuda prestada nos momentos mais variados e que, inúmeras vezes, me levou para o aconchego do seu lar para não me deixar só;

Aproveitando o “embalo”, agradeço também à família Quezado por ter me acolhido tantas vezes e por me fazer sentir como parte da família;

À Karla Moreira (Karlinha), outra grande amiga do coração, pelo carinho, amizade, apoio e conselho em diversas situações e também pelos momentos de descontração;

À Morgana Bruno, que apesar de nos conhecermos durante a graduação lá no Ceará, somente aqui em Brasília eu a conheci de verdade e com o pouco tempo de convivência ela se tornou uma amiga daquelas que chegam e ficam;

Ao meu “ex-vizinho” e amigo Gustavo Gomes, por todos os bons momentos que passamos e por toda ajuda que me deu. Pelas nossas sempre agradáveis e divertidas saídas para “treinar” nosso inglês ruim, tomar café e dançar. Nunca tive com ninguém uma afinidade “de cara” como tive com ele. Uma amizade que veio ao acaso, mas que vai durar a vida inteira;

Aos amigos Rejane Rabelo (Rej), Viviane Pinho (Prima), Márcio Lima (Zé), Elaine Faria (Maninha), Magda Martins (Boto), Marcelo Diógenes (Sereia Malandrinha), Luciane “vírgula” Mourão (Lu Tamanquinho), Marcela Samorano (Marcelinha), Amilton César (Bite), Juliana Brasil (Menina Ju), Juliana Panini (xuxu), Christiano Verola (Ursinho Gummy), e Marciano Rubini (o “parcero”) que sempre me apoiaram, acreditaram em mim, pelos sempre bons momentos e boas risadas compartilhadas;

Aos meninos e meninas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, pelo carinho, atenção, amizade e à nem sempre agradável convivência no dia-a-dia: Poliene, Isabela “Fragosa”, Rodrigo Fragoso, as duas Alines (Alininha e Alinona), Simoni, Thales, Janaina, César, Marise, Ariane, Aulus, Firmino, Everton, Caroline, Leonardo, Juliana, Vanessa, Magda, Fábio, Gustavo, Hudson, Relinda,IVALDO, Jorge, Arnúbio, Kilvia, Rafael, Charles, Maíra, Lecir, Sineide. À poderosa “*ultra plus advanced*” Fernanda. Também foi ótimo trabalhar e compartilhar bons momentos com aqueles que já “bateram asas” e se encontram ou não em outros laboratórios: Priscila, Ísis, Felipe, Fabíola, Maria, Norma e Edinho. Vocês são realmente uma “galera” muito especial e querida!

Ao “grupo do algodão”: Paulo Henrique, Isabela “da Índia”, Dra. Cristina, Anne Winne, Vivian, Angelina (“Jolie”) por toda ajuda prestada;

A todos que, de alguma forma, me ajudaram e contribuíram para que eu atingisse mais essa etapa, agradeço;

À minha família, com gratidão e amor, que, apesar da distância, estiveram sempre presentes dando apoio e estímulo para que eu continuasse minha caminhada;

E por último, mas nunca o último, agradeço a Deus por ter guiado meu caminho por linhas bem tortas que me fez aprender que nunca devo parar de confiar em Ti.

**Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:**

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de aprendizado e pela concessão de bolsa durante o mestrado.

À Universidade Católica de Brasília pela possibilidade de realizar o mestrado.

Ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, pela oportunidade de realizar toda a parte experimental do presente trabalho.

Ao Fundo de Apoio à Cultura do Algodão – FACUAL;

Ao Fundo de Incentivo a Cultura do Algodão em Goiás – FIALGO;

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAPDF.



“Se todos aqueles cujos experimentos  
malograram deixassem de fazer ciência,  
não teríamos ciência”  
Allan Wilson

## RESUMO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é a principal fonte para a produção de fibras têxteis, propiciando a obtenção de produtos de relevância na economia brasileira e mundial. No entanto, esta cultura é suscetível ao ataque de insetos-praga como *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*, *Alabama argillacea*, entre outros. Em geral, o controle destas pragas requer o uso acentuado de pesticidas químicos, os quais causam consideráveis riscos à saúde humana, ao meio ambiente e a organismos não-alvo, além de casos comprovados de desenvolvimento de resistência e elevados custos. Uma alternativa viável é o uso de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando proteínas tóxicas a insetos-alvo. Atualmente, as metodologias disponíveis para a transformação de plantas de algodão são baseadas na utilização das técnicas de biobalística, *Agrobacterium tumefaciens* e eletroporação. No entanto, estes métodos são limitados a algumas variedades, apresentando baixa eficiência e pouca repetibilidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar e utilizar um método alternativo de inserção de genes codificando proteínas tóxicas ao *A. grandis* e à *S. frugiperda*, utilizando a técnica de transformação via tubo polínico. Para tanto, plantas de algodão da variedade brasileira BRS Cedro foram cultivadas em casa de vegetação. Duas construções foram utilizadas no processo de transformação, uma contendo o gene *CryIIa12*, codificando a proteína CryIIa12, e outra contendo dois genes, um codificando uma manose lectina (*tarina*) e outro um inibidor de proteinase serínica (*btcI*). Para as duas construções foi utilizado o gene repórter *nptII*. Os experimentos de transformação via tubo polínico foram realizados logo após a polinização e fecundação, quando as flores apresentam coloração roxa. Aliquotas de 1 µg (V = 10 µL) de DNA plasmidial contendo as construções, foram microinjetadas na porção superior de capulhos jovens. Comparações entre taxas de abortamento de plantas não-microinjetadas e microinjetadas em diferentes horários com DNA ou água foram realizadas. Adicionalmente, foram feitos tratamentos selando com vaselina botões florais microinjetados. A taxa de abortamento destes tratamentos foi comparada entre eles e com botões florais apenas perfurados pela microseringa. Não foram encontradas diferenças estatísticas relevantes entre as taxas de abortamento nos tratamentos. Provavelmente, a principal razão para a queda de capulhos esteja mais relacionada à baixa umidade e altas temperaturas do que pela microinjeção. Os capulhos não abortados foram coletados para retirada das sementes. Destas, foram geradas 28.558 plântulas, com cerca de 83 % de sucesso na taxa de germinação. As plântulas foram desafiadas contra canamicina e somente 63 apresentaram resistência. Doze foram positivas em análises por “*polymerase chain reaction*” (PCR) e “*enzyme-linked immuno-sorbent assay*” (ELISA). Neste trabalho foi demonstrada a viabilidade de uma técnica alternativa para a transformação de uma variedade brasileira de algodão.

**Palavras-chave:** *Gossypium hirsutum*, *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*, transformação via tubo polínico, microinjeção, BTCl, tarina, Cry1Ia12, *nptII*.

## ABSTRACT

The cotton plant (*Gossypium hirsutum*) is the main source for the textile fiber production, propitiating the attainment of relevant products in the Brazilian and world-wide economy. However, this culture is susceptible to insect-pests attack, such as *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*, *Alabama argillacea*, among others. In general, the control of these plagues requires a heavy chemical pesticide use, which causes considerable risks to the human health, environment and non-target organisms, beyond proven cases of resistance development and high costs. A viable alternative is the use of genetically modified plants (GM) expressing toxic proteins to target insects. Currently, the available methodologies for cotton transformation are based on the use of biolistic, *Agrobacterium tumefaciens* and electroporation. Nonetheless, these methods are limited to some varieties, presenting low efficiency and repeatability. Thus, the aim of this work was to optimize and use an alternative method for insertion of genes codifying toxic proteins to *A. grandis* and *S. frugiperda*, using the pollen-tube pathway transformation technique. Then, cotton plants of the Brazilian variety BRS Cedar were cultivated in greenhouses. Two constructions were used in the transformation process, one containing the *CryIIa12* gene, codifying the CryIIa12 protein, and another containing two genes, one codifying a mannose lectin (*tarin*) and another one a serine proteinase inhibitor (*btcI*). The *nptIII* gene was used as a reporter in both constructions. The experiments using the pollen-tube pathway transformation technique were carried after pollination and fertilization, when the flowers present purple petals. Aliquot of 1 µg (V = 10 µL) of plasmidial DNA containing the constructions, were microinjected in the superior portion of young bolls. Comparisons between abortion rates of non-microinjected and microinjected plants at different treatments with DNA or water were carried through. Additionally, treatments were made closing with Vaseline the microinjected floral buds. The average abortion rate of these treatments was compared between them and with floral buds only pierced by the micro syringe. No significant statistical differences between the abortion rates in the treatments were observed. Probably, the main reason for the abscission of young bolls is more related to low humidity and high temperatures than the microinjection. The non-aborted bolls were removed and their seeds collected. From that, 28,558 plantlets were generated, with about 83 % of germination success. Plantlets were challenged against kanamycin and only 63 exhibited resistance. According to polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA), twelve plantlets were positive. In this work, the viability of an alternative technique for the transformation of a Brazilian cotton variety was demonstrated.

**Keywords:** *Gossypium hirsutum*, *Anthonomus grandis*, *Spodoptera frugiperda*, pollen tube pathway transformation, microinjection, BTCl, tarin, CryIIa12, *nptII*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
1 Adoção do algodoeiro geneticamente modificado no mundo, em milhões de hectares .....	18
2 Esquema geral da ocorrência de pragas na cultura do algodoeiro .....	23
3 Insetos adultos de bicudo-do-algodoeiro .....	24
4 Corte longitudinal de uma flor de algodoeiro .....	37
5 Desenho esquemático do ovário .....	38
6 Estágios fenológicos do algodoeiro .....	40
7 Diferentes estádios apresentados pela flor do algodoeiro .....	41
8 Desenho esquemático de um grão de pólen sobre o estigma .....	41
9 Desenho esquemático do processo de fertilização da flor do algodoeiro .....	42
10 Construção com os genes <i>btc1</i> e <i>tar</i> .....	50
11 Construção com o gene <i>cryIIa12</i> .....	51
12 Preparação da maçã para a microinjeção .....	52
13 Aplicação da microinjeção .....	52
14 Taxa de abortamento de maçãs de algodão .....	59
15 Análise por PCR de plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene <i>btc1</i> + <i>tar</i> .....	64
16 Análise por PCR de plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene <i>cryIIa12</i> .....	65
17 Análise por ELISA de plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene <i>btc1</i> + <i>tar</i> .	66
18 Análise por ELISA de plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene <i>cryIIa12</i> .	66
19 Plântulas de algodão provenientes da TVTP.....	69

**LISTA DE TABELAS**

	Página
1 Lista dos principais tipos de algodão GM comercializados no mundo .....	21
2 Efeito da microinjeção no abortamento de maçã de algodão .....	58
3 P-Valor, por meio do teste de Qui-Quadrado, entre os tratamentos .....	60
4 Potenciais transformantes de algodão BRS Cedro.....	64

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>SUMÁRIO</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>0</b>	
1.1 Cultivo de Plantas GM no mundo .....	20
1.2 Perspectivas do Algodoeiro GM no Brasil .....	20
1.3 Pragas do Algodoeiro .....	22
1.4 Lectinas e Inibidores de Proteinases em Plantas .....	25
1.4.1 Lectinas .....	25
1.4.1.1 O Gene <i>tar1</i> de Inhame .....	27
1.4.2 Inibidores de Proteinases .....	28
1.4.2.1 Inibidores Proteinases Serínicas .....	29
1.5 Proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	31
1.6 Transformação Genética de Algodoeiro .....	34
1.7 Transformação de Algodoeiro Via Tubo Polínico .....	36
1.7.1 Estrutura Reprodutiva do Algodoeiro .....	36
1.7.2 Desenvolvimento do Botão Floral e do Embrião em Função do Tempo .....	38
1.7.3 Processo de Floração e Fecundação do Algodoeiro .....	40
1.7.4 Mecanismo de TVTP .....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	44
<b>0</b>	
2.1 Objetivos específicos .....	44
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>0</b>	
3.1 Materiais .....	45
3.1.1 Soluções e tampões .....	45
3.1.2 Meios de cultura .....	46

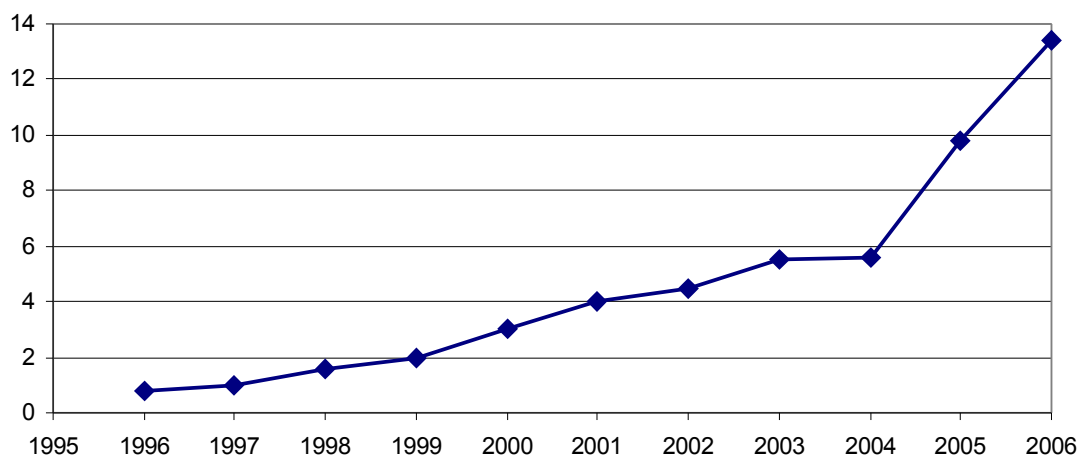


3.1.3	Antibióticos .....	47
3.1.4	Plasmídeos .....	47
3.1.5	Reagentes .....	47
3.2	Metodologias .....	48
3.2.1	Material vegetal .....	48
3.2.2	Desenho experimental .....	48
3.2.3	Construção gênica utilizada .....	49
3.2.3.1	Construção com os genes <i>btc1</i> e <i>tar1</i> .....	49
3.2.3.2	Construção com o gene <i>cry</i> .....	50
3.2.4	Aplicação das microinjeções .....	51
3.2.5	Análises e seleção dos transformantes .....	53
3.2.5.	Seleção com Canamicina .....	53
1		
3.2.5.	Análise por PCR .....	53
2		
3.2.5.2.1	Extração de DNA .....	53
3.2.5.2.2	PCR .....	54
3.2.5.	Análise por ELISA .....	55
3		
3.2.5.3.1	Extração das proteínas totais .....	55
3.2.5.3.2	ELISA .....	56
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>0</b>		
4.1	Otimização da técnica de tvtp em plantas de algodoeiro cv. Cedro .....	57
4.2	Transformação de plantas de algodoeiro cv Cedro via tubo polínico .....	63
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>0</b>		
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>69</b>
<b>0</b>		
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>0</b>		
<b>8.</b>	<b>PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>0</b>		
<b>1</b>	Transformação de algodoeiro via tubo polínico: otimização e perspectivas de aplicação .....	84
<b>2</b>	Susceptibility of <i>Anthonomus grandis</i> (Cotton Boll Weevil) and <i>Spodoptera frugiperda</i> (Fall Armyworm) to a CryIIa-type Toxin from a Brazilian <i>Bacillus thuringiensis</i> Strain .....	101

<b>3</b>	<b>Pollen-tube pathway transformation: Optimization for Brazilian cotton cultivar .....</b>	<b>110</b>
----------	---	------------

## 1.0 INTRODUÇÃO

Atualmente, 22 países no mundo utilizam culturas transgênicas, sendo desse total, 11 países desenvolvidos e 11 países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, ultrapassando os 100 milhões de hectares em 2006 e com previsões de 200 milhões de hectares para 2015. A boa aceitação de algodão geneticamente modificado (GM) pelos produtores e o atual estado de expansão desse nicho no mercado internacional é evidente quando se avalia o aumento da área mundial total onde algodões GM são cultivados. Em 1996 essa área era de aproximadamente 900 mil hectares, alcançando a marca de 13,4 milhões em 2006, numa cinética de crescimento exponencial que aparenta estar longe da estabilização (JAMES, 2004, 2005, 2006) (Figura 1). Basicamente, quando uma variedade resistente a lagartas é utilizada, o número de aplicações de inseticidas exclusivos para o controle dessa praga deve diminuir, causando assim uma potencial diminuição dos custos finais de produção.



**Figura 1.** Adoção do algodoeiro geneticamente modificado no mundo, em milhões de hectares, mostrando um crescimento de 900 mil hectares em 1996 para 13,4 milhões hectares em 2006. Fonte: JAMES, 2006.

Atualmente, o Cerrado brasileiro participa com 64,6 % da produção de algodão, sendo o estado de Mato Grosso o maior produtor brasileiro, seguido por Bahia e Goiás (CONAB, 2006). A produção de algodão em 2006/ 2007 é de 2,2 milhões de toneladas, superior em 32,9 %, (554,7 mil toneladas) à da safra anterior. Estimativas da CONAB para 2007 apontam que o Centro-Oeste, participando com 64,6 % da produção nacional, terá um incremento de 45,3 % (737,4 mil toneladas), o Mato Grosso com 47,0 % (619,3 mil toneladas), o Mato Grosso do Sul com 46,2 %, (49,9 mil toneladas), e o estado de Goiás com 38,4 %, (74,3 mil toneladas).

O algodão tem um importante papel na geração de divisas do país devido ser uma *commodity* internacional e um importante papel que também deve ser destacado no desenvolvimento social com a abertura de novos postos de trabalho de forma direta. Estando entre as dez principais culturas agrícolas do Brasil, a cotonicultura nacional atravessou grandes dificuldades na década de 80. Entre estas dificuldades, pode se destacar a entrada no país do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), que praticamente dizimou a cotonicultura brasileira e ainda hoje é responsável por sérios prejuízos à cultura.

As características marcantes que assume hoje o tipo de produção do algodão no cerrado são: módulos de estrutura produtiva em grandes áreas planas, alta tecnologia aplicada, alto grau de mecanização, produtores com perfil empresarial, ação direta das instituições de pesquisa e excelente clima para o desenvolvimento da cultura, com boa incidência solar, temperaturas adequadas e regime pluviométrico bem definido. Todos esses fatores são imprescindíveis para a produção de pluma com qualidade.

O bicudo-do-algodoeiro vem causando severos danos aos produtores de algodão do cerrado. A expansão do bicudo no Cerrado é marcante em alguns locais como em Goiás, Minas Gerais, Bahia e algumas áreas de Mato Grosso, causando enormes prejuízos. A fase larval deste inseto é endofítica, portanto não é passível de ser controlada por biopesticidas ou por métodos convencionais. Na fase adulta, este inseto se alimenta dos botões florais e das maçãs, onde deposita seus ovos. Na época da colheita do algodão, o bicudo se abriga em refúgios localizados nas matas auxiliares ou nas soqueiras aguardando o novo plantio. Ou seja, é uma praga de difícil controle.

Desde a introdução do bicudo no Brasil e particularmente no Nordeste, estudos têm sido conduzidos visando gerar tecnologias que sejam econômica e ecologicamente viáveis para serem utilizadas no seu controle. Entretanto, a maioria dos esforços realizados até hoje tem se concentrado no aspecto agrônomo: manejo integrado de pragas, melhoramento clássico visando o desenvolvimento de cultivares de ciclo curto e maturação rápida, desenvolvimento de armadilhas e apresentação de novos inseticidas (BELTRÃO, 1999). Estes esforços têm sido de grande valia, mas o bicudo ainda se mantém como o inseto-praga que mais causa prejuízo à cultura do algodão no Brasil.

Do ponto de vista da biologia molecular muito pouco tem sido feito visando o controle do bicudo do algodoeiro no Brasil. O foco principal das pesquisas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é a de utilizar genes para proteínas entomotóxicas visando obter plantas de algodão GM resistentes às principais insetos-praga da cultura.

## 1.1 Cultivo de Plantas GM no mundo

A área global oficialmente cultivada com plantas transgênicas em 2006 foi de 102 milhões de hectares. Este cultivo foi conduzido por 10,3 milhões de agricultores, em 22 países, marcando o décimo aniversário de comercialização das chamadas lavouras biotecnológicas. Dos 10,3 milhões, 90 % eram pequenos agricultores, de países em desenvolvimento. A maioria cultivando algodão Bt na China e Índia. A porcentagem de adoção global das culturas biotecnológicas aumentou 60 vezes entre 1996 e 2006, tornando-a a tecnologia agrícola mais rapidamente adotada nos últimos anos (JAMES, 2006).

## 1.2 Perspectivas do Algodoeiro GM no Brasil

A área global plantada com algodão geneticamente modificado alcançou 13,4 milhões de hectares em 2006. O cultivo do algodão transgênico aumentou de 2 % em 1996 para 28 % em 2005. No momento, existem 18 tipos de algodão geneticamente modificados que receberam aprovação regulatória em pelo menos um país. Todos os 18 eventos de algodões geneticamente modificados estão relacionados com as transformações genéticas feitas para fornecer resistência a insetos utilizando o sistema *Bacillus thuringiensis* (Bt) e tolerância a herbicida (glifosinato ou glufosinato) ou as duas características combinadas em uma mesma planta (Tabela 01) (JAMES, 2006; AGBIOS GM DATABASE, 2007).

Estudos baseados na mensuração do impacto econômico do algodão transgênico apresentaram resultados positivos significativos na média dos rendimentos e na performance econômica de produtores de algodão. A vantagem econômica agregada ao algodão resistente a inseto e tolerante a herbicida no Brasil foi estimada em 284 U\$ por hectare. O custo da semente de algodão transgênico resistente a inseto (Bt) no Brasil terá uma taxa tecnológica estimada de 35 a 40 U\$ por hectare. A taxa tecnológica para o algodão transgênico tolerante a herbicida ainda não foi estimada (NCB, 2004).

**Tabela 01.** Lista dos principais tipos de algodão GM comercializados no mundo (AGBIOS GM DATABASE, 2007).

<b>Evento</b>	<b>Gene</b>	<b>Característica</b>	<b>Companhia</b>	<b>Ano comercialização</b>
BXN	<i>bxn</i>	Tolerância a herbicida	Calgene Inc.	1994
Bollgard®	<i>cry1Ac</i>	Resistência a insetos	Monsanto	1996
RoundUp Ready®	<i>CP4 epsps</i>	Tolerância a herbicida (fase vegetativa)	Monsanto	1996
19-51A	<i>ALS</i>	Tolerância a herbicida	DuPont Canadá Agrigultural Products	1996
BtCpTi cotton	<i>cry1Ac/cry1Ab + cpti</i>	Resistência a insetos	Setor Público da China	1997
31807/31808	<i>cry1Ac + bxn</i>	Resistência a insetos; tolerância a herbicida	Calgene Inc.	1998
Bollgard II®	<i>cry1Ac + cry2Ab</i>	Resistência a insetos	Monsanto	2003
VipCot	<i>vip3A</i>	Resistência a insetos	Syngenta	2004
281-24-236	<i>cry1F</i>	Resistência a insetos	Dow AgroSciences LLC	2004
3006-210-23	<i>cry1Ac</i>	Resistência a insetos	Dow AgroSciences LLC	2004
LL Cotton 25	<i>bar</i>	Tolerância a herbicida	Bayer CropScience	2004
WideStrike™	<i>cry1Ac + cry1F</i>	Resistência a insetos	Dow AgroSciences	2005
RoundUp Ready® Flex	<i>CP4 epsps</i>	Tolerância a herbicida	Monsanto	2005
LibertyLink	<i>bar</i>	Tolerância a herbicida	Bayer CropScience	2005
COT 102	<i>vip3A</i>	Resistência a insetos	Syngenta Seeds, Inc.	2005
LL Cotton 25 x MON15985	<i>bar + cry1Ac + cry2Ab</i>	Resistência a insetos e tolerância a herbicida	Bayer CropScience	2007

A adoção, em larga escala do algodão GM na China reduziu o uso de pesticidas e causou uma diminuição substancial no índice de envenenamento de agricultores por defensivos agrícolas (JAMES, 2004, 2006; HILBECK et al, 2006). Produtores que adotaram as variedades do algodão transgênico foram capazes de alcançar controle efetivo de insetos pragas e ervas daninhas, com número reduzido de aplicações de inseticida e herbicida. O algodão transgênico, também, proporcionou aos agricultores flexibilidade e simplicidade na execução dos tratamentos químicos. A vantagem, de facilitar e diminuir a necessidade de pulverizações constantes durante o ciclo da cultura tem sido considerado pelos agricultores como um fator importante e positivo na rápida adoção desta tecnologia. Outra importante vantagem do algodão resistente a inseto é o fato de que oferece aos produtores a certeza do controle sobre um vasto leque de condições de cultivo.

O cultivo convencional de algodão depende fortemente da utilização de defensivos químicos para controlar insetos-praga. É estimado que a produção de algodão consuma cerca de 25 % dos defensivos agrícolas utilizados em todo o mundo, dentre os quais se incluem alguns dos mais tóxicos existentes. A redução acumulada no uso de defensivos agrícolas para a década de 1996 a 2005, resultante do cultivo das lavouras GM, foi estimada em 224.300 toneladas de ingredientes ativos.

O Brasil, maior exportador agrícola da América do Sul, tem se envolvido internamente, nos últimos dez anos, em discussão polarizada, cheia de retórica e desinformação a respeito de aspectos complexos associados a questões econômicas, pesquisas científicas, biossegurança, cultivo e comercialização de plantas transgênicas. Até agora, o cultivo de plantas transgênicas tem resultado em grandes benefícios econômicos e ambientais. Em todos os países onde as plantas transgênicas foram cultivadas, não houve nenhum relato de qualquer dano à saúde humana animal ou ao meio ambiente (JAMES, 2004, 2006).

### 1.3 Pragas do Algodoeiro

As plantas de algodoeiro (*G. hirsutum*) possuem numerosas glândulas, denominadas nectários, que produzem uma secreção líquido-resinosa açucarada, que faz com que sua cultura seja uma das mais atrativas aos insetos. Os danos provocados por cada um deles podem variar de uma região para outra, e seu controle pode chegar a até 25 % do custo da produção.

Entre os insetos fitófagos associados ao algodoeiro (Figura 2), destacam-se como pragas importantes o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843 - Coleoptera: Curculionidae), o Curuquerê (*Alabama argilacea* Hueb., 1818 - Lepidoptera: Noctuidae), a Lagarta da maçã (*Heliothis virescens* Fabr., 1781 - Lepidoptera: Noctuidae), a Lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella* Saund, 1844 - Lepidoptera - Gelechiidae) e a Lagarta militar (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 - Lepidoptera: Noctuidae) (GALLO, 2002).

Semeadura	Geminção				Primeira Flor	Maçãs				Capulhos				Colheita
	0	20	40	60		80	100	120	130	140	160	180		
	Pulgão													
	Tripes e Lagarta-Rosca													
	Broca e Percevejo-Castanho													
					Ácaros									
					Bicudo-do-Algodoeiro									
					Lagarta-da-Maçã									
					Curuquerê									
					Lagarta-Rosada									
					Percevejo-Rajado				Percevejo-Manchador					

**Figura 2.** Esquema geral da ocorrência de pragas na cultura do algodoeiro. Tendência do surgimento das pragas durante o ciclo do algodão e a época mais provável de ocorrência desses ataques (Fonte: PAPA, G., 2006 – adaptado de GALLO, 2002).

O bicudo-do-algodoeiro (Figura 3) é considerado uma das pragas mais sérias da cotonicultura pelos danos que causa e pelas dificuldades do seu controle. Este inseto-praga tem ampla distribuição em regiões tropicais e temperadas quentes, e é a principal praga da cotonicultura. Sua detecção no Brasil deu-se pela primeira vez, em fevereiro de 1983, na região de Campinas, SP. A rápida disseminação do bicudo, abrangência e danos nas áreas cotonicultoras do Brasil, indicaram sua grande capacidade de adaptação a novos ambientes que, reforçado pôr suas características biológicas e comportamentais favoráveis, tornou-se a praga-chave da cultura do algodoeiro no país.

Desde a introdução do bicudo no Brasil, e particularmente no Nordeste, estudos têm sido conduzidos visando gerar tecnologias que sejam econômica e ecologicamente viáveis para serem utilizadas no seu controle. Entretanto, a maioria dos esforços realizados até hoje tem se concentrado no aspecto agrônômico como o Manejo Integrado de Pragas, o melhoramento clássico visando o desenvolvimento de cultivares de ciclo curto e maturação rápida, o desenvolvimento de armadilhas, e apresentação de novos inseticidas, etc. Estes esforços tem sido de grande valia, entretanto, o bicudo ainda se mantém como o inseto-praga que mais causa prejuízo à cultura de algodão no Brasil.

A fase larval deste inseto é endofítica, portanto não é passível de ser controlada por biopesticidas ou por métodos convencionais. Na fase adulta, este inseto se alimenta dos botões florais e das maçãs, onde deposita seus ovos. Na época da colheita do algodão, o



bicudo se abriga em refúgios localizados nas matas auxiliares ou nas soqueiras aguardando o novo plantio.



**Figura 3.** Insetos adultos de bicudo-do-algodoeiro. Fotos: Oliveira, R. S. 2007

A lagarta militar, também chamada de lagarta do cartucho do milho, se alimenta das folhas no seu estágio mais jovem, e então penetra nas maçãs e nos botões florais, causando grande destruição e dificultando o seu controle (NAKANO et al, 1992).

A principal forma de controle destes insetos tem sido feita pela utilização de produtos químicos, cuja aplicação exige um grande investimento, onerando ou mesmo inviabilizando em alguns casos a produção. Esses agrotóxicos, além de caros, causam danos ao meio ambiente e geram riscos de intoxicação ao homem.

A importância do controle de pragas do algodoeiro e o aumento da consciência da população para os efeitos diretos e indiretos dos pesticidas na saúde pública e no ambiente em geral, tem demandado novas formas de controle de pragas, que sejam mais econômicas e menos danosas ao ecossistema. Dessa forma, o desenvolvimento de novos produtos e cultivares de plantas GM com resistência a pragas e/ou doenças são alternativas de controle que podem ser mais eficazes, além de evitar danos ao meio ambiente. A identificação de fatores com atividade sobre essas pragas tais como toxinas Cry de Bt, inibidores de proteinases intestinais e outras enzimas potencialmente tóxicas contra inseto são estratégias que vem sendo cada vez mais utilizadas no desenvolvimento de variedades de plantas resistentes.

## 1.4 Lectinas e Inibidores de Proteinases em Plantas

Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos para se defenderem do ataque de parasitas e predadores, alguns dos quais se baseiam em adaptações morfológicas (como espinhos), em barreiras físicas (como revestimentos de sementes) ou no acúmulo de produtos de baixa massa molecular, tais como, alcalóides, glicosídeos e antibióticos (HILDER et al, 1989). Outro mecanismo de defesa baseia-se no acúmulo de proteínas em sementes e órgãos vegetativos de reserva, que os tornem tóxicos, impalatáveis ou indigestos (PEUMANS; VAN DAMME, 1996). Há vários exemplos destas proteínas tóxicas, como proteínas inativadoras de ribossomos (RIP), proteínas antifúngicas, proteínas que se ligam a carboidratos (lectinas) e inibidores de protease, entre outros (PEUMANS; VAN DAMME, 1996).

### 1.4.1 Lectinas

A primeira descrição do efeito de uma proteína capaz de se ligar a carboidratos foi realizada em 1888 por Stillmark (VAN DAMME et al., 1994). Neste trabalho, foi observada aglutinação de hemácias por um extrato de rícino (*Ricinus communis*), que era conhecido por sua elevada toxicidade, e a substância responsável por este efeito foi denominada ricina (LIENER, 1991). Em 1981, Hellin relatou a hemaglutinação causada por extrato de *jequirity beans* (*Abrus precatorius*) e denominou abrina a substância responsável pelo fenômeno (LIENER, 1991). A descoberta destas duas hemaglutininas (ricina e abrina) inspirou os trabalhos do bacteriologista alemão Paul Ehrlich, que levaram ao desenvolvimento de alguns dos princípios fundamentais da imunologia, como o fato de que animais podem desenvolver imunidade a estas substâncias tóxicas quando inoculados com as mesmas e que os anticorpos responsáveis por esta imunidade são específicos contra a toxina inoculada (LIENER, 1991).

Embora o papel biológico da maioria das lectinas não seja ainda claro, é provável que a maioria delas exerça mais de uma função na planta, podendo participar de interações: entre moléculas; moléculas e células; e células (VAN DAMME et al., 1995). Uma função das

lectinas seria na defesa contra diferentes organismos que se alimentam de plantas, havendo várias evidências indiretas que corroboram com esta hipótese (JANSEN, 1981). Uma das evidências indiretas relaciona-se com o fato de que, apesar de várias lectinas serem capazes de se ligarem a glicídios simples como glicose, galactose e manose, muitas delas possuem uma afinidade muito mais acentuada por oligossacarídeos, que geralmente não se encontram presentes em vegetais (PEUMANS et al, 1996). Neste contexto, as lectinas constituem proteínas vegetais capazes de reconhecer e de se ligarem a glicoproteínas presentes na superfície de microorganismos (como bactérias e fungos) ou expostas ao longo do trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros.

Outro argumento circunstancial a favor da função de defesa para várias lectinas é a sua marcada estabilidade sob condições desfavoráveis, como uma ampla faixa de pH, resistência ao aquecimento e resistência a proteases de insetos e outros animais, o que as torna semelhantes a outras proteínas relacionadas com a defesa como inibidores de proteases, quitinases, inibidores de  $\alpha$ -amilases, proteínas antifúngicas e tioninas (PEUMANS et al, 1995). Além disto, há uma associação preferencial de lectinas às partes das plantas geralmente mais susceptíveis ao ataque por outros microorganismos, como por exemplo seu acúmulo típico em órgãos de armazenamento (JANZEN, 1981).

As células epiteliais do trato digestivo de insetos fitófagos estão diretamente expostas aos constituintes de sua dieta e, portanto, são possíveis sítios de ligação para lectinas e outras defesas vegetais (PEAUMANS et al, 1995). Uma vez que as glicoproteínas são as principais constituintes destas membranas, a porção voltada para o lúmen do trato gastrointestinal é repleta de possíveis sítios de ligação para lectinas obtidas através da alimentação. Poderia se supor que quando a ligação de uma lectina ao receptor glicoprotéico provocasse um efeito deletério local ou sistêmico, o inseto poderia ser repellido, ter seu desenvolvimento atrasado ou mesmo ser morto.

Diversas lectinas já foram isoladas e caracterizadas de acordo com as suas propriedades bioquímicas, estruturas moleculares e especificidade com carboidratos (VAN DAMME, 1998a *apud* PEAUMANS et al, 2000). Em 1998, Van Damme e Peaumans (1998b) propuseram uma divisão baseada nas diferenças bioquímicas, moleculares e fisiológicas. Assim, estabeleceram sete famílias: (i) família Amaranthaceae, (ii) de ligantes a quitina, (iii), floema de Curcubitaceae, (iv) família jacalina, (v) lectinas de legume, (vi) lectinas de monocotiledôneas (manose lectinas), e (vii) proteínas inativadoras tipo 2 (RIP tipo 2). Atualmente, essa divisão foi reorganizada em cinco famílias de acordo com a estrutura das subunidades da estrutura secundária: (i) lectinas de legume, (ii) de ligantes a quitina, (iii)

lectinas  $\beta$ -prism I fold (família jecalina), (iv) lectinas  $\beta$ -prism II fold (lectinas de monocotiledôneas), e (v) lectinas  $\beta$ -trefoil fold (família Amaranthaceae, floema de Curcubitaceae e RIP tipo 2) (SHARMA, 2007; Lectines Database, 2007).

As lectinas de monocotiledôneas se referem a uma superfamília específica para manose que podem ser encontradas nas famílias Alliaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Bromeliaceae, Iridaceae, Liliaceae e Orchidaceae (VAN DAMME et al, 1995, 1998b, 2000). Devido à sua especificidade por manose, essa família tem recebido certa atenção, pois têm se destacado como proteína antiviral (BALZARINI et al, 1991, 1992) e inseticida (GATEHOUSE et al, 1995). A primeira lectina desta família a ser isolada e caracterizada foi a lectina de bulbos de *Galanthus nivalis* (GNA) (VAN DAMME et al, 1987). Esta lectina é levada através do floema da planta e é capaz de ligar à manose das células epiteliais do intestino de insetos causando um rompimento das microvilosidades e podendo ser observada anormalidades das células epiteliais dificultando a absorção de nutrientes (SAUVION et al., 1996, Powell et al., 1998).

#### 1.4.1.1 O Gene *tar1* de Inhame

O inhame (*Colocasia esculenta*), que pertence à Família Araceae, subfamília Colocasidea, é originária do velho mundo, tendo sido domesticado como fonte de alimento ainda na pré-história. O inhame foi introduzido na China pelos polinésios no início da era cristã, de onde foi levado para o Japão. Paralelamente, o inhame chegou à África trazido da Índia ou Arábia, sendo introduzido nas Américas durante a colonização (SAUER, 1994).

O corno de inhame maduro contém aproximadamente 29 % de carboidratos e 1,5 – 3 % de proteínas considerando seu peso fresco (CARNEIRO et al, 1990). A deposição de proteínas neste órgão é regulada durante seu desenvolvimento e as proteínas mais abundantes foram classificadas de acordo com seu tamanho, ponto isoelétrico (pI) e solubilidade em soluções salinas, sendo duas famílias de albuminas (A1 e A2) e duas de globulinas (G1 e G2) (CASTRO et al, 1992).

O gene *tar1* que codifica duas das isoformas de globulinas de corno de inhame pertencentes à família G1 foi isolado e caracterizado (BEZERRA, 1993; BEZERRA et al, 1995; MONTE-NESHICH et al, 1995; GUIMARÃES, 1996). Este gene possui uma ORF (*open reading frame*) de 765 pares de base e uma estrutura típica de genes que codificam

proteínas de reserva, incluindo dois *stop codons* e dois motivos de poliadenilação (BEZERRA et al, 1995).

O gene *tar1* é traduzido a partir de um RNA mensageiro de aproximadamente 1.000 nucleotídeos em um polipeptídeo precursor de 255 resíduos, que é processado pós-traducional (MONTE-NESHICH et al, 1995). Este polipeptídeo possui um peptídeo-sinal de 23 resíduos de aminoácidos e dois domínios de 116 aminoácidos cada, correspondendo a duas proteínas de massa molecular de 12,5 kDa: G1a e G1d (BEZERRA et al, 1995). Uma vez que a massa molecular da proteína nativa foi estimada em 26 – 28 kDa, foi sugerindo que as proteínas G1a e G1d formariam dímeros.

Segundo Bezerra e colaboradores (1995), a seqüência protéica traduzida a partir de *tar1* apresenta 45 % de identidade com a curculina, uma proteína proveniente de *Curculigo latifolia* e 40 % de identidade com a lectina GNA de *G. nivalis*.

Leal-Bertioli e colaboradores (2003) observaram que a tarina diminui a taxa de sobrevivência e o peso larval de *Spodoptera frugiperda* em ensaios com folhas de tabaco transgênicos. Este trabalho abriu as perspectivas para o uso de plantas transgênicas expressando o gene da tarina como parte de uma estratégia para o controle de pragas em plantas.

#### **1.4.2 Inibidores de Proteinases**

Proteínas inibidoras de proteinases são amplamente distribuídas em plantas (XAVIER-FILHO; CAMPOS, 1989). Boa parte do interesse que estas proteínas têm despertado prende-se ao potencial que elas apresentam capacidade de interferir na digestão de proteínas de predadores que se alimentam de plantas.

Inibidores de todas as quatro classes mecanísticas de proteinases já foram isolados de plantas. Em muitos casos, os estímulos ambientais que modulam a expressão de alguns destes inibidores são conhecidos (JOHNSON et al, 1989). A partir destes conhecimentos muitos genes para inibidores de proteinases foram isolados e estão sendo utilizados em programas biotecnológicos destinados a obtenção de plantas resistentes a insetos (GATEHOUSE et al, 1992; McMANUS et al, 1994).

Os inibidores de proteinases têm recebido mais atenção por estarem ligados aos mecanismos de defesa de plantas contra insetos-praga e patógenos (RYAN, 1991). Não está

ainda bem esclarecido como estes fatores protéicos são ativos contra as pragas, mas já se sabe que elas interferem nos processos digestivos dos insetos, especificamente pela capacidade de se ligarem às enzimas proteolíticas presentes no intestino dos insetos (RYAN, 1990). Outro possível modo de ação dos inibidores de proteinases seria o de causar uma superexpressão das proteinases digestivas. Assim, com uma dieta insuficiente de aminoácidos que estariam sendo direcionados para a síntese de proteinases, o crescimento seria inibido (BROADWAY; DUFFEY, 1986).

O uso de genes que codificam para os inibidores de proteinases na transformação de plantas economicamente importantes representa uma alternativa ao uso, por exemplo, da endotoxina do *B. thuringiensis* (Bt) no controle de insetos-praga (HILDER et al, 1987; REECK et al, 1997). A estratégia para selecionar um inibidor de proteinase para o controle de uma praga exige um conhecimento prévio de quais classes de proteinases digestivas essa praga apresenta e a qual inibidor elas são sensíveis. Com base nestes estudos, a expressão de proteínas inibidoras de proteinases em sistemas transgênicos representa uma estratégia para plantas ao ataque de insetos-praga.

#### **1.4.2.1 Inibidores Proteinases Serínicas**

As proteinases serínicas são as mais estudadas e as mais versáteis enzimas proteolíticas, regulando uma grande variedade de eventos fisiológicos. A tripsina, uma proteinase serínica digestiva de mamíferos, foi a primeira enzima utilizada nas pesquisas iniciais com inibidores de proteinases em plantas (LIENER; KAKADE, 1980).

O fato de que os inibidores poderiam interferir nos processos digestivos levou à descoberta de um grande número de inibidores de proteinases dessa classe mecanística. Inicialmente esses inibidores foram descobertos em órgãos de reserva de plantas, os quais são muito utilizados como fonte de proteínas para homens e animais. Assim, sementes e tubérculos foram as fontes para as primeiras pesquisas com inibidores. Mais tarde, inibidores foram encontrados em outros órgãos das plantas, como folhas e frutos, que normalmente não são depósitos de material de reserva (XAVIER-FILHO; CAMPOS, 1989).

Os inibidores de proteinases serínica são classificados em famílias de acordo com seu peso molecular e estrutura primária. Atualmente são conhecidas oito famílias de inibidores de proteinases serínica: Bowman-Birk, Kunitz, batata I, batata II, Cucurbitaceae, superfamília

dos cereais, milheto AI e thaumatin-PR (RICHARDSON, 1991). Estes inibidores associam-se com a enzima de acordo com um mecanismo padrão (LASKOWSKY; KATO, 1980), a enzima reage com a molécula do inibidor como se fosse seu substrato. Ao contrário de uma molécula clivada e dissociada, o conjunto permanece covalentemente ligado.

Inibidores de proteinases serínica de várias famílias já foram encontrados em sementes e tubérculos de muitas plantas (XAVIER-FILHO; CAMPOS, 1989; RICHARDSON, 1991). Sementes de leguminosas como soja (*Glycine max*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), entre outras, são ricas em inibidores de tripsina. Sementes de cereais como trigo, arroz, sorgo e cevada são também ricas nesses inibidores.

O mais conhecido inibidor dessa classe em plantas é o inibidor de tripsina de soja Kunitz (SKTI) (LASKOWSKI; KATO, 1980), uma proteína de 21 kDa que faz um complexo com a enzima com elevada constante de associação. A estrutura primária desse inibidor revela ser de cadeia única e com resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto. Esta proteína é considerada como um inibidor de cabeça-única, específico para tripsina, embora também seja capaz de inibir fracamente a quimotripsina (RICHARDSON, 1991). Um alto grau de homologia entre inibidores do tipo Kunitz de diferentes leguminosas é observado quando suas seqüências primárias são comparadas (TAI et al, 1991), o que sugere um papel fisiológico relevante para a planta. Este inibidor é uma proteína específica de sementes sendo depositada em altas quantidades durante o desenvolvimento (VODKIN, 1981). Entretanto, existe cultivares de soja onde esta proteína não está presente (ORF; HYMOWITZ, 1979; JOFUKU et al, 1989).

Sementes de soja contêm outro inibidor de proteinase serínica, o inibidor de proteinase Bowman-Birk (BBI) que inibe tripsina e quimotripsina (BIRK, 1985). Esta é uma pequena proteína de 8 a 10 kDa com alto conteúdo de resíduos de cisteína, que formam pontes dissulfeto intra-cadeia. Este inibidor é considerado de dupla-cabeça, visto que é capaz de formar complexos estequiométricos com enzimas (1:1) e inibir diferentes proteinases, usualmente tripsina e quimotripsina.

As sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) contêm vários inibidores de tripsina e quimotripsina (XAVIER-FILHO; VENTURA, 1988). Eles pertencem à família Bowman-Birk de inibidores de dupla-cabeça, de baixo peso molecular. Muitas outras leguminosas contêm inibidores de proteinases serínica da família Bowman-Birk em suas sementes. Estes já foram isolados de sementes de *Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogea*, *Clitoria ternatea*, entre outros (RICHARDSON, 1991).

O BTCI (*black-eyed pea trypsin chymotrypsin inhibitor*) é um inibidor do tipo Bowman-Birk purificado de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.) (VENTURA et al, 1971; MORHY; VENTURA, 1987 *apud* FRANCO, 2003) com 83 resíduos de aminoácido. O BTCI é ativo em uma larga faixa de pH (pH 3 a 12), e tem elevada estabilidade térmica (SILVA et al, 2001).

É conhecido o efeito dos inibidores de proteinases contra larvas e adultos do bicudo-do-algodoeiro. Franco e colaboradores (2003, 2004) mostraram o efeito deletério de dois deles (SKTI e BTCI). Um deles, o BTCI em baixa concentração causou uma significativa redução no desenvolvimento do inseto. Segundo Franco (2003), esta redução poderia ser devido à dupla função do BTCI, que seria capaz de reduzir a atividade das proteinases serínicas digestivas tripsinas e quimotripsinas em intestinos de larvas de *A. grandis*.

### **1.5 Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis***

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram positiva, da família *Bacillaceae* que produz no momento de sua esporulação inclusões protéicas cristalinas. Estas inclusões contêm proteínas denominadas delta-endotoxinas que formam atualmente uma família de 110 membros, classificados em 22 grupos. Elas são produzidas sob a forma de protoxinas, as quais são transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto, pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (ARONSON et al, 1986).

Uma das vantagens da utilização do Bt é sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; O.M.S., 1987). Produtos a base desta bactéria para o controle de pragas agrícolas são comercializados há mais de cinquenta anos, sendo o seu mercado anual estimado em 100 milhões de dólares. Prevê-se que esta utilização vá aumentar na medida em que legislações de proteção ambiental mais rigorosas forem adotadas e produtos mais eficientes e baratos forem lançados (DIAS, 1992). No mundo inteiro, diversas estirpes de Bt foram isoladas e atualmente diversos laboratórios continuam procurando por outras novas. Existem várias coleções espalhadas pelo mundo e estima-se que existam 40.000 estirpes conhecidas. Entre estas, existem algumas que são eficazes contra diversas ordens de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros) e contra outros grupos de



invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (FEILTELSON et al, 1992; CRICKMORE et al, 1995).

O *Bacillus thuringiensis* produz uma série de toxinas entre as quais se destacam pelo uso entomopatogênico as  $\delta$ -endotoxinas. Este grupo de toxinas, também chamado de proteínas Cry é um dos formadores do cristal protéico. Estas proteínas apresentam peso molecular variando de 65 a 138 kDa. O processo de formação deste cristal está ligado à esporulação. Os estudos efetuados sobre a esporulação mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio da esporulação e é liberado quando as células são lisadas. A classificação das proteínas Cry se baseia na similaridade das seqüências de aminoácidos (CRICKMORE et al, 1998). Existem mais de 150 diferentes genes *cry* e as proteínas Cry estão agrupadas em 22 classes. A atualização constante desta nova classificação se encontra disponível no site: [http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

Foi proposto que as proteínas Cry causam a morte das células epiteliais ao inativar o sistema que mantém o gradiente de pH (WOLFERSBERGER, 1992) e por citólise osmótica (KNOWLES; ELLAR, 1987). As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isto causa um colapso na diferença de potencial e por tanto, perda da força motriz que dirige a entrada de aminoácidos ao interior celular, assim como a redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. Considera-se que o efeito mais devastador deste processo é a alcalinização do citoplasma, já que isto interfere no metabolismo celular normal, e tem como conseqüência final a destruição do epitélio intestinal (HARVEY, 1992; WOLFERSBERGER, 1992). Uma vez que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de Bt têm acesso a hemolinfa, meio onde se proliferam. Foi demonstrado que em alguns casos os efeitos das proteínas Cry e dos esporos é sinérgico (JOHNSON; McGAUGHEY, 1996) e que alguns destes esporos contém toxina na superfície, o que assegura seu acesso à hemolinfa (DU; NICKERSON, 1996). A conseqüência final, da destruição do intestino médio e a proliferação de bactérias na hemolinfa, é a morte das larvas por inanição e septicemia.

As técnicas de engenharia genética permitiram também o desenvolvimento de um sistema que consiste na transferência e expressão de genes que codificam  $\delta$ -endotoxinas de Bt em plantas, chamadas transgênicas, as quais se tornam resistentes a determinados insetos. A metodologia de introdução do gene envolve o uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* como vetor ou outros métodos como biobalística ou eletroporação (AZEVEDO, 1998).

Os primeiros resultados de transferência de genes de Bt para fumo e tomate foram relatados em 1987 (FISCHHOFF et al, 1987). Desde então, vários genes *cry* têm sido

introduzidos em diversas espécies de plantas como algodão, arroz, milho, batata, soja, canola e outras. Os primeiros trabalhos relatam níveis muito baixos de expressão dos genes *cry* (menos que 0,001 % de proteínas solúveis da folha), entretanto, com a adoção de novas técnicas de biologia molecular, como construção e expressão de genes parcial ou totalmente sintéticos, níveis mais altos de expressão (0,02 - 1 %) foram obtidos (JOUANIN et al, 1998).

Em 1995, foram aprovadas para venda nos EUA as primeiras plantas transgênicas: milho expressando a toxina Cry1Ab (Mximizer™ da Novartis), para o controle de *Ostrinia nubilalis*; algodão expressando a toxina Cry1Ac (Bollgard™ da Monsanto), para o controle de *Helicoverpa* spp.; e batata expressando Cry3A (Newleaf™ da Monsanto) para o controle de *Leptinotarsa decemlineata*. Em 1996, estas primeiras variedades foram comercializadas (JOUANIN et al, 1998).

A era do algodão transgênico começou quando Perlak e colaboradores (1990), introduziram o gene *cry1AC* (N-terminal do *cry1AC* e C-terminal do *cry2AB*) em plantas de algodoeiro e as plantas transformadas mostraram um alto nível de resistência contra *Heliothis virescens*. Em 1996, a companhia Monsanto recebeu autorização para lançar o algodoeiro transgênico conhecido como Bollgard. O algodão transgênico foi testado nas principais regiões produtoras de algodão dos Estados Unidos e as plantas foram analisadas com relação ao controle de insetos e se mostraram eficientes quando comparadas com os inseticidas químicos tradicionais. Durante os testes em laboratório e em campo foi demonstrado que o algodão transgênico era extremamente eficiente contra larvas neonatas de *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella* (WILSON et al, 1992). A  $\delta$ -endotoxina do Bt entra em contato com as larvas neonatas logo após a eclosão, quando elas estão na fase mais susceptível.

O gene de Bt da planta transformada é transferido para outros cultivares através de retrocruzamento. Isto tem facilitado a introdução do gene em variedades de algodoeiro que apresentam características agrônomicas desejáveis e, por outro lado, não respondem a regeneração *in vitro*. Observou-se que o algodoeiro transgênico requeria menos aplicações de inseticidas, o que conseqüentemente reduz os custos da produção. Seguindo a mesma filosofia, Thomas e colaboradores (1995) produziram um algodão transgênico que expressava inibidores de proteinases de *Manduca sexta*, e observaram uma diminuição na emergência de adultos de mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Zhao e colaboradores (1998) desenvolveram na China um algodão transgênico combinando o gene de Bt com o gene codificador de inibidor de tripsina do caupi (CpTI).

## 1.6 Transformação Genética de Algodoeiro

O melhoramento de culturas agronomicamente importantes, como o algodoeiro, tem sido uma preocupação constante desde a origem da agricultura. De maneira geral, nenhuma cultura preenche todos os parâmetros agrônômicos qualitativos desejáveis e os melhoristas de plantas estão constantemente interessados na melhoria de características como: resistência a patógenos, qualidade da semente ou do produto comercial, produtividade e tolerância a diferentes estresses fisiológicos. Durante décadas, as culturas agrônômicas têm sido melhoradas por meio de métodos convencionais utilizando a variação natural dentro de diferentes recursos genéticos.

O recente desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação e regeneração tem criado novas possibilidades para o melhoramento vegetal. Com o conhecimento das bases moleculares e dos mecanismos bioquímicos que regulam características agrônômicas importantes, tem sido possível definir estratégias adicionais para o melhoramento de plantas por meio da introdução e integração estável de um ou alguns genes clonados nas células vegetais (CHENG et al, 1992).

Várias metodologias estão sendo aplicadas na transformação de plantas de algodoeiros, entre elas tem-se: (i) a microinjeção via tubo polínico (ZHOU et al, 1983, WANG, 2004); (ii) a transformação via *A. tumefaciens* (KUMRIA et al, 2003; LEELAVATHI et al, 2004) e (iii) a via biobalística (ARAGÃO, 2005; GOUNARIS, 2005). No entanto, dois destes métodos apresenta baixa eficiência, são complexos e estão vinculados ao uso de sistemas eficientes de regeneração. Por serem, em geral, genótipos-dependentes, exigem a adaptação de cultivares de algodão brasileiro para tornarem-se eficientes para a transformação.

Para se gerar uma planta GM são necessárias três etapas básicas. A primeira delas e, geralmente, a mais limitante, é a identificação do gene que irá conferir a nova característica de interesse para a planta em estudo. A natureza com a sua variabilidade genética torna-se potencialmente a fonte desses genes. Entretanto, para poder ser manipulado, o gene responsável pela característica de interesse deve ser localizado e isolado dos demais genes no genoma do organismo doador. De posse de gene, este será caracterizado, introduzido em vetores específicos para transformação e, só então, transferido para o genoma da planta em estudo. Nos estudos desenvolvidos pelo nosso grupo, temos dado especial atenção para genes codificadores de inibidores de enzimas digestivas e para a  $\delta$ -endotoxina do *Bacillus*

*thuringiensis* (OLIVEIRA NETO et al, 2004a, 2004b; FRANCO et al, 2004; OLIVEIRA NETO et al, 2003; DIAS et al, 2005; DAYLER et al, 2005; PEREIRA et al, 2006).

A segunda etapa consiste no desenvolvimento de uma metodologia eficiente de transformação da planta de interesse, no nosso caso em particular, o algodoeiro. Atualmente, diferentes estratégias para a transferência de genes em plantas estão disponíveis, sendo que as mais utilizadas são as transformações via *Agrobacterium*, biobalística, e eletroporação.

A última etapa para a transformação de uma planta é o estabelecimento de um sistema eficiente e reproduzível de regeneração *in vitro* da espécie vegetal. Durante o processo de regeneração, a célula inicialmente transformada multiplica-se e dá origem a uma planta inteira, onde todas as células vão conter a nova informação introduzida. A regeneração desta planta baseia-se no princípio da totipotência, isto é, a potencialidade que as células vegetais têm de diferenciar-se, originando um novo indivíduo. Cada espécie vegetal, ou mesmo diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie, tem diferentes exigências nutricionais e hormonais para a sua regeneração. Alguns apontam a dificuldade em se cultivar determinadas espécies vegetais *in vitro* como o principal limitante à transformação de plantas no momento.

Como já foi visto acima, vários métodos de obtenção de plantas transgênicas vêm sendo desenvolvidos e alguns deles já estão bem estabelecidos, sendo utilizados de forma rotineira em laboratórios de transformação de plantas. Entretanto, no que diz respeito a transformação do algodoeiro os pesquisadores têm tido enormes dificuldades (ZAMBRE et al, 2001). Estas dificuldades residem no fato de que o algodoeiro tem se mostrado ser uma planta recalcitrante. As técnicas usadas não apresentam sucesso em todas as variedades, sendo as comerciais as mais prejudicadas, e apresentam uma eficiência de transformação muito baixa.

O algodoeiro apresenta inúmeras dificuldades para a transformação genética. Estas vão desde a cultura de tecidos, regeneração de plantas e transformação genética, até problemas de reprodutibilidade, aplicabilidade às demais variedades e baixa frequência de transformação (ZAMBRE et al, 2001).

O desenvolvimento de um sistema eficiente de transformação genética abre caminho para o melhoramento do algodoeiro a nível molecular, seja pela introdução de novos genes que possam corrigir falhas de cultivares elite, como a suscetibilidade a algumas doenças, seja pelo bloqueio de genes que expressem características indesejáveis.

## 1.7 Transformação de Algodoeiro Via Tubo Polínico

A transformação via tubo polínico (TVTP) de plantas, é um método que permite a inserção de um ou mais genes heterólogos diretamente nas células germinativas das plantas (ZHOU et al, 1983). A TVTP combina técnicas de engenharia genética com o melhoramento tradicional, com o objetivo de gerar plantas com elevadas características agronômicas. Nos últimos anos um grande progresso tem sido alcançado na China, no qual diferentes eventos de algodão GM foram produzidos por meio da transformação via tubo polínico e muitos destes eventos já estão incorporados na produção de algodão em nível comercial.

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 antifúngicas (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.

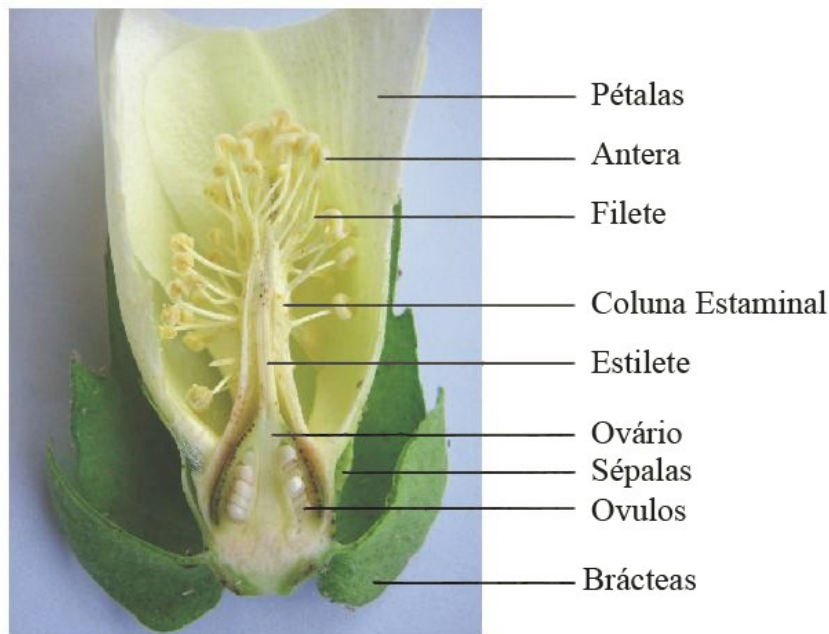
### 1.7.1 Estrutura Reprodutiva do Algodoeiro

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

Na Figura 4 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 contem 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.

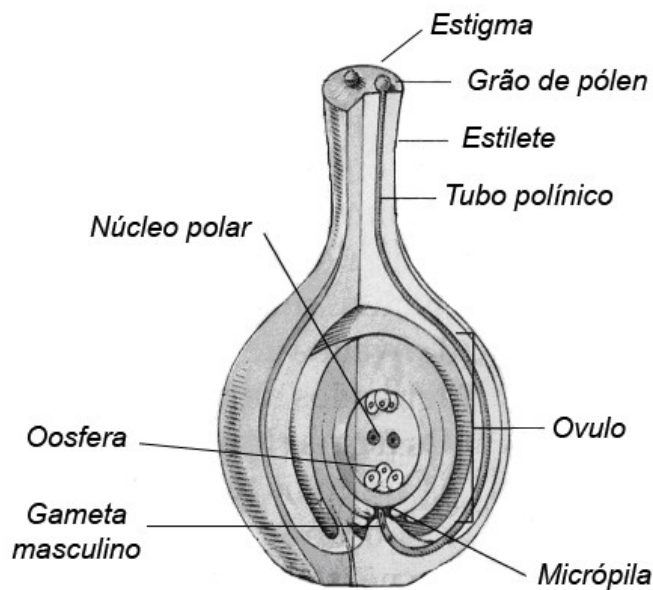


**Figura 4.** Corte longitudinal de uma flor de algodoeiro com a presença de todos os verticilos florais indicando uma flor completa com brácteas, pétalas, sépalas, estames e ovário. Foto: Oliveira, R. S., 2007.

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 *via do tubo polínico*. Segundo observações de Gong (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 5).



**Figura 5.** Desenho esquemático do ovário indicando o grão de pólen com o tubo polínico desenvolvido.

### 1.7.2 Desenvolvimento do Botão Floral e do Embrião em Função do Tempo

Para facilitar o entendimento da TVTP e fenologia do algodão (Figura 6), 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 morfológicamente 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.

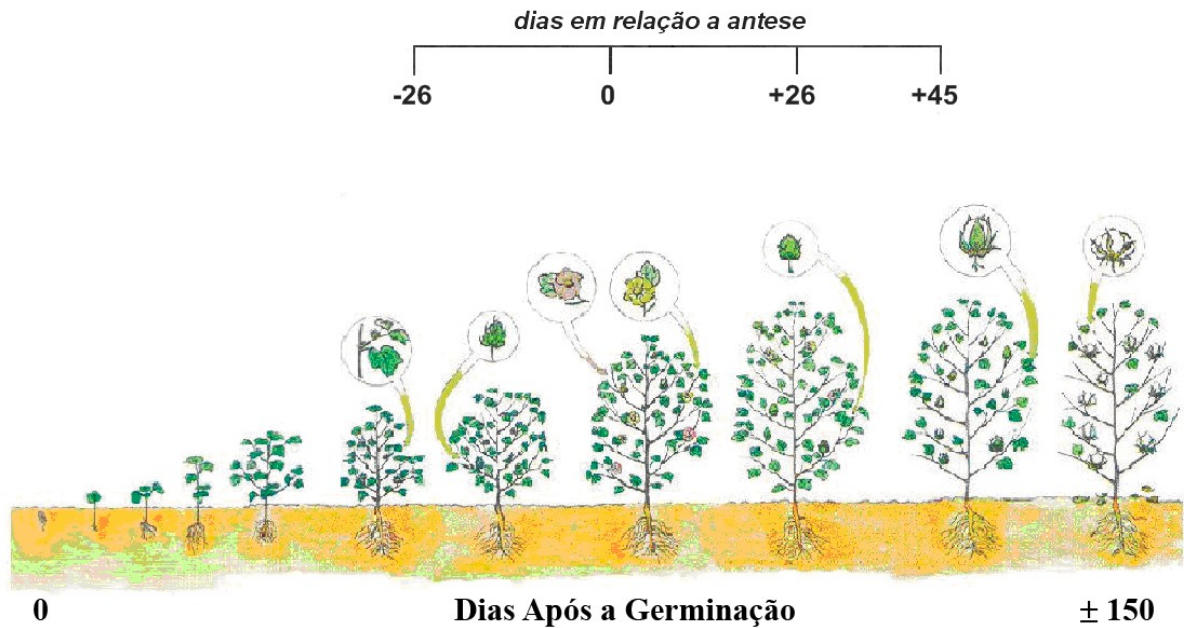
**Dia +3:** O ovo fecundado permanece indiviso até a noite deste dia. A divisão deve se dar da noite de **+3** para **+4**, pois na manhã do dia **+4** já se vêem embriões com duas células. Nesta etapa a TVTP já foi feita.

**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.

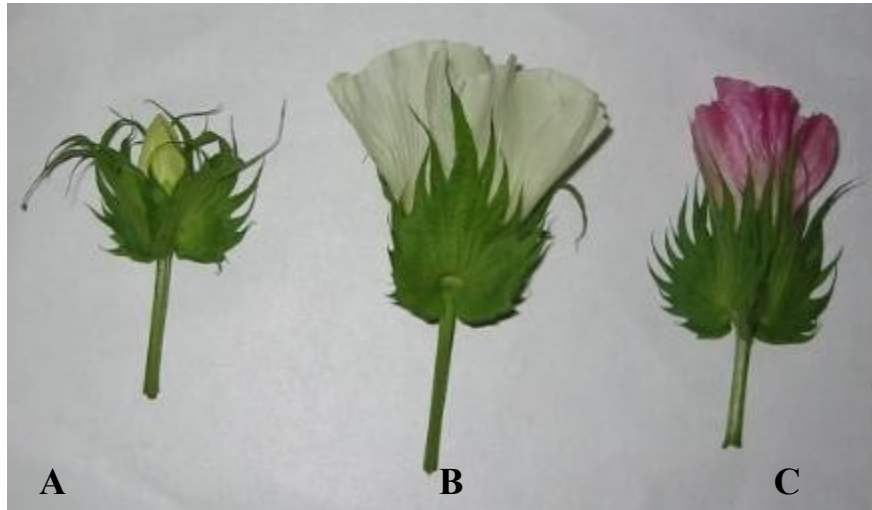




**Figura 6.** Estágios fenológicos do algodoeiro. Na parte superior da figura a antese em relação o desenvolvimento inicial do botão floral (**dia -26**) e a colheita dos capulhos (**dia +45**).

### 1.7.3 Processo de Floração e Fecundação do Algodoeiro

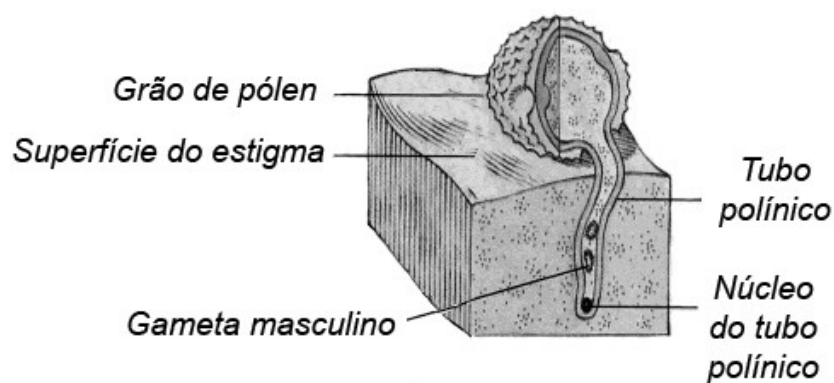
Após cerca de 40 dias da iniciação do botão floral, a flor madura está pronta para a abertura (antese). Na tarde anterior do dia da antese as pétalas se alongam. As flores geralmente abrem das 7 às 9 da manhã do dia seguinte. Temperaturas elevadas irão resultar na antecipação da abertura floral e baixas 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 7). Finalmente, as pétalas, estames, estilete e estigma caem no terceiro dia.



**Figura 7.** 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. Foto: Oliveira Neto, O. B. 2005.

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 8). Durante o processo de alongamento, a extremidade do tubo polínico formada por um citoplasma denso, contém 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.

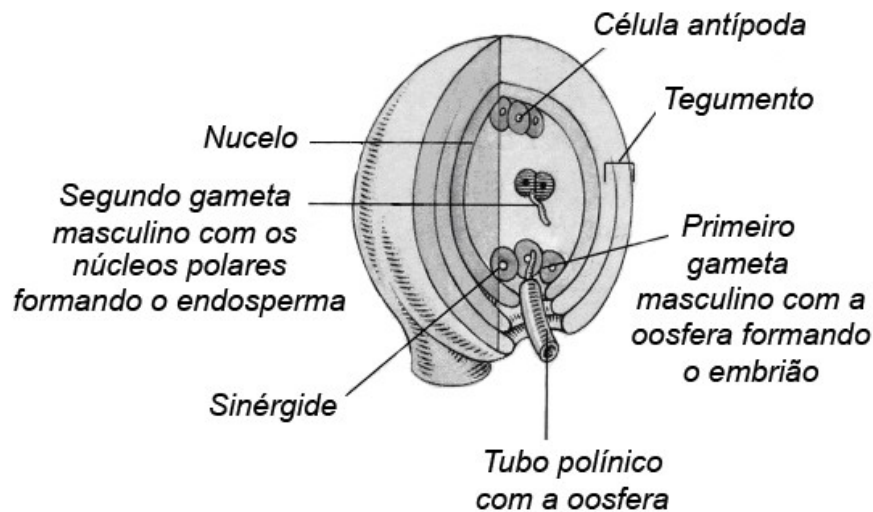


**Figura 8.** Desenho esquemático de um grão de pólen sobre o estigma iniciando o desenvolvimento do tubo polínico.

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 8 h. 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 9). 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 9.** Desenho esquemático do processo de fertilização da flor do algodoeiro.

#### 1.7.4 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 5). 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.

## 2.0 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a otimização da técnica de transformação de algodoeiro via tubo polínico para a obtenção de plantas transgênicas resistentes aos insetos-praga da cotonicultura, incluindo o bicudo-do-algodoeiro, lagartas do cartucho, lagartas do botão e lagartas foliares.

### 2.1 Objetivos específicos

- Otimizar a técnica de transformação de algodoeiro via tubo polínico;
- Verificar a eficiência da TVTP na variedade BRS Cedro;
- Fornecer subsídios para a obtenção de plantas transgênicas de algodoeiro via tubo polínico;
- Obter plantas transgênicas de algodoeiro via tubo polínico e com os genes codificadores de BCTI e tarina e com gene *cryIIa12*.

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Soluções e tampões

###### CTAB 2,00% pH 8,0

Tris (pH 8,0)		0,1 M
CTAB		2 %
EDTA		20 mM
NaCl		1,4 M
PVP		1 %
HCl para ajustar o pH		
q.s.p. 100 mL de H <sub>2</sub> O destilada		

###### PBS pH 7,2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M	68,4 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M	31,6 mL
NaCl	2,5 M	58 mL

###### PBST

PBS adicionado de *tween* 20 a 0,05 % (v/v).

###### Tampão de amostra para gel de agarose (TEB) 10 X

Glicerol		50 % (v/v)
Azul de bromofenol		0,1 % (p/v)
Xileno cianol		0,1 %
Os reagentes acima foram dissolvidos em TEB 10 X		

###### Tampão TE

Tris		48 mM
Glicina		39 mM
Metanol		20 %
SDS		0,037 %

###### Tampão Tris 3 M pH 8,8

Tris		36,34 g
HCl para ajustar o pH		

q.s.p. 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada

**Tampão Tris 0,5 M pH 6,8**

Tris		6,05 g
HCl para ajustar o pH		
q.s.p. 100 mL de H <sub>2</sub> O destilada		

**TBS pH 7,5 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM)**

Tris	1 M	25 mL
NaCl	5 M	15 mL
q.s.p. 500 mL de H <sub>2</sub> O destilada		

**3.1.2 Meios de cultura**

**Meio LB, pH 7,0**

Peptona de caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

**Meio LB ágar**

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração de 1,4 % (p/v).

**3.1.3 Antibióticos**

**Soluções estoque**

Ampicilina	100 mg/ mL	1,0 % (p/ v)
Canamicina	50 mg/ mL	0,5 % (p/ v)
Canamicina	5 mg/ mL	

Essas soluções foram preparadas em água milli-Q, esterilizadas por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

### 3.1.4 Plasmídeos

**pFSPI-C2300-35Sd-*tar-btci* (11.502 pb)** – Vetor utilizado na transformação de plantas de algodão via tubo polínico para os genes *tar* e *btci*.

**pCRY1 (11.598 pb)** - Vetor utilizado na transformação de plantas de algodão via tubo polínico para o gene *CryIIa12*.

### 3.1.5 Reagentes

*Taq* DNA Polimerase – Invitrogen (5 U/ $\mu$ L) fornecida com seu tampão de reação 10X, utilizada nas reações de PCR.

T4 DNA Ligase – Gibco-BRL (1 unidade/ $\mu$ L), fornecida com o seu tampão 5X, utilizada nas reações de ligação.

Mistura de dNTPs – Eppendorf (100 mM/cada) utilizados nas reações de PCR.

Cubetas de 0,2 cm – usadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad.

Marcador de Massa Molecular 100 bp – Amersham Pharmacia Biotech.

Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA *ladder* – Gibco-BRL.

## 3.2 Metodologias

### 3.2.1 Material vegetal

Foi utilizado plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsurtum*) 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.

### ***3.2.2 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.

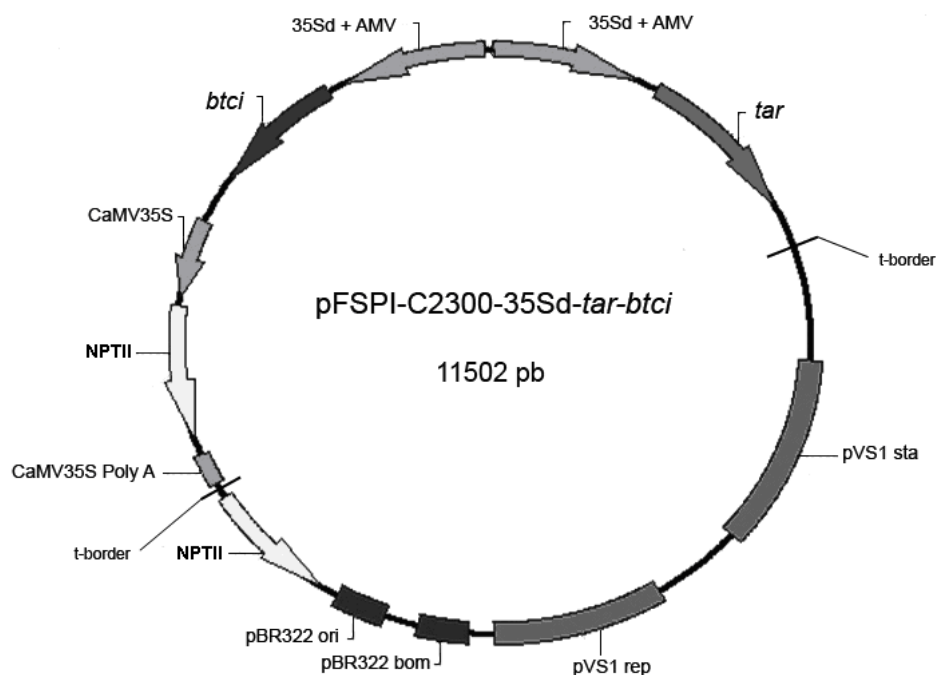
### ***3.2.3 Construção gênica utilizada***

Na construção de vetores de transformação, estão sendo utilizados os genes codificadores das proteínas mais promissoras no controle do bicudo do algodoeiro e de lagartas: (i) BCTI: um inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk isolado de caupi; (ii)

Tarina: uma lectina obtida do inhame (*Colocasia esculenta*); (iii) Cry1Ia: uma toxina Bt ativa contra o bicudo do algodoeiro e *S. frugiperda*, isolada de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* proveniente do banco de linhagens da Embrapa Cenargen; (iv) Cry2Ab: uma toxina Bt ativa contra lagartas; e (v) Cry8Ga: uma toxina Bt ativa o bicudo do algodoeiro. Os genes foram isolados segundo resultados prévios de bioensaios realizados *in vitro*.

### 3.2.3.1 Construção com os genes *btc1* e *tar1*

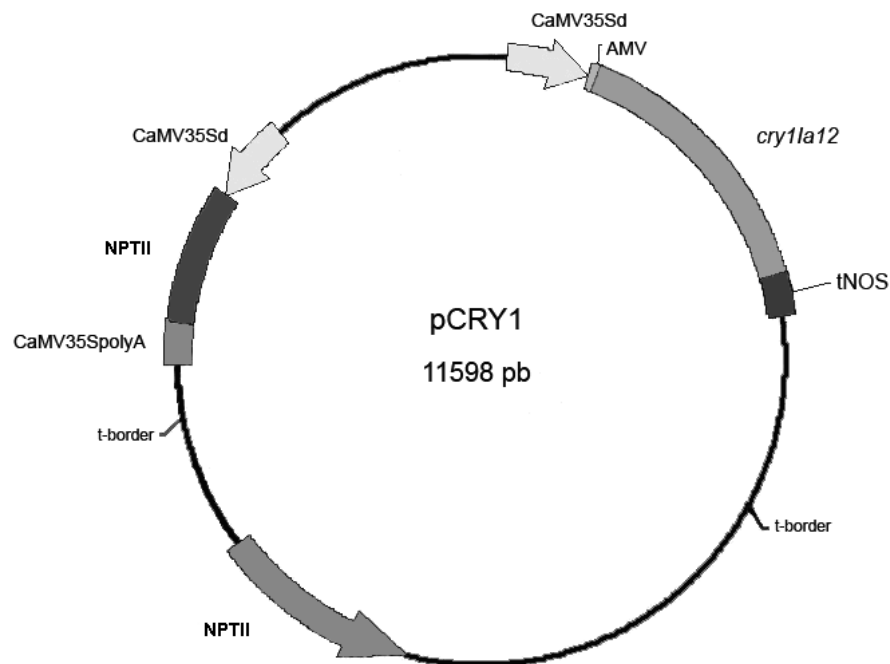
Foram selecionados dois genes a serem introduzidos no algodão, cultivar BRS Cedro: o gene codificador do inibidor *btc1* (inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk) e da Tarina (*tar1*), devido às suas atividades contra o bicudo-do-algodoeiro e lepidópteros, respectivamente. Porém, visando à transformação 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 10), o qual foi utilizado nos experimentos de transformação de plantas de algodão via microinjeção.



**Figura 10.** Construção com os genes *btc1* e *tar*, codificadores de proteínas inseticidas sob domínio do promotor 35Sd.

### 3.2.3.2 Construção com o gene *cry*

O gene *cryIIa12*, que também está sendo utilizado para transformação de plantas de algodoeiro via tubo polínico, foi clonado em um vetor de expressão de plantas da série CAMBIA (pC2300). Este gene está sob o 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. O gene *cryIIa12* (Figura 11) a ser utilizado foi selecionado para controle de lepidópteros e coleópteros.



**Figura 11.** Construção com o gene *cryIIa12*, codificador de proteínas inseticidas *cry*, sob domínio do promotor 35Sd.

### 3.2.4 Aplicação das microinjeções

Para a aplicação das microinjeções, as plantas foram 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.

Foi utilizada uma microseringa de 50  $\mu\text{L}$ . As microseringas foram lavadas com detergente diluído e então lavadas com água destilada antes e após o uso. Em seguida, as pétalas foram removidas, deixando apenas o ovário jovem (maçã jovem) exposto (Figura 12). 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.



**Figura 12.** Preparação da maçã para a microinjeção. Foto: Oliveira Neto, O. B. 2005

Na 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 (Figura 13).

Em seguida, o êmbolo foi movido o suficiente para que 10  $\mu\text{L}$  da solução do DNA fosse liberado no ovário. A concentração do DNA plasmidial utilizada foi de 0,1 a 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ou seja, 1 a 2  $\mu\text{g}$  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.



**Figura 13.** Aplicação da microinjeção. Foto: Oliveira Neto, O. B. 2005

### ***3.2.5 Análises e seleção dos transformantes***

A seleção foi feita com as sementes bem secas. Após a produção e secagem as sementes foram submetidas a um teste de seleção. A seleção foi feita inicialmente com antibiótico (Canamicina) seguida de PCR e ELISA.

#### ***3.2.5.1 Seleção com Canamicina***

Para a identificação dos transformantes, as sementes secas foram semeadas em bandejas plásticas (10 x 29,5 x 45,5 cm) com solo autoclavado. O desafio foi feito pincelando Canamicina (5 mg/ mL) nas folhas. O desafio teve início 10 dias após a emergência e foi repetido, semanalmente, por mais duas vezes em cada planta, sempre nas folhas mais jovens. As plantas que se mostraram positivas nesta primeira etapa foram analisadas através de reações de PCR com primers específicos para os transgenes e ensaio imunoenzimático (ELISA).

### 3.2.5.2 Análise por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

#### 3.2.5.2.1 Extração de DNA de folhas de algodoeiro pelo método CTAB

Foi feita a extração de DNA total de folhas de plantas de algodoeiros para serem utilizados na amplificação por PCR. A metodologia utilizada foi realizada de acordo com o protocolo que utiliza CTAB 2 % (p/v) adicionado de 0,2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol. Para a realização desse protocolo as folhas foram inicialmente congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até formação de um pó fino. A amostra foi então transferida para um tubo Falcon de 50 mL e adicionado 15 mL de CTAB 2 %. Este material foi em seguida incubado a 65° C por 50 minutos fazendo inversões a cada 10 minutos para homogeneização da amostra. Posteriormente, foi adicionado 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) à amostra, a qual foi agitada levemente por 10 minutos e em seguida centrifugada a 8.000 rpm por 10 min. A fração aquosa foi separada da fração orgânica e transferida para outro recipiente. Esta etapa foi repetida por 3 vezes para que a amostra ficasse o mais pura possível. Após a última repetição, acrescentou-se 0,6 volume de isopropanol gelado para que ocorresse a precipitação do DNA genômico. Após a precipitação, o DNA foi lavado com etanol 70 % gelado e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o DNA foi ressuscitado em 500  $\mu$ L de Tris-HCl 20 mM pH 8,0, quantificado e armazenado a -20° C. A quantificação das amostras foi feita em espectrofotômetro e analisadas em gel de agarose 0,8 % (p/v) na presença de brometo de etídio.

#### 3.2.5.2.2 PCR

##### a) Amplificação do gene *btc1*

As plantas resistentes aos desafios com Canamicina foram submetidas à amplificação por PCR para confirmação que eram transgênicas. A amplificação foi feita utilizando oligonucleotídeos para os genes *35Sd* e *btc1*. Foram feitas duas reações de amplificações utilizando os oligonucleotídeos específicos, a primeira reação para detecção de genes do *35Sd*

com os oligonucleotídeos *Cass.35S-For* (5'GGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGG3') e *Cass.tNOS-Rev* (5' GTCCTCATAGATGACACCGCGC3') e a seguida, utilizando o produto da primeira reação para a amplificação do gene codificador do *btc1*. Nesta última foram utilizados os oligonucleotídeos *Btc1.for1* (5'ATGGTGGTGYTAAAGGTGTG3') e *Btc1.rev2* (5'CTTATCCCAGTCATCATC3').

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, repetições de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos para desnaturação, 48°C por 45 segundos para anelamento por 45 segundos e 72°C por 45 segundos para a extensão. Foi feita uma reação de extensão final a 72°C por 5 minutos. Após as reações 20 µL de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 1 % e brometo de etídio.

#### b) Amplificação do gene *cryIIa12*

As plantas resistentes aos desafios com Canamicina foram submetidas à amplificação por PCR para confirmação que eram transgênicas. A amplificação foi feita utilizando oligonucleotídeos para os genes *35Sd* e *btc1*. Foram feitas duas reações de amplificações utilizando os oligonucleotídeos específicos, a primeira reação para detecção de genes do *35Sd* com os oligonucleotídeos *Cass.35S-For* (5' GGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGG3') e *Cass.tNOS-Rev* (5' GTCCTCATAGATGACACCGCGC3') e a seguida, utilizando o produto da primeira reação para a amplificação do gene codificador do *cryIIa12*. Nesta última foram utilizados os oligonucleotídeos *CryIIA12modFORWAR* (5' CCCGGCCCAGGCGGCCATGAAACTCAAGAAC3') e *CryIIA12modREVERSE Btc1.rev2* (5' CCGGCCGGCCTGGCCTTCGTAAGTAACTTC3').

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, repetições de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos para desnaturação, 48°C por 45 segundos para anelamento por 45 segundos e 72°C por 45 segundos para a extensão. Foi feita uma reação de extensão final a 72°C por 5 minutos. Após as reações 20 µL de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 1 % e brometo de etídio.

### 3.2.5.3 *Análise por ELISA*

#### 3.2.5.3.1 *Extração das proteínas totais*

Para a extração de proteínas totais, folhas jovens de plantas de algodoeiro possíveis de serem transgênicas foram maceradas até formação de um pó fino. Após a obtenção do pó, foi adicionado o tampão de extração PEB1 (fornecido pelo kit PathoScreen para Neomycin Phosphotransferase II da Agdia) e, em seguida, o macerado foi centrifugado a 7.500 g por 30 minutos a 4° C. Após a centrifugação o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e estocado a -80° C até a sua utilização.

#### 3.2.5.3.2 *ELISA*

Foi utilizado o kit PathoScreen para Neomycin Phosphotransferase II da Agdia para a análise de ELISA. Em uma placa de microtitulação de 96 poços foram adicionados 100 µL do extrato de proteínas de folhas e incubado a temperatura ambiente por 2 horas. Após a incubação, a solução foi descartada e os poços lavados cinco vezes com PBST (1X). Após a lavagem foram adicionados 100 µL dos anticorpos (diluídos em uma parte do componente MRS2 para quatro partes de PBST 1X) e incubado em um recipiente úmido por 2 horas a temperatura ambiente sob lenta agitação. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com PBST (1X) e adicionados 100 µL da peroxidase (solução TMB/Kit PathoScreen). A placa foi então incubada por 15 minutos em um recipiente úmido e em seguida foram adicionados 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M em cada poço para parar a reação. O ensaio foi feito em triplicata e com controles negativos. A leitura foi realizada em um leitor de ELISA a uma D.O. de 450 nm. Para os controles negativos foram utilizadas folhas de plantas não transgênicas.



## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização da técnica de tvtp em plantas de algodoeiro cv. Cedro

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.

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 consequência 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 02). 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.

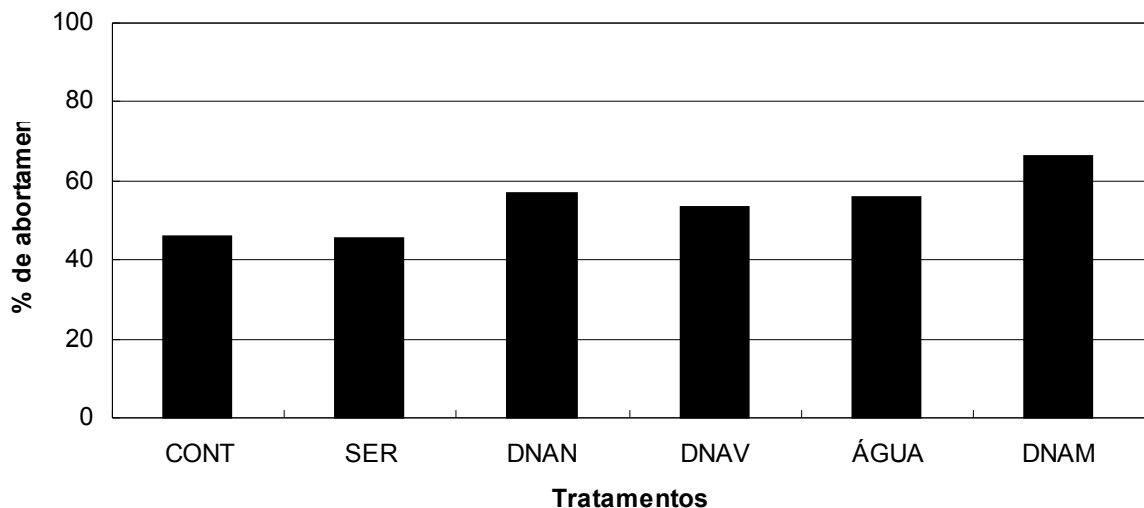
**Tabela 02:** Efeito da microinjeção no abortamento de maçã de algodão. CONT, Controle, plantas que não tinha suas flores microinjetadas; SER, Agulha, maçãs submetidas apenas a perfuração com a agulha da microseringa; DNAN, DNA Noturno, maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 20 às 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 construção gênica no período de 08 às 11:00 horas.

Tratamento	Nº de Microinj.	Maçãs Fixas	Nº de Abortos	Taxa de Abortamento %
CONT	400	215	185	46,25
SER	400	217	183	45,75
DNAN	400	172	228	57,00
ÁGUA	390	171	219	56,13
DNAV	400	186	214	53,50
DNAM	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 02). 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.

Os resultados encontrados para o tratamento CONT 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; 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; EL-ZIK, 1990).

Os resultados mostram também que a influência do dano físico tem pouco ou nenhuma influência no abortamento (Tabela 02 e Figura 14), 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 CONT e o tratamento SER (Tabela 03). 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 14:** 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.

**Tabela 03:** P-Valor, por meio do teste de Qui-Quadrado, entre os tratamentos utilizados, para a variável *taxa de abortamento*.

<b>Tratamento</b>	<b>CONT</b>	<b>SER</b>	<b>DNAV</b>	<b>DNAN</b>	<b>ÁGUA</b>
<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 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 02), 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 03).

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 02). 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 CONT (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.

## 4.2 Transformação de plantas de algodão cv Cedro via tubo polínico

A agricultura tem sido um dos pilares da economia brasileira e dentro deste contexto o algodoeiro vem assumindo um novo e importante papel, tanto como gerador de divisas como de empregos diretos e indiretos. A vitória de uma representação do Brasil junto a Organização Mundial do Comércio contra os Estados Unidos em 2004, em função do subsídio dados aos produtores americanos de algodão (da ordem de US\$ 4 bilhões ao ano) incrementou mais ainda o agronegócio do algodão no Brasil (COSTA; BUENO, 2004).

A transformação do algodão vem sendo extremamente retardada devido à limitação que são impostas a algumas técnicas pelos cultivares, por exemplo, a técnica de transformação por *Agrobacterium* só funciona para uma cultivar específica. Alguns pesquisadores já conseguiram um relativo sucesso na transformação de plantas de algodão. Relativo, uma vez que a eficiência da transformação conseguida é baixa e de repetibilidade duvidosa.

Neste contexto, a tecnologia da transformação do algodoeiro via tubo polínico representa uma alternativa às técnicas existentes e se trata de uma ferramenta com grande potencial para a geração de uma planta transgênica de algodão. Esta metodologia dispensa os protocolos de cultura de tecido o que mostra a princípio ser uma grande vantagem, uma vez a cultura de tecido demandar muito tempo nos protocolos de transformações de plantas.

Devido à baixa umidade relativa do ar em Brasília durante o período das aplicações das microinjeções o que elevava muito o abortamento em maçãs microinjetadas, alguns ajustes foram necessários para a aplicação da técnica de transformação via tubo polínico em nosso laboratório, que corresponde à primeira parte deste trabalho. Uma dessas modificações foi o estabelecimento de um horário para a aplicação das microinjeções em se observasse um menor influência da técnica no abortamento das maçãs. Assim, com base nos resultados da primeira parte deste trabalho foi escolhido o horário noturno de 20:00 às 23:00 horas para as aplicações das microinjeções e todas feitas nesta parte do trabalho foram feitas com base nesta recomendação.

A Tabela 04 mostra a construção gênica utilizada nos experimentos de microinjeção, a quantidade de sementes produzidas, germinadas e que foram submetidas ao desafio com canamicina. No mesmo quadro é possível ver também os potenciais transformantes para cada construção gênica utilizada.

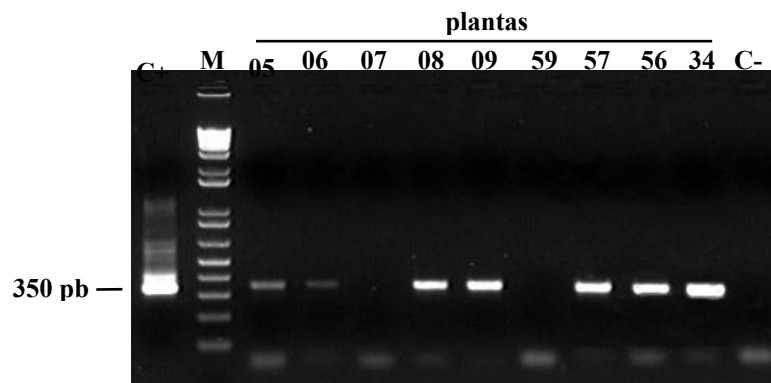
**Tabela 04:** Potenciais transformantes de algodão BRS Cedro obtidos por transformação via tubo polínico com as construções gênicas *btc1 + tarina* e *cryIIa12*.

Cultivar	Construção Gênica	Sementes Produzidas	Sementes Germinadas	Plântulas Desafiadas	Potenciais Transformantes
BRS CEDRO	<i>btc1 + tarina</i>	31.901	26.477	26.477	41
BRS CEDRO	<i>cryIIa12</i>	2.508	2.081	2.081	22

O conhecimento das condições ótimas para a aplicação das microinjeções aumentou a produção de sementes provenientes de plantas microinjetadas e, conseqüentemente, possíveis de serem transgênicas. Nesta etapa do trabalho foram produzidas 34.409 sementes provenientes de maçãs microinjetadas, as quais geraram 28.558 plântulas. A taxa de germinação das sementes provenientes de maçãs microinjetadas foi de 83 %.

A primeira etapa do processo de seleção dos transformantes, que foi feito quando as folhas das plantas foram submetidas à aplicação com canamicina, apresentou 41 potenciais transformantes com a construção *btc1 + tarina*, das 26.477 plântulas desafiadas. Com a construção *cryIIa12* o número plântulas desafiadas foi 2.081 com 22 potenciais transgênicos (Tabela 04).

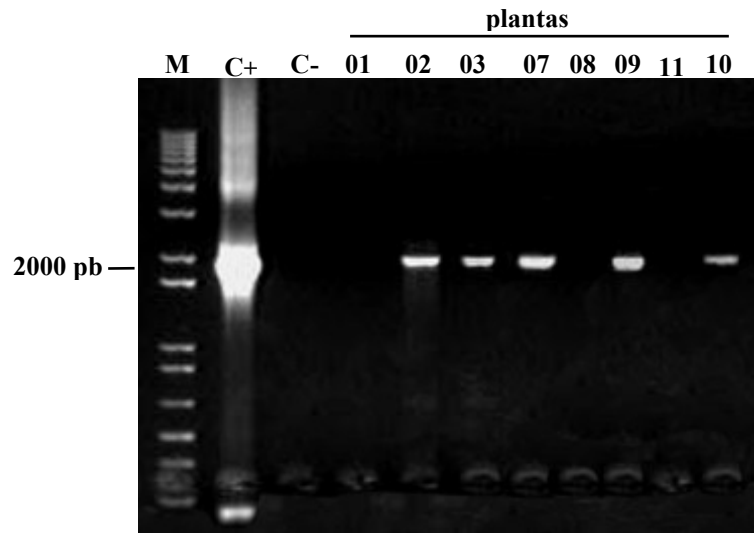
A análise de PCR foi feita para verificar a presença do gene *btc1* introduzido nas plantas de algodão. Para a variedade BRS Cedro, seis plantas de 41 selecionadas no desafio com canamicina foram positivas. A confirmação da amplificação foi observada com a presença de um fragmento de DNA com 350 pb correspondentes ao gene *btc1* (Figura 15). Uma planta não submetida a transformação via tubo polínico foi utilizada como controle negativo.



**Figura 15.** Análise por PCR de plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene *btc1 + tar*. C+, controle positivo consistindo do plasmídeo do vetor utilizado na transformação; M, marcador; C-, controle negativo consistindo de planta de algodão não transformada; Plantas BRS Cedro 05, 06, 08, 09, 57, 56 e 34 transformadas com *btc1 + tar* com a amplificação de um fragmento de 350 pb correspondente ao *btc1*.

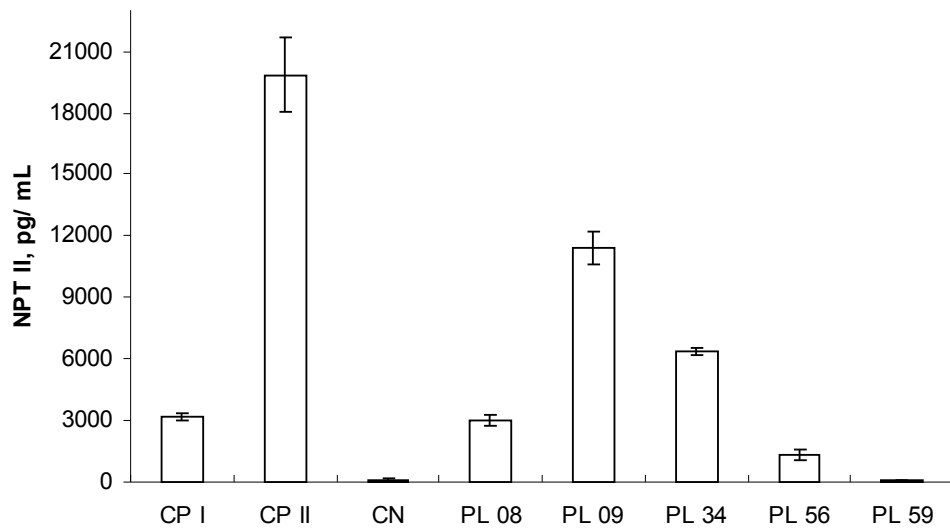


As análises de PCR para verificar a presença do gene *cryIIa12* nas plantas de algodão mostraram que cinco plantas BRS Cedro de 22 selecionadas no desafio com canamicina foram positivas. A amplificação foi confirmada com a presença de um fragmento de DNA com 2.000 pb correspondentes ao gene *cryIIa12* (Figura 16). O controle negativo foi feito com uma planta não submetida a transformação via tubo polínico. (Figura 16).



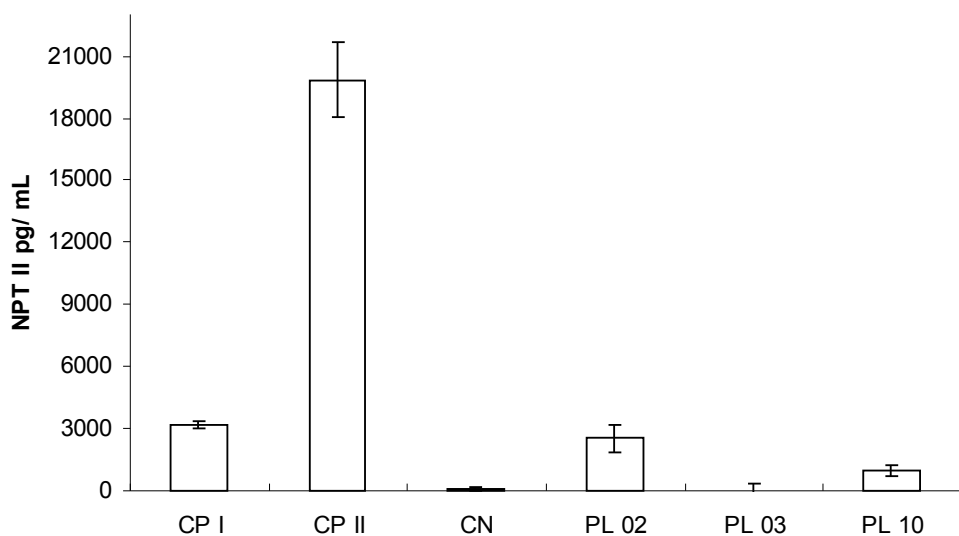
**Figura 16.** Análise por PCR de plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene *cryIIa12*. M, marcador; C+, controle positivo consistindo do plasmídeo do vetor utilizado na transformação; C-, controle negativo consistindo de planta de algodão não transformada; Plantas BRS Cedro 02, 03, 07, 09 e 10 transformadas com *cryIIa12* com a amplificação de um fragmento de 2000 pb correspondente ao gene *cryIIa12*.

A detecção da proteína NPTII foi feita com base na expressão do gene *nptII*. A detecção foi feita através do teste de ELISA da Agdia (Agdia Patho Screen *nptII*) e confirmou a presença do produto da transcrição do gene nas folhas de plantas de algodoeiro provenientes da transformação via tubo polínico. As plantas transgênicas apresentadas no teste de ELISA tinham sido resistentes aos desafios com canamicina e positivas por PCR. Das cinco plantas BRS Cedro transformadas com BTC1 e tarina que foram testadas, quatro mostraram um expressão que variou de 1.304 pg/ mL de extrato protéico (planta 56) a 11.405 pg/ mL (planta 09). Apenas a planta 59 teve uma expressão menor que o controle negativo (Figura 17).



**Figura 17.** Detecção da proteína NPTII por ELISA em plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene *btc1* + *tar*. CP I, controle positivo fornecido pelo kit para detecção de NPTII; CP II controle positivo, *Coffea arabica* transgênica; CN, controle negativo (algodão não transformado); PL 08, 09, 34, 56 e 59 plantas BRS Cedro transformadas com *btc1* + *tar* expressando a proteína NPTII.

Com relação à detecção da proteína NPTII para as plântulas provenientes da TVTP com o gene *cryIIa12*, das três plantas BRS Cedro testadas, a planta 02 mostrou uma expressão de 2.525 pg/ mL de extrato protéico, a planta 10 teve uma expressão de 958,75 pg/ mL de extrato protéico e a planta 03 teve um valor abaixo do valor encontrado para a planta não transformada (Figura 18).



**Figura 18.** Detecção da proteína NPTII por ELISA em plantas de algodão submetidas à TVTP com o gene *cryIIa12*. CP I, controle positivo fornecido pelo kit para detecção de NPTII; CP II controle positivo, *Coffea arabica* transgênica; CN, controle negativo (algodão não transformado); PL 02, 03 e 10 plantas BRS Cedro transformadas com *cryIIa12* expressando a proteína NPTII.

A variação nos níveis de expressão de transgenes já foi reportada por vários autores (DEROLES; GARDNER, 1988; ROBERT et al, 1989, PASCOAL, 1999). De acordo com Deroles e Gardner (1988), a expressão pode refletir diferentes sítios de integração, uma vez que diferentes regiões do genoma são expressas em níveis diferentes e durante diversos estágios do ciclo de vida do vegetal. A localização do transgene pode também determinar seu empacotamento em estruturas complexas da cromatina e, portanto, restringir sua acessibilidade a componentes celulares que realizam a transcrição e tradução (MEYER, 1995a, 1995b).

Segundo Wang e colaboradores (2004), a taxa de transformação da TVTP em algodoeiro é de 0,01 %. De acordo com Gong e colaboradores (1988) a frequência de transformação fica entre 0,5 a 1 %, com base nos cálculos de plântulas positivas do total de sementes germinadas. No presente trabalho, das 28.558 plântulas desafiadas com antibiótico, 63 plantas foram resistentes. Dessas, 12 tiveram o transgene confirmado através de análises de PCR, das quais 7, paralelamente, tiveram o transgene também confirmado por ELISA. Assim, a frequência de transformação é de 0,0245 %.

Este trabalho é a primeira tentativa de introdução dos genes *btc1/ tar* e *cryIIa12* em uma cultivar de algodão brasileiro, com níveis altos de resistência a viroses e ramulose como o BRS Cedro (RICHETTI et al, 2003). A abordagem apresentada neste trabalho foi a utilização da técnica de transformação via tubo polínico na engenharia genética do algodão como um recurso de proteção contra os dois insetos-praga mais importantes da cotonicultura brasileiras.

## 5.0 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.
6. As análise por canamicina e PCR sugere a existência de 12 plantas transgênicas, sendo que sete delas também são confirmadas por ELISA.
7. A transformação via tubo polínico se apresenta como uma alternativa aos métodos de transformação de algodão já existentes.

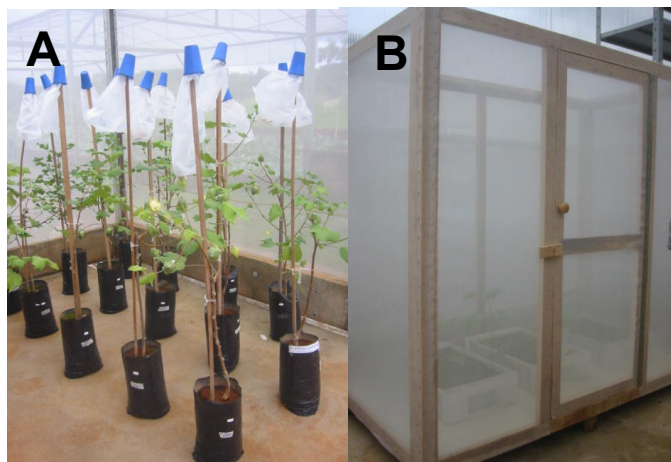
## 6.0 PERSPECTIVAS

As biotecnologias têm tido um grande impacto na produção mundial de algodão, pelo uso difundido de cultivares GMs tolerantes a herbicidas e/ou resistentes a lagartas.

Dentro deste contexto a tecnologia de transformação do algodão via tubo polínico representa uma nova perspectiva. Um ponto positivo para o desenvolvimento do projeto foi o estabelecimento das condições ótimas para a transformação de algodoeiro via tubo polínico.

A próxima etapa desse trabalho será a finalização das caracterização molecular das plantas resistente a antibióticos. Atualmente estão sendo feitas extrações e digestões de DNA dessas plantas para a confirmação do transgene por Southern blot. Com o Southern blot será possível verificar o número de cópias inseridas dos genes *btc1*, *tar1* e *cryIIa12*.

Nesta etapa será feito também o desafio *in vivo* das plantas transformadas que consistirá no desafio das plantas transgênicas com a presença do inseto-praga em gaiolas biológicas (Figura 19).



**Figura 19.** Plântulas de algodão provenientes da TVTP. **(A)** Plântulas resistentes a canamicina; **(B)** Gaiola biológica onde será feito o desafio *in vivo* contra o bicudo-do-algodoeiro. Fotos: Oliveira Neto, O. B., 2006, 2007.

Em ensaios preliminares com *Spodoptera frugiperda* já foi verificado uma promissora taxa de mortalidade das larvas. Ensaio semelhantes já estão sendo estabelecidos para o bicudo-do-algodoeiro.

A perspectiva deste trabalho é avaliar até 100 mil sementes possíveis de serem transformadas e ao longo do ano de 2007/2008 todos os transformantes passarão pela gaiola biológica. Muitos dos transformantes já produzirão sementes e estas sementes também serão avaliadas.

Atualmente está sendo preparado material para realizar transformação via tubo polínico utilizando diferentes construções. Uma dessas construções foi desenvolvida com um promotor, isolado do próprio algodoeiro (*uceA*), que direciona de forma específica a expressão do gene *cryIIa12* em botões florais, local de alimentação e desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro. A outra construção contém os genes *cryIIa12* e *btc1* sob o controle do promotor CaMV35Sd.

Os resultados obtidos neste trabalho serão de grande importância para o avanço do trabalho e contribuirá para o estabelecimento da técnica de transformação de algodão de uma forma mais rápida, segura e com o produto final esperado: o algodão transgênico.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbios GM Database. Disponível em: <<http://www.agbios.com/dbase.php>> Acesso em: Setembro 2007.

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

ARONSON, A.I., BECKMAN, W., DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, 50, 1-24, 1986.

AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: **Controle microbiano de insetos**. Editado por S.B. Alves. 2. Ed. FEALQ, Piracicaba, 239-267, 1998.

*Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Disponível em: <[http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)> Acesso em: Outubro 2007.

BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOLS, D., HOSOYA, M., VAN DAMME, E., PEUMANS, W. K., DE CLERCQ, E. The mannose-specific plant lectin *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Res.**, 18: 191-207, 1992.

BALZARINI, J., SCHOLS, D., NEYTS, J., VAN DAMME, E., PEUMANS, W., DE CLERCQ, E.  $\alpha$ -(1-3)- and  $\alpha$ -(1-6)-D-mannose-specific plant lectin are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 35, 410-6, 1991.

BELTRÃO, N. E. M., SOUZA, J. G. O **Agronegócio do Algodão no Brasil**. Embrapa: Brasília. cap.3, 55-54, 1999.

BEZERRA, I. C. **Caracterização de um gene da família de globulinas G1 de inhame (*Colocasia esculenta* L. Schott)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 1993.

BEZERRA, I. C., DE CASTRO, L. A. B., NESHICH, G., DE ALMEIDA, E. R. P., GROSSI DE SA, M. F., MELO, L. V., MONTE-NESHICH, D. C. A corm-specific gene encodes tarin,

a major globulina of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). **Plant Molecular Biology**, 28, 137-144, 1995.

BIRK, Y. The Bowma-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans, **International Journal of Peptide & Protein Research**, 25, 113–131, 1985.

BROADWAY, R. M., DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **J. Insect Physiol**, 32, 827–33, 1986.

CARNEIRO, M., RODRIGUES, C. A., DE CASTRO, L. A. B., DA SILVA, M. C., COUTINHO, M. V. Isolation and characterization of the major albumin from *Colocasia esculenta* corms. **Plant Science**, 67, 39-46, 1990.

CASTRO, L. A. B. Plantas transgênicas resistentes a insetos: Perspectivas e limitações. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília, 27, S/N: 319-424, 1992.

CHENG, J., BOLYARD, M. G., SAXENA, R. C., STTICLEN, M. B. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki*. **Plant Science**, 81, 83-91, 1992.

CONAB - COMPAHIA NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO.2006. Acesso em: Setembro 2006.

COSTA, S. R., BUENO, M. G. **A saga do algodão: das primeiras lavouras à ação na OMC**. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VANRIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. and Mol. Biol. Rev.**, 62, 807-813, 1998.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., LAMBERT, B., LERECLUS, D., GAWRON-BURKE, C., DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* cry genes, In: **Program and abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Society for Invertebrate Pathology**, Ithaca, USA, 14P., 1995.

DAYLER, C. S. A.; MENDES, P. A. M.; PRATES, M. V.; BLOCH JR, C.; FRANCO, O. L., GROSSI de SA, M. F. Identification of a novel bean a-amylase inhibitor with chitinolytic activity. **FEBS Letters**, 579 (25), 5616-2560, 2005.



DENG, D. W., GUO, S. D., YANG, Z. M. Study on the molecular cytological mechanism of cotton transformation by pollen tube pathway. **Scientia Agricultura Sinica**, 32(6), 113-114. 1999.

DEROLES, S. C., GARDNER, R. C. Expression and inheritance of kanamycin resistance in large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology**, 11, 355-364, 1988.

DIAS, J. M. C. S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesq. Agrop. Bras.** 27 (s/n), 59-76, 1992.

DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; MAGALHÃES, C. P.; OLIVEIRA NETO, O. B.; LAUMANN, R. A.; FIGUEIRA, E. L. Z.; MELO, F. R., GROSSI de SA, M. F. Molecular cloning and expression of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from rye with potential for controlling insect pests. **The Protein Journal**, 24 (2), 113-123, 2005.

DU, C., NICKERSON, K.W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62, 3722-3726, 1996.

FEITELSON, J. S., PAYNE, J., KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Bio-technology**, 10, 271-275, 1992.

FISCHHOFF, D. A., BOWDISCH, K. S., PERLAK, F. J., MARRONE, P. G., MCCORMICK, S. M., NIEDERMEYER, J. G., DEAN, D. A., DUSANO-KRETZMER, K., MAYER, E. J., ROCHESTER, D. E., ROGERS, S. G., FRALEY, R. T. Insect tolerant tomato plants. **Bio/Technology**, 5, 807-813, 1987.

FRANCO, O. L., Dos SANTOS, R. C, BATISTA, J. A. N., MENDES, A. C. M., De ARAÚJO, M. A. M., MONNERAT, R. G., GROSSI-DE-SÁ, M. F., and De FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, 63, 343-349, 2003.

GALLO, D. et al., **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p. 2002.

GATEHOUSE, A. M. R., HILDER, V. A., BOULTER, D. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: **Biotechnology in Agriculture n° 7: Plant Genetic Manipulation for crop protection**, CAB International, 155-181, 1992.

GATEHOUSE, A.M.R., K.S., POWELL, W.J., PEUMANS, E.J.M. VAN DAMME, J.A., GATEHOUSE. Insecticidal properties of plant lectins. Their potential in plant protection. In: **Lectins: Biochemical Perspectives**. Pusztai, A., Bardocz, eds. London, Francis & Taylor, pp. 35-57, 1995.

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.

GOUNARIS, Y; GALANOPOULOU, S.; GALANOPOULOS, N.; LADOPOULOS, A.; MICHAILIDIS, Z.; THEOPHILOU, S. Pollen-mediated genetic transformation of cotton with the *Arabidopsis thaliana* *hmgr* cDNA using the particle gun. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 3 (2), 157–160. 2005.

GRIMES, D. W., EL-ZIK, K. M. Cotton. In: **Irrigation of agricultural crops**. Stewart, B. A.; Nielsen, D. R. eds. Wisconsin: [s.n.], 741-773 (Série Agronomy, 30). 1990.

GUIMARÃES, R. L. Expressão de um gene que codifica uma proteína de reserva de corno de inhame (*Colocasia esculenta*) em batata (*Solanum tuberoso*) e fumo (*Nicotiana tabacum*). Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 1996.

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.

HARVEY, W. R. Physiology of V-ATPases. **J. Exp. Biol.** 172, 1-17, 1992.

HILBECK, A., ANDOW, D. A., FONTES, E. M. G. Environmental risk assessment of genetically modified organisms. Vol. 2, **Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. CABI Publishing. UK. 373p, 2006.

HILDER, V. A., BARKER, R. F., GATEHOUSE, A. M. R., BOULTER, D. Potential for exploiting plant genes to genetically engineer insect resistance, exemplified by cowpea trypsin inhibitor gene. **Pestic. Sci.**, 27: 165-171, 1989.

HILDER, V., GATEHOUSE, A., SHEERMAN, S., BARKER, R. and BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, 330, 160-163, 1987.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2004. ISAAA Briefs No. 33. ISAAA, Ithaca, New York, 2004.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief n° 35, 2006. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em <<http://www.isaaa.org>> Acesso em: Setembro 2006, 2006.

JAMES, C. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2005. ISAAA Briefs No. 34. ISAAA: Ithaca, NY. 2005.

JANSEN, D. H. Lectins and plant-herbivore interactions. In: **Recent Advance in Phytochemistry, vol. 15: The phytochemistry of cell recognition and cell surface interactions**, Loewes, F. A., Ryan, C. A., eds. Plenum Press, 241-258, 1981.

JIA, S. R. Mechanism of T-DNA transfer. **Plant Physiol Commun**, 30(4), 306-312, 2004.

JOFUKU, K. D., SCHIPPER, R. D., GOLDBERG, R. B. A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin mRNA accumulation in soybean embryos. **Plant Cell**, 1, 427-435, 1989.

JOHNSON, D. E., McGAUGHEY, W. H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indian meal moth larvae. **Curr. Microbiol.** **33**, 54-59, 1996.

JOHNSON, R., NARVAEZ, J., GYHEUNG, A., RYAN, C. A. Expression of proteinases inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **PNAS**, 86, 9871-9875, 1989.

JOUANIN, L., BONADE-BOTTINO, M., GIRARD, C., MORROT, G., GIBAMD, M. Transgenic plants for insect resistance-Review. **Plant Science**, 131, 1-11, 1998.

KNOWLES, B. H., ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, 924, 509-518, 1987.

KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V. G.; DAS, D. K.; GUPTA, S. K.; REDDY, V. S.; BAHTNAGAR, R. R., LEELAVATHI, S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Rep.**, 21, 635-639, 2003.

LASKOWSKY, M., KATO, I. Protein Inhibitors of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.** 230, 504-510, 1980.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; PASCOAL, A. et al. Transgenic tobacco plants expressing Tarin 1 inhibit the growth of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and the development of Spodoptera frugiperda. **Annals of Applied Biology**, Inglaterra, 143, 349-357, 2003.

Lectines Database. Disponível em: <<http://www.cermav.cnrs.fr/lectines>>. Acesso em: Setembro 2007.

LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V. G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G. P.; BHATNAGAR, R. K., REDDY, V. S. A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Rep.**, 22, 465-470, 2004.

LI, Z. L. **Cotton Morphology**. Beijing: Science Press, 113-126. 1979.

LIENER, I. E., KAKADE, M. L. Protease inhibitors. In: **Toxic constituents of plant foodstuffs**, Liener, I. E. ed., 2 ed., New York, 1980.

LIENER, I. E. Lectins. In: **Herbivores their interactions with secondary plant metabolites**, Rosenthal, G. A., Berenbaum, M. R. eds. Academic Press Inc., San Diego, 327-353, 1991.

McMANUS, M. T., WHITE, D. W. R., MCGREGOR, P. G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Res.** 3, 50-58, 1994.

MEYER, P. Understanding and controlling transgene expression. **Trends in Biotechnology**, 13, 332-337, 1995a.

MEYER, P. Variation of transgene expression in plants. **Euphytica**, 85, 359-366. 1995b.

MONTE-NESHICH, D. M., ROCHA, T. L., GUIMARÃES, R. L., SANTANA, E. F., LOUREIRO, M. E., VALLE, M., GROSSI DE SA, M. F. Characterization and spacial localization of the major globulins families of Taro (*Colocasia esculenta* L.) tubers. **Plant Science**, 112, 149-159, 1995.

MORHY, L., VENTURA, M.M. The complete amino acid sequence of the *Vigna unguiculata* (L.) Walp. seed trypsin and chymotrypsin inhibitor. **An. Acad. Brasil. Cienc.** 59, 71-81, 1987.

NAKANO, O.; MARCHINI, L. C.; BATISTA, G.C. Pragas do algodoeiro. In: **Curso de entomologia aplicada à agricultura**. Piracicaba, FEALQ, 219-246, 1992.

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.

Nuffield Council on Bioethics. **The use of genetically modified crops in developing countries**. 2004. Disponível em: <<http://www.nuffieldbioethics.org>>. Acesso: Agosto 2007.

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),1235-1242, 2004a.

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., FALCAO, 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: **Cotton: Origin, History, Technology, and Production**, Smith, C. W., Cothren, J.T. eds., New York. 175-206. 1999.

ORF, J. H., HYMOWITZ, T. Inheritance of the absence of the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybean. **Crop Science**, 19, 107-9, 1979.

Organisation Mondiale De La Sante (OMS). Report of an Informal Consultation on the Detection, Isolation, Identification and Ecology of Biocontrol Agents of Disease Vectors. **UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in tropical Diseases**, TDR/BCV/IC-GE/87.3, 41 p., 1987

PAPA, G. Pragas e seu controle. In: **Algodão – Pesquisas e Resultados para o Campo**. Fundo de Apoio à Cultura do Algodão – FACUAL, ed. Cuiabá: FACUAL, 392p. 2006.

- PASCOAL, A. V. Expressão da lectina Tarina 1 de *Colocasia esculenta* em *Nicotiana tabacum*. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 1996.
- PEAUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, 109, 347-352, 1995.
- PEREIRA, R. A., BATISTA, J. A. N., SILVA, M. C. M., OLIVEIRA NETO, O. B., FIGUEIRA, E. L. Z., JIMENEZ, A. V., GROSSI DE SA, M. F. An alpha-amylase inhibitor gene from *Phaseolus cocconeus* encodes a protein with potential control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, 67, 2009-2016, 2006.
- PERLAK F. J., DEATON, R. W., ARMSTRONG, T. A., FUCHS, R. L., SIMS, S. R., GREENPLATE, J. T., FISCHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. **Biotechnology** 8, 939-943, 1990.
- PEUMANS, W. J., BARRE, A., HAO, Q., ROUGÉ, P., VAN DAMME, E. J. M. Higher Plants Developed Structurally Different Motifs to Recognize Foreign Glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. 12 (64), 83–101, 2000.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in food. **Trends in Food Science & Technology**, 7, 132-138, 1996.
- POWELL, K. S., SPENCE, J., BARATHI, M., GATEHOUSE, J. A., GATEHOUSE, A. M. R. Immunohistochemical and development studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. **J. Insect Physiol.**, 44, 529-539, 1998.
- QUINTANILHA, A., D'ÊÇA, L. S., CABRAL, A. Desenvolvimento do botão floral do algodoeiro em função do tempo. **Boletim da Sociedade Broteriana**, 36(2), 189-215, 1962.
- REECK, G. R., KRAMER, K. J., BAKER, J. E., KANOST, M. R., FABRICK, J. A. and BEHNKE, C. A. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In: **Advances in Insect Control: the Role of Transgenic Plants**. Eds. Carozzi, N. and M. G. Koziel. Taylor and Francis, London, 157-183, 1997.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: **Meth. Plant Biochem.** 5, New York: Acad. Press, 295–305, 1991.
- RICHETTI, A., ARAÚJO, A. E., MORELLO, C. L., DA SILVA, C. A. D., et al., **Cultura do Algodão no Cerrado** Sistemas de Produção, 2. Gomes, N. M. S., S. Filho, G. F. eds. Versão

Eletrônica Jan/2003. Disponível em: <  
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/index.htm>> Acesso: agosto 2007.

ROBERT, L. S., THOMPSON, R. D., FLAVELL, R. B. Tissue-specific expression of a wheat high molecular weight glutenin gene in transgenic tobacco. **The Plant Cell**, 1, 569-578, 1989.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Ann. Rev. Phytopath.** 28, 425-440, 1990.

RYAN, C. A. Proteinase Inhibitors. In: Marcus, A. **The Biochemistry of Plants** 6, New York, Acad. Press, 351-370, 1991.

SAUER, J. D., **Historical Geography of Crop Plants – a select roster**. CRC Press., 1994.

SAUVION, N., RAHBE', Y., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M., GATEHOUSE, J. A., GATEHOUSE, A. M. R. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomol Exp Appl.**, 79, 285-293, 1996.

SHARMA, A., CHANDRAN, D., SINGH, D. D., VIJAYAN, M. Multiplicity of carbohydrate-binding sites in  $\beta$ -prism fold lectins: occurrence and possible evolutionary implications. **J. Biosci.** 32(6), 1089-1110, 2007.

TAI, H., MICHENRY, L., FRITZ, P., FURTEK, D. Nucleic acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitors (Kunitz) family of protease inhibitors. **Plant Mol. Biol.** 16, 913-915, 1991.

THOMAS, J. C., ADAMS, D. G., KEPPENE, V. D., WASMANN, C. C., BROWM, J. K., KANOST, M. R. and BOHNERT, H. J. Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. **Plant Cell Rep.**, 14, 758-762, 1995.

VAN DAMME, E. J. M., ASTOUL, C. H., BARRE, A., ROUGE', P., PEUMANS, W. J. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). **Eur. J. Biochem.** 267, 5067-5077, 2000.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., BEMER, V., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are two most prominent proteins in bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Molecules Biology**, 29, 579-598, 1995.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17, 575–692, 1998b.

VAN DAMME, E. J. M., SMEETS, K., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of mannose-binding lectins from the Orchidaceae species *Listera ovata*, *Epipactis helleborine* and *Cymbidium* hybrid. **European Journal of Biochemistr**, 221, 769-777, 1994.

VAN DAMME, E. J. M., ALLEN, A. K., PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Letters**, 215, 140-144, 1987.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., BEMER, V., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Mol. Biol.**, 29, 579-598, 1995.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A., BARDOCZ, S. **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications**. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1998a.

VENTURA, M. M., XAVIER-FILHO, J., MOREIRA, R. A., AQUINO, A. M., PINHEIRO, P. A. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from blackeyed pea (*Vigna sinensis* L.). II. Further studies on its characterization and a reevaluation of earlier results. **An. Acad. Bras. Cienc.** 43 (1), 233–242, 1971.

VODKIN, L. O. Isolation and characterization of messenger RNAs for seed lectin and Kunitz inhibitor in soybeans. **Plant Physiol.** 68, p. 766-771, 1981.

WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of microbiology**, 40, 549-576, 1986.

WILSON, F. D., FLINT, H. M., DEATON, W. R., FISHCHOFF, D. A., PERLAK, F. J., ARMSTRONG, D. A., FUCHS, R. L., BERBERICH, S. A., PARKS, N. J. and STAPP, B. R. Resistance to cotton lines containing a Bt toxin to pink bollworm and other insects. **J. Econ. Entomol.**, 85, 1516-1521, 1992.

WOLFERSBERGER, M. G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. **J. Exp. Biol.**, 172, 377-386, 1992.



XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F. A. P. Proteinase Inhibitors. In: **Toxicants of plant origin**, Cheeke, P.R., Ed., Boca Raton, CCR Press, 3, 1–27, 1989.

XAVIER-FILHO, J., VENTURA, M. M. Trypsin inhibitors in cowpea: a review. **Comments on Agricultural & Food Chemistry**, 1, 239–264, 1988.

WANG, Y. Q., CHEN, D. J., WANG, D. M., HUANG, Q. S., YAO, Z. P., LIU, F. J., WEI, X. W., LI, R. J., ZHANG, Z. N., SUN, Y. R. Over-expression of Gastrodia anti-fungal protein enhances Verticillium wilt resistance in coloured cotton. **Plant Breeding**, 123, 454-459, 2004.

ZHAO, J. Z.; ZHAO, K. J.; LU, M. G.; FAN, X. L., GUO, S. D. Interactions between *Helicoverpa armigera* and transgenic *Bt* cotton in North China. **Sci. Agric. Sin.**, 31, 1-6, 1998.

ZHOU, G., WANG, J., ZENG, Y., HUANG, J., QIAN, S., AND LIU, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Meth. in Enzymol.**, 101, 433-448, 1983.

## **8.0 PUBLICAÇÕES**

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

**Raquel Sampaio de Oliveira<sup>2</sup>**  
**Osmundo Brilhante 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 Leonardez<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>**

**Brasília, DF, 09 de outubro de 2007**

- <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
- <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
- <sup>4</sup>Professor. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China. jaasiicb@public1.ptt.js.cn
- <sup>5</sup>Biólogo, Mestre em Bioquímica, Doutorando em Biologia Molecular na Universidade de Brasília. 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
- <sup>7</sup>Biólogo, Mestre em Genética, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas. Professor da Universidade Católica de Brasília. 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
- <sup>9</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. marisevcv@cenargen.embrapa.br
- <sup>10</sup>Biólogo, Mestre em Biologia Molecular, Bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. aamerico@gmail.com
- <sup>11</sup>Bióloga, Mestre e Doutora em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. cristina@cenargen.embrapa.br
- <sup>12</sup>Biólogo, Doutor em Bioquímica, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 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

## **ÍNDICE**

Resumo	<b>6</b>
Abstract	<b>7</b>
<b>1.0</b> Introdução	<b>8</b>
<b>1.1</b> Estrutura reprodutiva do algodoeiro	<b>8</b>
<b>1.2</b> Desenvolvimento do botão floral e do embrião em função do tempo e a TVTP	<b>10</b>
<b>1.3</b> Processo de floração e fecundação do algodoeiro	<b>12</b>
<b>1.4</b> Mecanismo de TVTP	<b>14</b>
<b>1.5</b> Transformação do algodoeiro via tubo polínico	<b>15</b>
<b>1.6</b> Fatores que afetam a eficiência da tecnologia TVTP	<b>16</b>
1.6.1 Vantagens da utilização da TVTP	<b>16</b>
1.6.2 Desvantagens da utilização da TVTP	<b>16</b>
<b>1.7</b> Procedimentos para aplicação das microinjeções	<b>17</b>
<b>1.8</b> Caracterização do gene alvo nos transformantes	<b>18</b>
<b>2.0</b> Otimização da técnica de TVTP em plantas de algodoeiro cv. Cedro às condições brasileiras	<b>20</b>
<b>2.1</b> Material e métodos	<b>20</b>
2.1.1 Material vegetal	<b>20</b>
2.1.2. Desenho experimental	<b>21</b>
2.1.3 Construção gênica utilizada	<b>21</b>
2.1.4 Aplicação das microinjeções	<b>22</b>
<b>2.2</b> Resultados e discussão	<b>24</b>
<b>2.3</b> Conclusão	<b>30</b>
<b>3.0</b> Referências bibliográficas	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Secção longitudinal da flor do algodoeiro após a antese	<b>9</b>
<b>2</b>	Desenho esquemático do ovário indicando o grão de pólen com o tubo polínico desenvolvido	<b>10</b>
<b>3</b>	Estágios fenológicos do algodoeiro. Na parte superior da figura a antese em relação o desenvolvimento inicial do botão floral ( <b>dia -26</b> ) e a colheita dos capulhos ( <b>dia +45</b> )	<b>12</b>
<b>4</b>	Diferentes estádios apresentados pela flor do algodoeiro. <b>(A)</b> Flor antes da antese. <b>(B)</b> Flor um dia após a antese. <b>(C)</b> Flor dois dias após a antese	<b>13</b>
<b>5</b>	Desenho esquemático de um grão de pólen sobre o estigma iniciando o desenvolvimento do tubo polínico	<b>13</b>
<b>6</b>	Desenho esquemático do processo de fertilização da flor do algodoeiro	<b>14</b>
<b>7</b>	Preparação de uma maçã para a microinjeção. Pétalas com estigma e estames são retiradas para a exposição da jovem maçã	<b>17</b>
<b>8</b>	Aplicação da microinjeção. A seringa deve formar uma reta com o tubo polínico. Desvio nesta reta significa invasão dos lóculos com consequência no abortamento e na inserção do DNA heterólogo no genoma do algodão	<b>18</b>
<b>9</b>	Construção com os genes <i>btc1</i> e <i>tarina</i> codificadores de proteínas inseticidas sob domínio do promotor 35Sd	<b>23</b>
<b>10</b>	Taxa de abortamento de maçãs de algodão	<b>28</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Efeito da microinjeção no abortamento de maçã de algodão	<b>26</b>
<b>2</b>	P-Valor, por meio do teste de Qui-Quadrado, entre os tratamentos utilizados, para a variável <i>taxa de abortamento</i>	<b>27</b>

## 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 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-algodoeiro. 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.

## 1.0 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 agrônômicas 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.

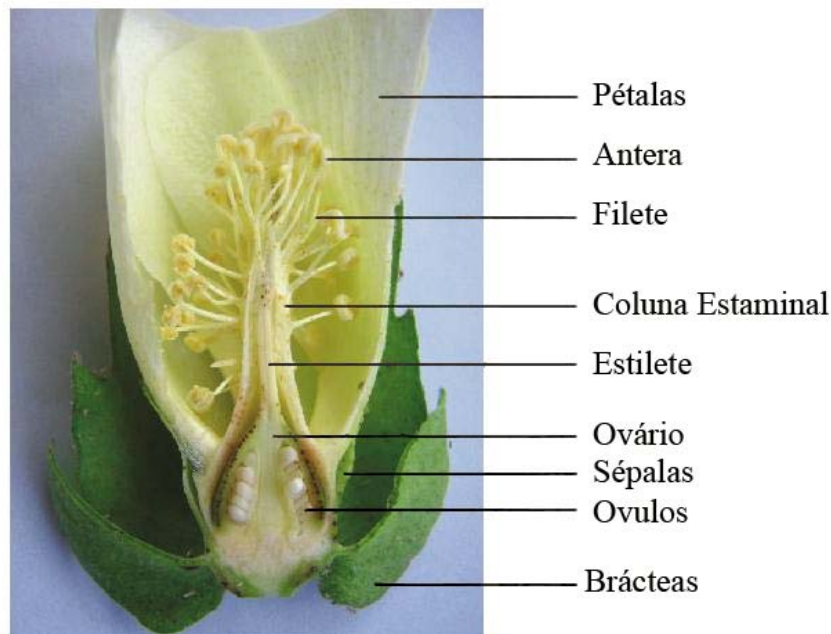
### 1.1 Estrutura reprodutiva do algodoeiro

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 contem 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

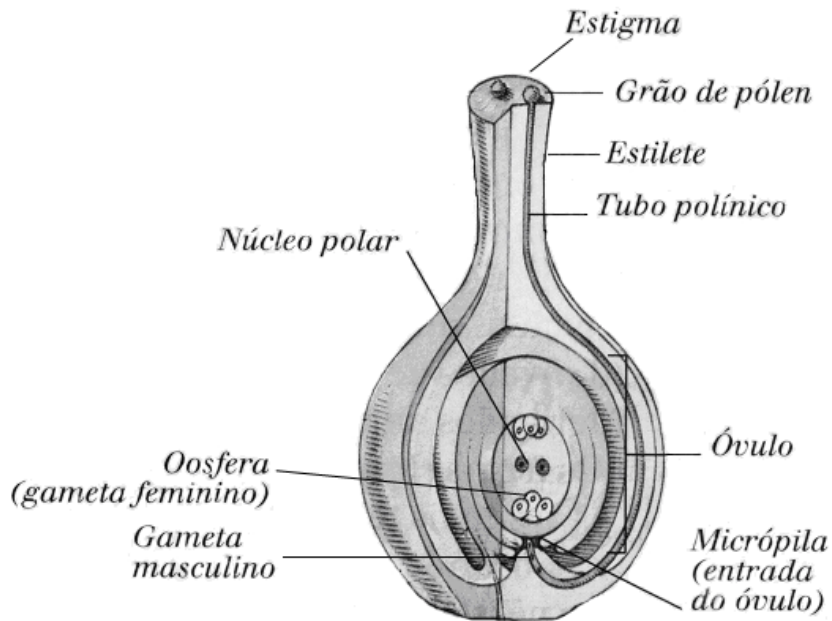
surgimento de uma flor para outra no mesmo ponto de frutificação entre dois ramos é, em média, de três dias e de seis dias entre duas flores no mesmo ramo.



**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 *via 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 morfológicamente 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.

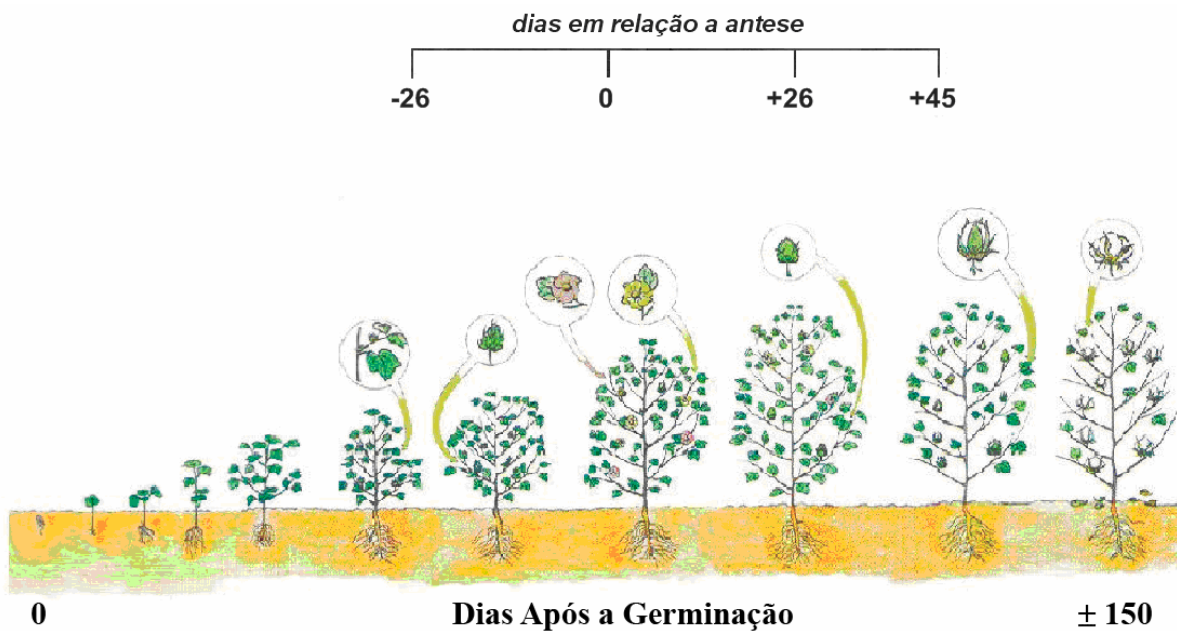
**Dia +2:** O ovo fecundado permanece indiviso e sem deposição de parede celular. O albúmen continua a desenvolver-se, por meio de divisões rápidas dos seus núcleos, e vai digerindo, pouco a pouco, o tecido do nucelo. Os tegumentos começam a espessar-se. Mesmo em óvulos não fecundados a fibra cresce 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.

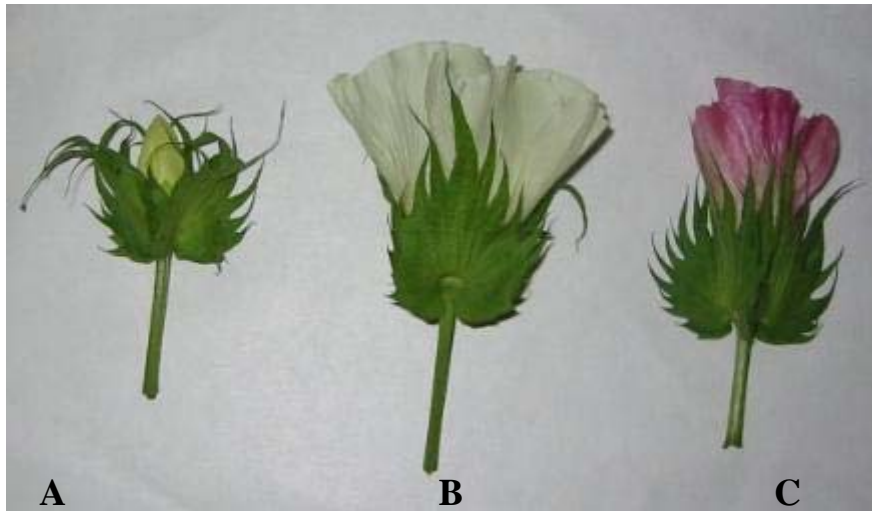
A presença da parede celular que consiste na maior resistência a obtenção de plantas transgênicas, no algodoeiro os seus depósitos se iniciam entre os dias **+10** e **+12**. Assim, a parede celular não constitui um problema na TVTP. Segundo Quintanilha e colaboradores (Quintanilha *et al.*, 1962), as 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 capulhos (**dia +45**).

### 1.3 Processo de floração e fecundação do algodoeiro

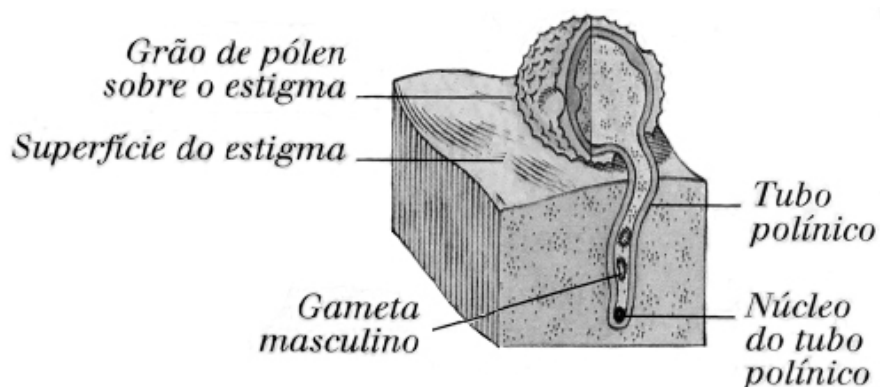
Após cerca de 40 dias da iniciação do botão floral, a flor madura está pronta para a abertura (antese). Na tarde anterior do dia da antese as pétalas se alongam. As flores geralmente abrem das 7 às 9 da manhã do dia seguinte. Temperaturas elevadas irão resultar na antecipação da abertura floral e baixas 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, contém 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.

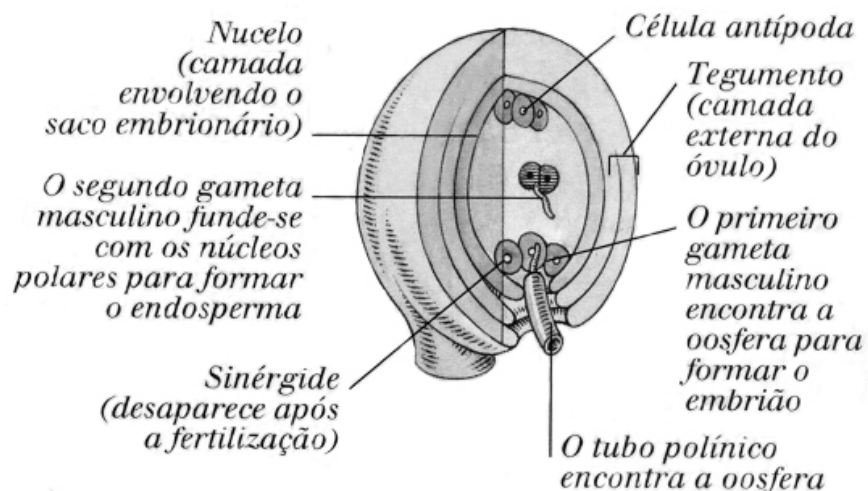


**Figura 5.** Desenho esquemático de um grão de pólen sobre o estigma iniciando o desenvolvimento do tubo polínico.

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 seringa deve formar uma reta com o tubo polínico. O desvio nesta reta significa invasão dos lóculos, com conseqüência no abortamento e na inserção do DNA heterólogo no genoma do algodão.

**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.

### **2.1 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;

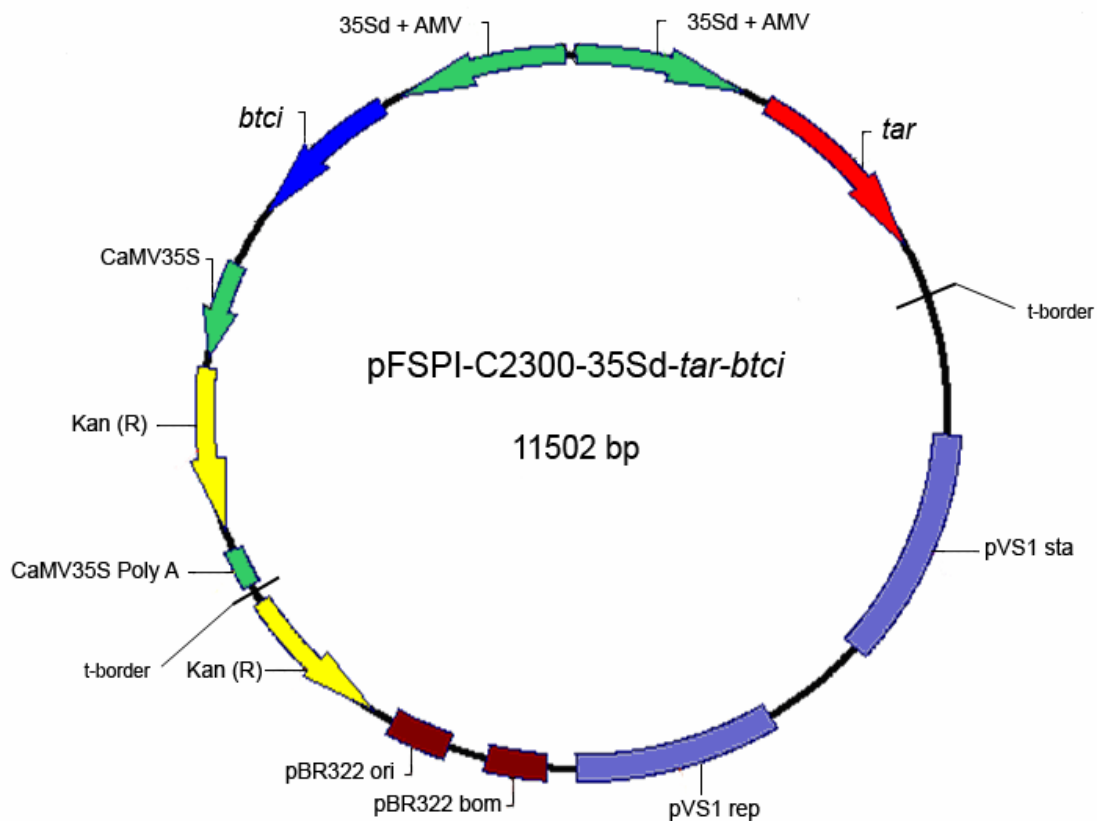
**5 – DNA Vaselina (DNAV):** grupo de plantas que tiveram 10 maçãs microinjetadas com a construção gênica no período de 20 às 23:00 h, e após a microinjeção tinha o orifício deixado pela agulha selado com vaselina;

**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 *btci* 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  $10 \mu\text{L}$  da solução do DNA fosse liberado no ovário. A concentração do DNA plasmidial utilizada foi de  $0,1$  a  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ou seja,  $1$  a  $2 \mu\text{g}$  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.

## 2.2 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 agronômicos 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 consequência 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 construção gênica no período de 08 às 11:00 horas.

<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>

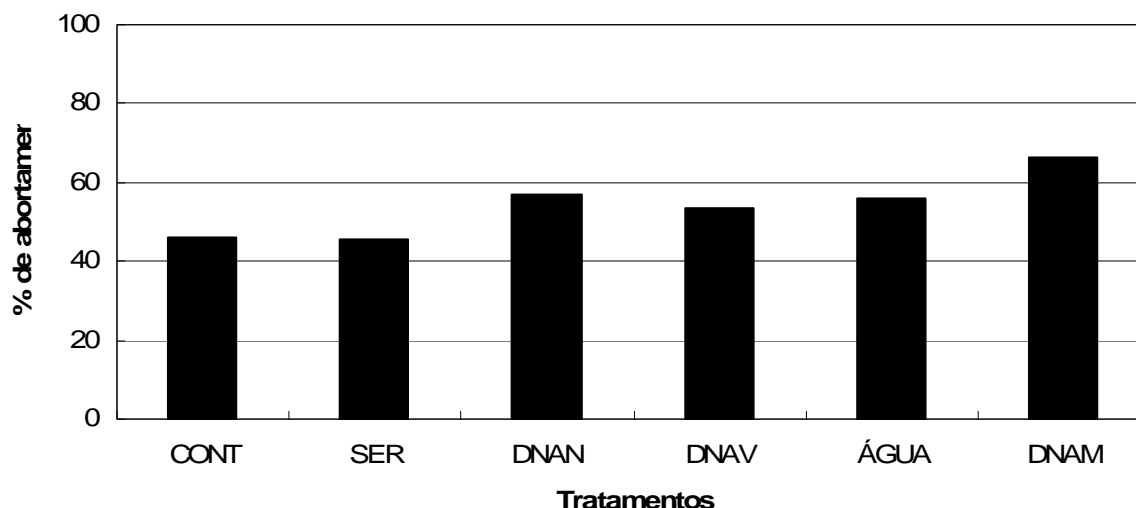
A menor taxa de abortamento observada foi no tratamento CONT com 46,25 % (**Tabela 01**). Neste tratamento as maçãs eram apenas etiquetadas e não foram submetidas à aplicação de microinjeções. O objetivo do tratamento controle foi verificar a taxa de abortamento natural no algodoeiro, nas nossas condições, 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 influencia 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.



### 3.0 Referências bibliográficas

- 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 CryIIa-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., Frago, 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.

## **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

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN

## Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a CryIIa-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain

Maria Fatima Grossi-de-Sa<sup>1,4,\*</sup>, Mariana Quezado de Magalhães<sup>1,2</sup>, Marilia Santos Silva<sup>3</sup>, Shirley Margareth Buffon Silva<sup>1</sup>, Simoni Campos Dias<sup>1,4</sup>, Erich Yukio Tempel Nakasu<sup>2</sup>, Patrícia Sanglard Felipe Brunetta<sup>1,4</sup>, Gustavo Ramos Oliveira<sup>2</sup>, Osmundo Brilhante de Oliveira Neto<sup>1,4,5</sup>, Raquel Sampaio de Oliveira<sup>1,4</sup>, Luís Henrique Barros Soares<sup>2</sup>, Marco Antônio Zachia Ayub<sup>2</sup>, Herbert Alvaro Abreu Siqueira<sup>1</sup> and Edson L.Z. Figueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5, Brasília - DF, Brazil

<sup>2</sup>UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil

<sup>3</sup>Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, P. O. Box 08223, Planaltina - DF, Brazil

<sup>4</sup>Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília - DF, Brazil

<sup>5</sup>UNIEURO, Brasília - DF, Brazil

Received 30 January 2007, Accepted 7 May 2007

Different isolates of the soil bacterium *Bacillus thuringiensis* produce multiple crystal (Cry) proteins toxic to a variety of insects, nematodes and protozoans. These insecticidal Cry toxins are known to be active against specific insect orders, being harmless to mammals, birds, amphibians, and reptiles. Due to these characteristics, genes encoding several Cry toxins have been engineered in order to be expressed by a variety of crop plants to control insect-pests. The cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, are the major economically devastating pests of cotton crop in Brazil, causing severe losses, mainly due to their endophytic habit, which results in damages to the cotton boll and floral bud structures. A *cryIIa*-type gene, designated *cryIIa12*, was isolated and cloned from the *Bt* S811 strain. Nucleotide sequencing of the *cryIIa12* gene revealed an open reading frame of 2160 bp, encoding a protein of 719 amino acid residues in length, with a predicted molecular mass of 81 kDa. The amino acid sequence of CryIIa12 is 99% identical to the known CryIIa proteins and differs from them only in one or two amino acid residues positioned along the three domains involved in the insecticidal activity of the toxin. The recombinant CryIIa12 protein, corresponding to the *cryIIa12* gene expressed in *Escherichia coli* cells, showed moderate toxicity towards first instar larvae of both cotton boll weevil and fall armyworm. The highest concentration of the recombinant CryIIa12 tested to

achieve the maximum toxicities against cotton boll weevil larvae and fall armyworm larvae were 230 µg/mL and 5 µg/mL, respectively. The herein demonstrated insecticidal activity of the recombinant CryIIa12 toxin against cotton boll weevil and fall armyworm larvae opens promising perspectives for the genetic engineering of cotton crop resistant to both these devastating pests in Brazil.

**Keywords:** *Anthonomus grandis*, *Bt* toxin, Coleoptera, Cotton, CryIIa, *E. coli* expression, Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda*

### Introduction

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a well-known entomopathogen, is a Gram-positive spore-forming bacterium, which forms parasporal crystal (Cry) protein inclusions during the stationary growth phase (Bravo *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998). These crystal inclusions are produced by one or more insecticidal proteins, which can exhibit toxicity and specificity toward a select group of Lepidopteran, Coleopteran and Dipteran insect species. The crystals are solubilized by the alkaline conditions existing in the midgut lumen of susceptible insect larvae, releasing Cry protoxins, which are enzymatically processed and converted into active Cry toxins (de Maagd *et al.*, 2003). After activation the toxins interact with specific cell surface docking molecules and destroy the brush border membrane integrity by pore formation. These pores disrupt the osmotic regulation of the insect intestinal epithelium resulting in cell

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 55-61-3448-4705; Fax: 55-61-3340-3624  
E-mail: fatimasa@cenargen.embrapa.br

swelling, eventual cell lysis and insect death (Hofmann *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1993; Knowles, 1994).

Microbial insecticide formulations based on *Bt* are used worldwide as biopesticides and different *cry* genes encoding toxic Cry proteins showed great potential in the control of several economically devastating insect-pests when bioengineered in crop plants (Betz *et al.*, 2000; Chattopadhyay *et al.*, 2004). To date, many plant species have been genetically modified with *cry* genes, resulting in transgenic plants with high level of resistance to insect pests (Hilder and Boulter, 1999; Van Rie, 2000; Christou *et al.*, 2006).

The cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), are devastating cotton pests responsible for more than 50% of insecticide costs in Brazilian cotton crop fields. Moreover, the endophytic habit of the *A. grandis* larvae inside floral buds results in destruction of the fiber quality, hampers the chemical control, causing considerable yield losses (Haynes *et al.*, 1992). The most promising cost-effective and sustainable method to control cotton boll weevil is the development of genetically resistant cotton lines that suppress the insect larval development.

*Bacillus thuringiensis* S811 is a novel Brazilian soil isolated strain, with toxicity against Lepidoptera and Coleoptera, including *S. frugiperda* and *A. grandis* insect-pests (Martins *et al.*, 2005a; Quezado, 2006). Among c.a. 40 Cry1-type proteins described to date in "The *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database" ([http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/science/research/netintro99\\_e.html](http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/science/research/netintro99_e.html)), the majority of them is active against Lepidoptera species, whereas few reports have shown that Cry1-type proteins are also toxic against Coleopteran species. Tailor *et al.* (1992) showed that the formally designated Cry5 toxin, presently designated as Cry1Ia1 toxin (Crickmore *et al.*, 1998), is toxic to both Lepidoptera and Coleoptera. In respect to *Spodoptera* species, *Spodoptera litura* has been shown to be susceptible to a Cry1Ia-type protein (Sasaki *et al.*, 1996).

Searching for novel sources of *cry* genes encoding new Cry toxins active against cotton insect-pests important within Brazil, a *cryIIa12*-type gene was isolated from the Brazilian S811 *Bt* strain. Herein, we report the cloning and characterization of the *cryIIa12* gene, its expression in *E. coli* cells and also its insecticidal specificities and activities towards both *A. grandis* and *S. frugiperda* cotton insect-pests.

## Materials and Methods

**Bacteria strain.** The *B. thuringiensis* S811 Brazilian strain obtained from Embrapa Genetic Resources and Biotechnology collection (*Bt* germoplasm bank, Brasília, Brazil- <http://sicol.cria.org.br/crb/BGB>) was used for to isolate the *cryIIa12* gene. This strain was selected based on its toxicity towards cotton boll weevil (*A. grandis*), determined through selective bioassay (Quezado, 2006).

**Isolation of a *cryII* gene from the *B. thuringiensis* strain S811.** *B. thuringiensis* strain S811 cells, grown in 30 mL of NYSM

medium (0.8% nutritive broth, 0.1% yeast extract, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% CaCO<sub>3</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.001% MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 0.001% ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0) for 12 h at 200 rpm and 30°C, were centrifuged and the pellets were kept at -20°C for DNA extraction. The CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) method (Doyle and Doyle, 1987) was used for total DNA isolation from the *B. thuringiensis* strain S811 cells. Polymerase Chain Reaction (PCR) using a general primer set to detect *cryI* genes was used to detect *cryI*-type genes within the *B. thuringiensis* strain S811 total DNA (Ceron *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 1998). In order to identify *cryII*-type genes among the *cryI*-type genes detected in *B. thuringiensis* strain S811 total DNA, primers to amplify complete *cryII*-type genes (i.e. from the start codon till the stop codon) were designed on the basis of multiple alignment of all previously described *cryII* and the consensus sequences of their N- and C-terminal coding regions. PCR were performed using these primers designed to amplify complete *cryII* genes (forward primer: 5'-ATGAACTAAAGAATCAAGATAAG C-3', reverse primer 5'-CTAGATGTTACGCTCAATATGG-3'), 30 cycles of amplification at 42°C annealing temperature and high fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen). The resulting PCR fragment was excised from the gel and purified using the GeneClean® II Kit (Q-BIOGene), following the manufacturer's instruction.

The complete *cryIIa12* gene sequence was amplified and cloned using specific forward 5'-ATGAACTAAAGAATCAAGATAAG GC-3' and reverse 5'-CTAGATGTTACGCTCAATATGG-3' PCR primers, designed on the basis of highly conserved N-terminal and C-terminal coding regions after alignment of all previously described *cryII* sequences.

**Cloning, sequencing and sequence analysis of the *cryIIa12* gene from the *B. thuringiensis* strain S811.** The purified PCR fragment putatively corresponding to a *B. thuringiensis* strain S811 *cryII* gene was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Maldison, WI, USA) and used to transform *E. coli* XL1 Blue cells. The clone was sequenced using an ABI 3700 automated sequence analyzer (Applied Biosystem Perkin Elmer). Computer analyses of the cloned DNA sequence were done using the GCG software package (Genetics Computer Group, University of Wisconsin). Databank comparisons of the cloned DNA sequence with other published *cry* sequences were made using the BLASTx software from the NCBI databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The Conserved Domain Database search (CDD-search) from the NCBI site was used to compare motif identity and similarity with the clone DNA sequence and known conserved domains. Sequence alignments and dendrograms were obtained by using CLUSTAL W software and were edited with the BOXSHADE software ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form)). Dendrograms were edited using the TreeView software (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx>). The molecular mass and predicted *pi* of the clone deduced protein sequences were determined by the Protein Machine software available at the EXPASY site (<http://us.expasy.org/tools/>). The clone reported here was identified as a novel *cryIIa* gene from the *B. thuringiensis* strain S811 and was named *cryIIa12*. The sequence of the *cryIIa12* gene was submitted to the GeneBank, being AY788868 the assigned accession number.

**Construction of *E. coli* expression vector pET101-*cryIIa12*.** *E. coli* XL1 Blue cells containing the *cryIIa12* gene cloned into the pGEM-T Easy vector were grown in Luria-Bertani (LB) medium in the presence of 100 µg/mL ampicillin, for 14-16 h at 37°C and the plasmid DNA was isolated using the chloroform: isoamyl alcohol method (Sambrook *et al.*, 2001). PCR was performed using the isolated plasmid as template, the forward primer 5'-CACCATGAACTAAAGAATCAAGATAAGC-3', the reverse primer 5'-TTCTGCCTCATATGTTACTTCTACC-3', 30 cycles of amplification at 50°C annealing temperature and high fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen). The resulting PCR fragment was excised from the gel and purified using the GeneClean® II Kit (Q-BIOGene), following the manufacturer's instruction. The purified PCR fragment was subcloned into the expression vector pET101 D-TOPO (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. The resulting construction, encoding the recombinant *cryIIa12* gene to be expressed fused to a C-terminal His-tag, was named pET101-*cryIIa12*.

**Recombinant CryIIa12 toxin expression and purification.** *E. coli* BL21 Star (DE3) cells transformed with pET101-*cryIIa12* were grown at 37°C in 2 L erlenmeyer flasks containing 500 mL of LB medium, at 200 rpm agitation, in the presence of 200 µg/mL ampicillin, until O.D.<sub>600</sub> = 0.6-0.8. CryIIa12 expression was induced by addition of 1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) when an O.D.<sub>600</sub> = 0.7 was reached. Alternatively, the expression of recombinant His-tagged CryIIa12 was increased by cultivating the recombinant *E. coli* in a 5.0 L BBraun Biostat C bioreactor, and by using 20 g/L lactose for recombinant protein induction. Sixteen hours after induction the cells were harvested by centrifugation at 4,000 rpm. The pellet containing the cells expressing the CryIIa12 His-tagged protein was then resuspended in Lysis buffer (50 mM Sodium Phosphate buffer, 300 mM NaCl, 1% Glycerol and 0.5% Triton X-100, pH 7.0). The crude extract was sonicated three times for 5 min (large tip, Virsonic Cell Disrupter -Model 16-850), centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C and the supernatant was analyzed in a 12% SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970). The supernatant was also used for the partial purification of the recombinant CryIIa12 using Ni<sup>2+</sup> nitrilo-triacetic acid affinity resin (Ni-NTA, QIAGEN) equilibrated with Equilibration buffer (50 mM Sodium Phosphate buffer, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole pH 7.0). The supernatant mentioned, containing the *E. coli* expressed recombinant CryIIa12 His-tagged protein, was incubated for 30 min within the equilibrated column. The column was then washed with two different buffers: first with 100 mL of Equilibration buffer and then 100 mL of the same buffer containing 2 mM Imidazole. The recombinant CryIIa12 His-tagged protein was eluted with 6 mL of Equilibration buffer containing 250 mM of Imidazole. All the steps were done using a flow rate of 2 mL/min. The eluted protein was dialyzed against 50 mM sodium carbonate buffer pH 10.5 and stored at 4°C. The purified protein was quantified according to the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951).

**Bioassays of the recombinant CryIIa12 toxicity against insect larvae.** Bioassays of the recombinant CryIIa12 toxicity against cotton boll weevil larvae were carried out in 40 mL of sterilized artificial diet as described by Monnerat *et al.* (2000). The recombinant CryIIa12 protein, purified and dialyzed as explained before, was incorporated in the diet at final concentrations of 50 µg/

mL, 100 µg/mL and 230 µg/mL, respectively. The diet was added to Petri dishes and neonate larvae were placed in pits created in the artificial diet. After 7 days of incubation at 28°C ± 2, 55% ± 5 relative humidity and photoperiod of 14 h, the dead larvae were counted. In the negative control treatment, distilled water and dialysis buffer (50 mM sodium carbonate buffer pH 10.5) were added to the artificial diet. Each treatment was repeated four times and each replicate contained 15 larvae. For *S. frugiperda*, freshly prepared artificial diet, free of sorbic acid, nipagin and formaldehyde, at 50°C, was poured into a 24-well cell culture plate. After solidification, the recombinant CryIIa12 protein, purified and dialyzed, was applied on the diet surface in each well and allowed to dry. Subsequently, an 1-day-old second instar larva of *S. frugiperda* was added to each well. In the negative control treatment, distilled water and dialysis buffer (50 mM sodium carbonate buffer pH 10.5) were added to the artificial diet. Twenty-four larvae and one negative control were tested. The plates were covered with acrylic lids and incubated at the same conditions used for rearing the insects. After 48 h, the surviving larvae were individually transferred to 50 mL cups containing rearing diet and the mortality was assessed. Larval mortality was assessed again at day 5 (Praça *et al.*, 2004). To calculate the mortality value, decimal serial dilutions of the protein were made. Five dilutions of the protein and 24 larvae per dilution were tested, following the same procedure above mentioned. The bioassays were repeated three times with twenty-four larvae and one negative control. Mortality data were analyzed and calculated.

## Results

**Cloning and sequence analyses of the *cryIIa12* gene.** PCR of *cryI*-type genes using a set general primers resulted in amplification of a 0.3-kb fragment, indicating the presence of a *cryI*-type gene in the *B. thuringiensis* S811 strain (data not shown). Further PCR with primers specifically designed to detect *cryII*-type genes, among the previously detected *cryI*-type genes found within the genome of the *B. thuringiensis* S811 strain, resulted in the amplification of a fragment of approximately 2200 bp (data not shown). This putative *cryII*-type gene was cloned into the vector pGEMT-easy, and sequencing analysis revealed a high nucleotide sequence similarity of the insert with *cryIIa* sequences previously reported (data not shown). This sequence was designated *cryIIa12* gene, since other 11 *cryIIa* genes (*cryIIa1* till *cryIIa11*) are already described in public sequence databases. The *cryIIa12* gene comprised a 2160 bp open reading frame encoding a predicted protein of 719 amino acid residues (Fig. 1) and predicted *pI* value of 6,21. Amino acid sequence homology analyses among ten known holotypes CryIIa proteins indicated that the sequence of the deduced amino acid sequence of the *cryIIa12* gene (i.e. CryIIa12 protein) is 99% identical to the amino acid sequences of CryIIa1, CryIIa2, CryIIa3, CryIIa4, CryIIa5, CryIIa6, CryIIa8, CryIIa10 and CryIIa11. The amino acid sequence of CryIIa12 is 96% identical to the amino acid sequence of CryIIa7. Concerning the amino acid sequence of other CryII-type proteins, the

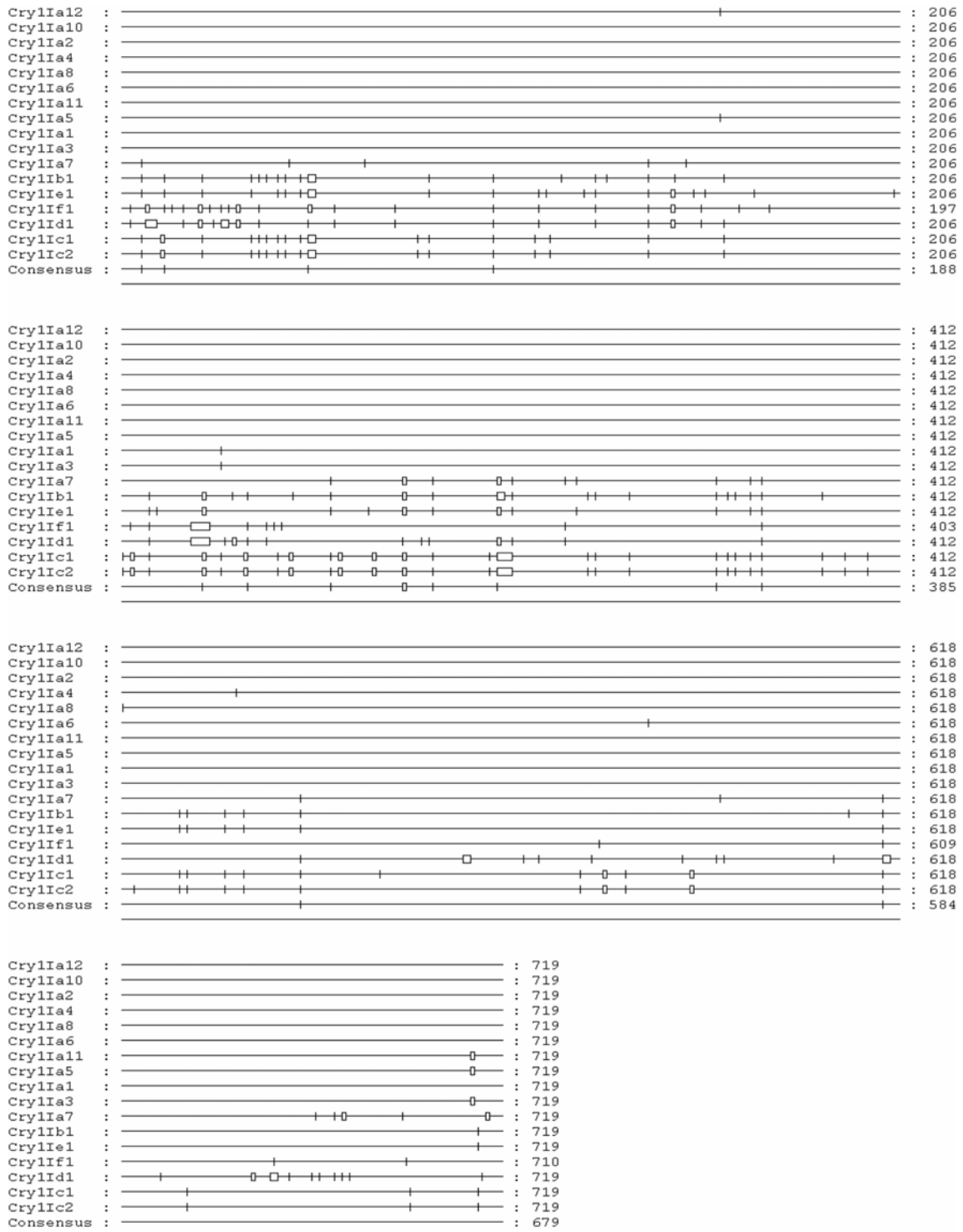
	<u>atgaaactaaagaaatcaagataagcatcaaaagt</u> <u>ttttctagcaatgogaaagtagataaaatctctacggattcactaaaa</u>	81
1	M K L K N Q D K H Q S F S S N A K V D K I S T D S L K	
	<u>aatgaaacagatatagattacaaaacattaatcatgaagattg</u> <u>tttgaaaatgtctgagatgaaaaatgtagagccgttt</u>	162
28	N E T D I E L Q N I N H E D C L K M S E Y E N V E P F	
	<u>gtagtgcacaaatcaaacaggtattggtattgogggtaaaacttggtagccctagggcttctcttgcagagcaaa</u>	243
55	V S A S T I Q T G I G I A G K I L G T L G V P F A G Q	
	<u>gtagctagtctttatagtttcttaggtgagctatggcctaaggggaaaaatcaatgggaaaatctttatggaacatgta</u>	324
82	V A S L Y S F I L G E L W P K G K N Q W E I F M E H V	
	<u>gaagagattattaatcaaaaaatcaacttatgcaagaaataaagcacttacagacttgaaaggattaggagatgcctta</u>	405
109	E E I I N Q K I S T Y A R N K A L T D L K G L G D A L	
	<u>gctgtctaccatgattogcttgaagtgggttggaaatogtaataacacaagggctaggagtgtgtcaggagccaatat</u>	486
136	A V Y H D S L E S W V G N R N N T R A R S V V R S Q Y	
	<u>atcgcatagaattgatgttgcgcagaactacctcttttgcagtgctggagagggtaccattattaccgatatat</u>	567
163	I A L E L M F V Q K L P S F A V S G E E V P L L P I Y	
	<u>gccaagctgcaaaattacatttggctattaagagatgcatctattttggaaaagatggggattatcatctcagaa</u>	648
190	A Q A A N L H L L L R D A S I F G K E W G L S S S E	
	<u>atttcaacattttataaccgtcaagtcgaagcagcagagattatccogaccattgtgtgaaatggtagcagcaggtcta</u>	729
217	I S T F Y N R Q V E R A G D Y S D H C V K W Y S T G L	
	<u>ataaacttgaggggtacaaatgocgaaagtgggtacagataatacaattccgtagagacatgacttttaaggtagat</u>	810
244	N N L R G T N A E S W V R Y N Q F R R D M T L M V L D	
	<u>ttagtggcactatttccaagctatgatatacaaaatgtatccaatataaactacagccaacttacaagagaagtataca</u>	891
271	L V A L F P S Y D T Q M Y P I K T T A Q L T R E V Y T	
	<u>gacgcaattgggacagtacatccgcatcaaaagttttacaagtagcacttggtataataataatgcacctctctctgcc</u>	972
298	D A I G T V H P H S F T S T T W Y N N N A P S F S A	
	<u>atagaggctgctgttgcgaacccgcatctactogatttctagaacaagttacaatttacagcttatagctogattg</u>	1053
325	I E A A V V R N P H L L D F L E Q V T I Y S L L S R W	
	<u>agtaacactcagtatgaatgtggggaggacataaaactagaattccgaacaataggaggaaactgtaaaatctcaaca</u>	1134
352	S N T Q Y M N M W G G H K L E F R T I G G T L N I S T	
	<u>caaggatcactaactctatataactgtaacattaccgttcaactctcogagcgtctataggactgaatcattggca</u>	1215
379	Q G S T N T S I N P V T L P F T S R D V Y R T E S L A	
	<u>gggtcgaatctatttttaactcaacctgttaatggagtagcactgggttggattttcattggaaatcgtcacacatccgat</u>	1296
406	G L N L F L T Q P V N G V P R V D F H W K F V T H P I	
	<u>gcactcgtataattctattatccagggtatgctggaattgggacgcaattacagcattcagaaaatgaattaccacctgaa</u>	1377
433	A S D N F Y Y P G Y A G I G T Q L Q D S E N E L P P E	
	<u>gcaacaggacagccaaattatgaatcttatagtcattatctcatataggactcattcagcatcacatgtagaaagca</u>	1458
460	A T G Q P N Y E S Y S H R L S H I G L I S A S H V K A	
	<u>ttggtatattctggacgcatgtagtcagatcgtacaaatacaattgagccaaatagcattacacaaataccatagta</u>	1539
487	L V Y S W T H R S A D R T N T I E P N S I T Q I P L V	
	<u>aaagctttcaatctctcaggtgocgctgtagtgagaggaccagatttacaggtggggatatacctcogaagaacgaat</u>	1620
514	K A F N L S S G A A V V R G P G F T G G D I L R R T N	
	<u>actggtacatttggggatatacaggtaaatataatccaccatttgcaaaagatatacogctgaggattogctatgctct</u>	1701
541	T G T F G D I R V N I N P P F A Q R Y R V R I R Y A S	
	<u>accacagatttacaatttcatacgtcaatcaacggtaagctataatcaagtaatttttcagcaactatgaatagagga</u>	1782
568	T T D L Q F H T S I N G K A I N Q G N F S A T M N R G	
	<u>gaggacttagactataaaaccttagaactgtaggctttaccactccatttagcttttagatgtacaaagtacattcaca</u>	1863
595	E D L D Y K T F R T V G F T T P F S F L D V Q S T F T	
	<u>ataggtgcttggaaactctctcaggttaacgaagtattatagatagaattgaaattgttccoggtagaagtaacatagag</u>	1944
622	I G A N F S G N E V Y I D R I E F V P V E V T Y E	
	<u>gcagaatattgattttgaaaagcgcgaagagaaggttactgcaactgtttacatctacgaatccaagaggatataaaacagat</u>	2025
649	A E Y D F E K A Q E K V T A L F T S T N P R G L K T D	
	<u>gtaagattatcatattgaccaggtatcaaaatttagtagctctctatcagatgaattctattctttagatgaaagagagaa</u>	2106
676	V K D Y H I D Q V S N L V E S L S D E F Y L D E K R E	
	<u>ttattcagatagttaaatccggaagcaactccatttagcgttaacatgtag</u>	2160
703	L F E I V K Y A K Q L H I E R N M -	

**Fig. 1.** Nucleotide sequence of the *cryIIa12* gene (GenBank accession number AY788868) and the deduced amino acid sequence of the corresponding CryIIa12 protein. The N-terminal sequence has been underlined. The three classic structural domains present in Cry proteins are in boldface and shaded.

amino acid sequence of CryIIa12 is 93% identical to CryIIe1, 92% identical to CryIIb1 and 89% identical to CryIIc1, CryIIc2 and CryIId1. Amino acid sequence alignment among CryII-type proteins revealed that CryIIa12 contains amino acid residues, which are divergent in relation to the other CryII-type proteins along all its three structural domains (Fig. 2). When compared with the others *cryIIa*-type genes, *cryIIa12* exhibits substitutions at positions 476 (a for g) and 1719 (c for t), resulting in a single replacement of the Lys<sup>159</sup> by Arg at domain I (located at the second alpha-helix) (Fig. 1 and 2). This replacement also occurs in the *cryIIa5* sequence (Selvapandiyan *et al.*, 1998) in this exact position. Compared to *cryIIa1* (Tailor *et al.*, 1992) and *cryIIa3* (Shin *et al.*, 1995) there was a substitution at position 697 (t for g), resulting in the replacement of the Tyr<sup>233</sup> by Asp at domain I. Compared

to the *cryIIa3*, *cryIIa11* and *cryIIa5* genes there were substitutions in the *cryIIa12* sequence at positions 2133 (c for g) and 2134 (g for c), corresponding to the replacement of the Asn<sup>711</sup> by Lys and of the Glu<sup>712</sup> by Gln, both at domain III, respectively (Fig. 1 and 2). CryIIa7 represents an exception, since it is the most heterologous CryIIa-type protein, differing from CryIIa12 in 28 amino acid residues, mainly localized within the Domain II (Fig. 2). Among all the CryII-type proteins aligned with CryIIa12, the domain I is the most heterologous while the domain III is the most conserved one (Fig. 2).

**Recombinant CryIIa12: *E. coli* expression, purification and evaluation of toxicity against insect larvae.** The *E. coli* BL21 Star (DE3) strain harboring the pET101-*cryIIa12* construct

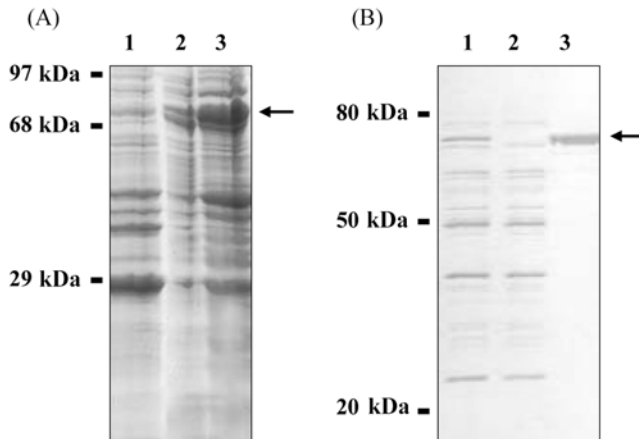


**Fig. 2.** Alignment comparison among the amino acid sequences of CryIIa12 and other CryII-type proteins. The horizontal lines represent the conserved amino acid sequence stretches among the proteins. Vertical lines and rectangles represent single amino acids and amino acid sequence stretches, respectively, which are divergent among the proteins. The three structural domains in CryIIa12 protein sequence are at positions 60 to 282 (Domain I), 287 to 487 (Domain II) and 507 to 644 (Domain III).

was induced with 1 mM IPTG to express the recombinant His-tagged CryIIa12 protein. SDS-PAGE analysis of *E. coli*

extracts after IPTG induction, showed a differential protein band corresponding to the expected 74-kDa recombinant His-





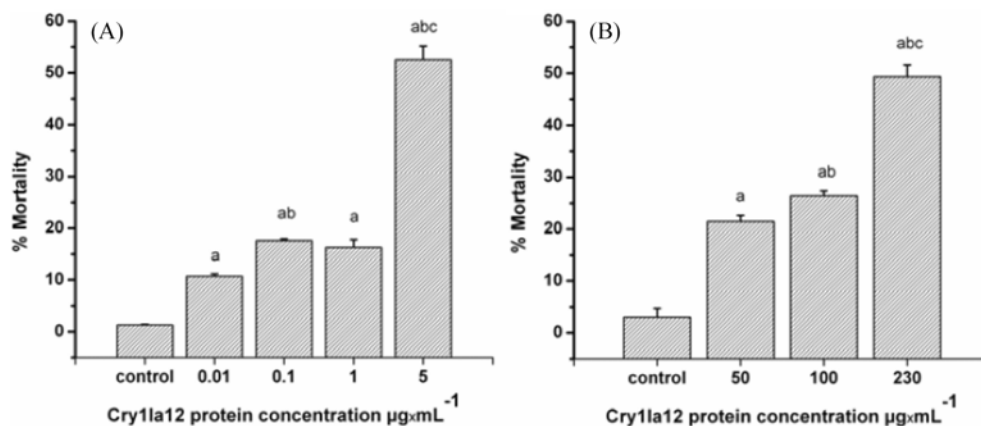
**Fig. 3.** (A) SDS-PAGE (12%) analysis showing the expressed recombinant CryIIa12 protein. Lane 1. Non-induced *E. coli* strain BL21Star (DE) containing the expression vector without insert was used as a negative control of the expression. Lane 2. *E. coli* crude extract induced with 1 mM IPTG after 6 h expressing recombinant CryIIa12 protein, sonicated and centrifuged. Lane 3. *E. coli* crude extract induced with 1 mM IPTG after 12 h expressing recombinant CryIIa12 protein, sonicated and centrifuged. Arrows indicate the expressed 74-kDa recombinant CryIIa12. (B) SDS-PAGE (12%) showing the purified recombinant CryIIa12 protein. Lane 1. *E. coli* crude extract induced with 1 mM IPTG after 12 h expressing the recombinant CryIIa12 protein. Lane 2. Fraction of *E. coli* crude extract (from Lane 1) which was not retained in the column. Lane 3. Recombinant CryIIa12 protein purified by using Ni-NTA column. Arrow shows the expected purified 74-kDa recombinant CryIIa12 protein.

tagged CryIIa12 protein (Fig. 3A). No additional bands were identified within extracts of non-induced cells with empty pET101 vector (Fig. 3A). The expression conditions were

optimized to increase the yield of recombinant His-tagged CryIIa12 by cultivating the recombinant *E. coli* in 5 L bioreactor and by using 20 g/L lactose induction. In these conditions, a large amount of the recombinant His-tagged CryIIa12 protein was produced and, subsequently, purified using Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography from sonicated *E. coli* crude extract (Fig. 3B). The toxicity of purified recombinant His-tagged CryIIa12 was tested in diet bioassays against cotton boll weevil and fall armyworm larvae. The bioassays revealed that both insect pest larvae were susceptible to the purified recombinant His-tagged CryIIa12 (Fig. 4). The purified recombinant His-tagged CryIIa12 was toxic to *A. grandis* and to *S. frugiperda* larvae, being 230 µg/mL and 5 µg/mL the highest concentrations tested to achieve the maximum toxicities, respectively (Fig. 4). Additional bioassays against the same insect larvae, using different recombinant Cry proteins, including Cry3Aa, Cry1Aa, Cry1Ac, and Cry1Ba were performed (data not shown). Except for CryIIa12 toxin, no other tested Cry protein was significantly toxic to *A. grandis*, and no other tested Cry toxin had effect on larval growth or mortality rates.

## Discussion

Here we report the isolation of a *cryIIa*-type gene from the Brazilian *Bt* strain S811, named *cryIIa12* gene, which presents marginal insecticidal activity against *A. grandis* and reasonable toxicity against *S. frugiperda*. The CryIIa12 protein sequence differs from the other CryIIa-type proteins only in one or two amino acid residues localized along the three structural domains (I, II and III) involved with the insecticidal activity of the Cry proteins. CryIIa7 is the most heterologous *cryIIa*-type gene, differing from CryIIa12 in 28 amino acid residues, mainly localized within the Domain II. Considering all the



**Fig. 4.** Bioassays of purified recombinant His-tagged CryIIa12 toxicity against cotton insect-pests. All bioassays were conducted three times with different amounts of recombinant CryIIa12 protein. a, b, c: means significant differences determined by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). In the graphics, (a) differs from the controls at 0.05% and (c) differs from (a) and (b) at 0.05%. (A) Bioassay of purified recombinant His-tagged CryIIa12 toxicity against *S. frugiperda*. Four concentrations of recombinant CryIIa12 were tested: 0.010, 0.100, 1 and 5 µg/mL. (B) Bioassay of purified recombinant His-tagged CryIIa12 toxicity against *A. grandis*. Three concentrations of recombinant CryIIa12 were tested: 50, 100 and 230 µg/mL.

**Table 1.** Insecticidal activity of various CryII-type toxins, previously described in the literature

Insect			Cry II-type toxin	Assay type (a)	LC <sub>50</sub> (d)	Active (f)	Reference (g)
Order	Scientific name	Common name					
Coleoptera	<i>Agelastica coerulea</i>	alder leaf beetle	Cry IIa3	LD	>1900 µg/mL	N	Shin <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIa3	LD	>1900 µg/mL	N	Choi <i>et al.</i> , 2000
			Cry IIb1	LD	>2600 µg/mL	N	Shin <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIId1	LD	>960 µg/mL	N	Choi <i>et al.</i> , 2000
	<i>Diabrotica</i> spp.	corn rootworm	Cry IIa4	dns	dns	N	Kostichka <i>et al.</i> , 1996
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Colorado potato beetle	Cry IIa1	LD	250 µg/mL	Y	Taylor <i>et al.</i> , 1992
			Cry IIa4	dns	dns	N	Kostichka <i>et al.</i> , 1996
	<i>Phaedon brassicae</i>	daikon leaf beetle	Cry IIa3	LD	>1900 µg/mL	N	Shin <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIb1	LD	>2600 µg/mL	N	Shin <i>et al.</i> , 1995
	<i>Pyrrhalta aenescens</i>	elm leaf beetle	Cry IIe1	LD	dns	N	Song, <i>et al.</i> , 2003
<i>Tenebrio molitor</i>	yellow mealworm	Cry IIa2	DI	>2000 µg/mL	N	Gleave <i>et al.</i> , 1993	
Diptera	<i>Culex pervigilans</i>	mosquito	Cry IIa2	FI	>2000 µg/mL	N	Gleave <i>et al.</i> , 1993
	<i>Artogeia rapae</i>	imported cabbageworm	Cry IIa3	LD	0.11 µg/cm <sup>2</sup>	Y	Koo <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIa1	LD	0.10-1.00 µg/mL (e)	Y	Sasaki <i>et al.</i> , 1996
	<i>Bombyx mori</i>	domestic silkworm	Cry IIa3	DI	10.90 µg/mL	Y	Shin <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIa3	DI	8.70 µg/cm <sup>2</sup>	Y	Koo <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIa3	DI	7.08 µg/mL	Y	Choi <i>et al.</i> , 2000
			Cry IIb1	DI	>260 µg/mL	N	Shin <i>et al.</i> , 1995
			Cry IIId1	DI	439.56 µg/mL	Y	Choi <i>et al.</i> , 2000
	<i>Epiphyas postvittana</i>	light brown apple moth	Cry IIa2	DI	67 µg/mL	Y	Gleave <i>et al.</i> , 1993
	<i>Helicoverpa armigera</i>	cotton boll worm	Cry IIa5	IP	dns	Y	Selvapandiyan <i>et al.</i> , 1998
			Cry IIe1	DI	dns	N	Song, <i>et al.</i> , 2003
<i>Hyphantria cunea</i>	fall webworm moth	Cry IIa3	DI	> 46.32 µg/cm <sup>2</sup>	N	Koo <i>et al.</i> , 1995	
<i>Leguminivora glycinivorella</i>	soybean pod borer	Cry IIe1	LD	9.02 µg/mL	Y	Song, <i>et al.</i> , 2003	
Lepidoptera	<i>Ostrinia furnacalis</i>	Asian corn borer	Cry IIe1	DI	2.22 µg/mL	Y	Song, <i>et al.</i> , 2003
			Cry IIe1	DI (b)	6.58 µg/mL	Y	Liu <i>et al.</i> , 2004
			Cry IIe1	DI (c)	dns	Y	Liu <i>et al.</i> , 2004
<i>Ostrinia nubilalis</i>	European corn borer	Cry IIa1	DI	16 µg/mL	Y	Taylor <i>et al.</i> , 1992	
		Cry IIa1	DI	3.34 µg/mL	Y	Sekar <i>et al.</i> , 1997	
		Cry IIa4	dns	dns	Y	Kostichka <i>et al.</i> , 1996	
<i>Plutella xylostella</i>	diamondback moth	Cry IIa1	LD	0.001-0.01 µg/mL (e)	Y	Sasaki <i>et al.</i> , 1996	
		Cry IIa3	LD	17.40 µg/mL	Y	Shin <i>et al.</i> , 1995	
		Cry IIa3	LD	0.089 µg/cm <sup>2</sup>	Y	Koo <i>et al.</i> , 1995	
		Cry IIa3	LD	12.90 µg/mL	Y	Tabashnik <i>et al.</i> , 1996	
		Cry IIa3	LD	2.57 µg/mL	Y	Choi <i>et al.</i> , 2000	
		Cry IIa4	dns	dns	Y	Kostichka <i>et al.</i> , 1996	
		Cry IIb1	LD	147.80 µg/mL	Y	Shin <i>et al.</i> , 1995	
		Cry IIId1	LD	4.26 µg/mL	Y	Choi <i>et al.</i> , 2000	
		Cry IIe1	LD	0.20 µg/mL	Y	Song, <i>et al.</i> , 2003	
<i>Spodoptera exigua</i>	beet armyworm	Cry IIa3	LD	> 66 µg/ cm <sup>2</sup>	N	Koo <i>et al.</i> , 1995	
		Cry IIe1	DI	dns	N	Song, <i>et al.</i> , 2003	
<i>Spodoptera litura</i>	tobacco cutworm	Cry IIa1	LD	0.1-1.0 µg/mL (e)	Y	Sasaki <i>et al.</i> , 1996	

(a) LD = leaf dip (Tabashnik *et al.*, 1993); DI = diet incorporation (of Cry proteins expressed in *E. coli*, *Bacillus* or transgenic plant); FI = free ingestion; IP = *in planta*; dns = data not shown.

(b) Bioassay performed with the modified Cry IIa4 protein (Cry IIa4m), encoded by a gene modified to incorporate the preferential codon usage of plants, expressed in *E. coli*.

(c) Cry IIa4m expressed in transgenic tobacco. DI assay performed as described in He *et al.* (2003) *Journal of Economic Entomology* 96, 935-940.

(d) LC<sub>50</sub> = lethal concentration that causes 50% mortality of the insects. mg/mL = mg of Cry protein/mL solid diet (in case diet incorporation bioassay) or mg/mL = mg of Cry protein/mL solution (in case of leaf dip or free ingestion bioassays), unless otherwise stated. mg/cm<sup>2</sup> = mg of Cry protein/cm<sup>2</sup> solid diet surface (in case diet incorporation bioassay) or mg/cm<sup>2</sup> = mg of Cry protein/cm<sup>2</sup> leaf disk surface (in case of leaf dip bioassay). dns = data not shown.

(e) mg/mL = mg of crystal protein/mL of crystal-spore mixture.

(f) The parameter is mortality. Y = yes/active; N = no/not active.

(g) Choi *et al.* (2000) *Current Microbiology* 41, 65-69; Gleave *et al.* (1993) *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1683-1687; Koo *et al.* (1995) *FEMS Microbiology Letters* 134, 159-164; Kostichka *et al.* (1996) *Journal of Bacteriology* 178, 2141-2144; Liu *et al.* (2004) *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 40, 312-317; Sasaki *et al.* (1996) *Current Microbiology* 32, 195-200; Sekar *et al.* (1997) *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2798-2801; Selvapandiyan *et al.* (1998) *Molecular Breeding* 4, 473-478; Shin *et al.* (1995) *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2402-2407; Song *et al.* (2003) *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5207-5211; Tabashnik *et al.* (1996) *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2839-2844; Taylor *et al.* (1992) *Molecular Microbiology* 6, 1211-1217.

CryII-type proteins compared to CryIIa12, the domain I is the most heterologous among them while the domain III is the most conserved one. Domains II and III are believed to be involved in recognition and binding of Cry proteins to the specific receptors on the brush border apical membrane of insect midgut cells, while the domain I is involved in membrane insertion and pore formation through the insect gut epithelium (de Maagd *et al.*, 2001). An additional role in pore formation has been proposed for Domain III (de Maagd *et al.*, 2001). The differences in amino acid sequences found along the three domains of CryIIa12 as compared to other CryII-type proteins may reflect eventual differences in the insecticidal activity of these toxins in terms of specificity against target insects and level of toxicity.

The majority of the CryII-type proteins (i.e. CryIIa, b, c, d, e, and f), expressed either in homologous systems (i.e. *Bacillus*) or in heterologous systems (i.e. *E. coli*; transgenic plant), exhibit activity mostly against Lepidoptera and rarely against Coleoptera (Table 1). In view of the high homologies of the CryIIa12 amino acid sequence to other CryIIa-type proteins, its activity against the Coleopteran species *A. grandis* was somewhat unexpected. Recently, another Cry protein codified by a *cryIIa* gene, isolated from another *B. thuringiensis* strain, was expressed in *baculovirus* system and also showed activity towards *A. grandis* and *S. frugiperda* (Martins, 2005b). Tailor *et al.* (1992) have also found out that the product of a *cryII*-type gene was toxic to larvae of the Coleoptera *Leptinotarsa decimlineata* (Colorado potato beetle), besides presenting toxicity to the Lepidoptera *Ostrinia nubilalis*.

To date, around 150 Cry toxin genes have been described in "The *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database" ([http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/science/research/netintro99\\_e.html](http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/science/research/netintro99_e.html)), many of them with known ability to control a great variety of insect pests, including members of Lepidoptera, Coleoptera, Diptera and Hymenoptera orders, as well as nematodes (Schnepf *et al.*, 1998; Hilder and Boulter, 1999; de Maagd *et al.*, 2001; de Maagd *et al.*, 2003). The Cry3Aa1 and the *Bt* binary toxin Cry23A/Cry37 were reported to be toxic to *A. grandis* (Herrnstadt *et al.*, 1986; Donovan and Slaney, 2000). Nevertheless, except for the herein reported CryIIa12 toxin, to our knowledge none of the around 40 different CryI-type toxins described to date were demonstrated to be toxic to *A. grandis*. The maximum concentration tested to achieve the maximum toxicity (230 µg/mL; showed in this report) of the recombinant CryIIa12 against *A. grandis* weevil was similar to the reported toxicity of CryIIa1 against the Colorado potato beetle larvae (250 µg/mL) (Tailor *et al.*, 1992), which reflects a moderate insecticidal activity under the tested conditions.

Since the first report from almost 20 years ago of a Cry protein toxic to *A. grandis* (Herrnstadt *et al.*, 1986), no transgenic plant resistant to boll weevil was ever reported, although this Coleoptera insect-pest is economically important in cotton crop in different producer countries, being the most devastating cotton insect pest in Brazil. The commercially

available *Bt* transgenic cotton event Bollgard II (Monsanto) expresses CryIAc/CryIAb and Cry2Aa toxins that confers mild resistance against *S. frugiperda* (Hamilton *et al.*, 2004), and no confer resistance towards *A. grandis*. Our finding shows that the recombinant CryIIa12 protein is moderately toxic to the cotton boll weevil, besides being toxic to cotton fall armyworm in bioassays; opens, thus, promising perspectives to obtain Cry transgenic cotton lines resistant to both these devastating cotton pests.

It has been reported that several insect pests have developed resistance against insecticidal Cry proteins (Tabashnik *et al.*, 1993, 1997; Ferre and Van Rie, 2002). To avoid the development of resistance by insects to *Bt* toxins, it is important to use stacked gene strategy, which consists of a combination of *cry* genes and/or other genes encoding insecticidal proteins within the same transgenic crop (Ferre and Van Rye, 2002; Christou *et al.*, 2006). However, one requirement for the stacked gene strategy to be efficient is that the stacked Cry toxins bind to different receptors within the target insect gut epithelium. Estela *et al.* (2004) showed that CryIAc and CryIAb toxins use different epitopes for binding gut brush border membrane vesicles of the Lepidoptera *Helicoverpa armigera*, making these *cry* genes appropriate to compose a stacked gene strategy for cotton insect resistance. Therefore, isolation of novel *cry* genes, such as the presently described *cryIIa12* gene, encoding proteins with presumable distinct modes of action against target cotton insect pests are crucial for pest control within cotton crop.

It will be interesting to test the toxicity spectrum of CryIIa12 against Coleopteran and Lepidopteran other than *A. grandis* and *S. frugiperda*. Also, it is important to test its toxicity even against nematodes that attack the cotton crop. Studies on the effect of the microbial flora present in the midgut of target insect larvae (Broderick *et al.*, 2006) on the toxicity of CryIIa12, studies on midgut receptors for CryIIa12 and studies on sequence mutagenesis impacts on the toxicity of CryIIa12 would definitely contribute to elucidate why CryIIa12 is less toxic to cotton boll weevil larvae than it is to fall armyworm larvae. Moreover, the *cryIIa12* can be used as a DNA shuffling parental gene to generate *cry* genes with optimized and enhanced activity against important cotton pests. In conclusion, the insecticidal activity of CryIIa12 against *A. grandis* and *S. frugiperda*, and potentially against other relevant cotton pests, may prove to be valuable for transgenic control strategies, supported by beforehand meticulous bio-safety studies (Andow *et al.*, 2006), in field conditions.

**Acknowledgments** We are thankful to the laboratory of Biological Control at EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology for providing the *Bt* strain S811 and for supplying the *A. grandis* and *S. frugiperda* larvae. This work was supported by EMBRAPA, CAPES, CNPq, FAPESP and FIALGO-Brazil.

## References

- Andow, D. A., Lövei, G. L. and Arpaia, S. (2006) Ecological risk assessment for *Bt* crops. *Nat. Biotechnol.* **24**, 749-751.
- Betz, F. S., Hammond, B. G. and Fuchs, R. L. (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 156-173.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J. and Pena, G. (1998) Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4965-4972.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F. and Handelsman, J. (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 151-196.
- Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L. and Bravo, A. (1995) Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3826-3831.
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N. B. and Bhatnagar, R. (2004) Bacterial insecticidal toxins. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 33-54.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J. A. and Gatehouse, A. M. (2006) Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant Sci.* **11**, 302-308.
- Choi, S. K., Shin, B. S., Kong, E. M., Rho, H. M. and Park, S. H. (2000) Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* CryII-type crystal protein. *Curr. Microbiol.* **41**, 65-69.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807-813.
- de Maagd, R. A., Bravo, A. and Crickmore, N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* **17**, 193-199.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. and Schnepf, H. E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 409-433.
- Donovan, W. P., Donovan, J. C. and Slaney, A. C. (2000) *Bacillus thuringiensis* CryET33 and CryET34 proteins - having activity against Coleoptera insects, particularly boll weevil, red flour beetle and Japanese beetle. *U.S. Patent Number* US2006051822-A1.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Estela, A., Escriche, B. and Ferre, J. (2004) Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1378-1384.
- Ferre, J. and Van Rie, J. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 501-533.
- Gleave, A. P., Williams, R. and Hedges, R. J. (1993) Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of CryV-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1683-1687.
- Hamilton, K. A., Pyla, P. D., Breeze, M., Olson, T., Li, M., Robinson, E., Gallagher, S. P., Sorbet, R. and Chen, Y. (2004) Bollgard II cotton: compositional analysis and feeding studies of cottonseed from insect-protected cotton (*Gossypium hirsutum* L.) producing the Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6969-6976.
- Haynes, J. W. and Smith, J. W. (1992) Longevity of laboratory-reared boll-weevils (Coleoptera, Curculionidae) offered honey bee-collected pollen and plants unrelated to cotton. *J. Entomol. Sci.* **27**, 366-374.
- He, K. L., Wang, Z. Y., Zhou, D. R., Wen, L. P., Song, Y. Y. and Yao, Z. Y. (2003) Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **96**, 935-940.
- Herrnstadt, C., Soares, G. G., Wilcox, E. R. and Edwards, D. L. (1986) A new strain of *Bacillus-thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Bio-Technology* **4**, 305-308.
- Hilder, V. A. and Boulter, D. (1999) Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. *Crop Prot.* **18**, 177-191.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H. (1988) Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *PNAS* **85**, 7844-7848.
- Knowles, B. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24**, 275-308.
- Koo, B. T., Park, S. H., Choi, S. K., Shin, B. S., Kim, J. I. and Yu, J. H. (1995) Cloning of a novel crystal protein gene *CryI<sub>k</sub>* from *Bacillus thuringiensis* subsp *Morrisoni*. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 159-164.
- Kostichka, K., Warren, G. W., Mullins, M., Mullins, A. D., Craig, J. A., Koziel, M. G. and Estruch, J. J. (1996) Cloning of a CryV-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the CryV-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**, 2141-2144.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liu, K. Y., Zheng, B. L., Hong, H. Z., Jiang, C. F., Peng, R., Peng, J. X., Yu, Z. H., Zheng, J. and Yang, H. (2004) Characterization of cultured insect cells selected by *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **40**, 312-317.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randal, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Martins, E. S. (2005a) Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga. Master Degree Dissertation, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.
- Martins, E., Praça, L., Dumas, V., Sone, E., Waga, I., Gomes, A. C. M., Falcao, R. and Monnerat, R. G. (2005b) Caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa* **83**, 1-19.
- Monnerat, R. G. D., Oliveira-Neto, O. B., Nobre, S. D., Silva-Werneck, J. O. and Grossi de Sa, M. F. (2000) Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. *Comunicado Técnico/Embrapa* **46**, 1-4.
- Praça, L. B., Batista, A. C., Martins, E. S., Siqueira, C. B., Dias, D. G. D., Gomes, A. C. M. M., Falcao, R. and Monnerat, R.

- G. (2004) *Bacillus thuringiensis* strains effective against insects of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **39**, 11-16.
- Quezado, M. (2006) Toxinas cry: perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro. Master Degree Dissertation. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Laboratory Press, New York, USA.
- Sasaki, J., Asano, S., Iizuka, T., Bando, H., Lay, B. W., Hastowo, S., Powell, G. K. and Yamamoto, T. (1996) Insecticidal activity of the protein encoded by the *cryV* gene of *Bacillus thuringiensis* kurstaki INA-02. *Curr. Microbiol.* **32**, 195-200.
- Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. and Rousseau, E. (1993) Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **132**, 53-62.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. and Dean, D. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775-806.
- Sekar, V., Held, B., Tippett, J., Amirhusin, B., Robeff, P., Wang, K. and Wilson, H. M. (1997) Biochemical and molecular characterization of the insecticidal fragment of CryV. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2798-2801.
- Selvapandiyan, A., Reddy, V. S., Kumar, P., Tewari, K. K. and Bhatnagar, R. K. (1998) Transformation of *Nicotiana tabacum* with a native *cryIIa5* gene confers complete protection against *Heliothis armigera*. *Molecular Breeding* **4**, 473-478.
- Shin, B. S., Park, S. H., Choi, S. K., Koo, B. T., Lee, S. T. and Kim J. I. (1995) Distribution of CryV-type insecticidal protein genes in *Bacillus-thuringiensis* and cloning of *cryY*-type genes from *Bacillus-thuringiensis* Subsp kurstaki and *Bacillus-thuringiensis* Subsp entomocidus. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2402-2407.
- Song, F. P., Zhang, J., Gu, A. X., Wu, Y., Han, L. L., He, K. L., Chen, Z. Y., Yao, J., Hu, Y. Q., Li, G. X. and Huang, D. F. (2003) Identification of *cryII*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cryII*-type gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5207-5211.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson, M. W. and Moar, W. J. (1993) Resistance to toxin from *Bacillus thuringiensis* sbsp. kurstaki causes minimal cross-resistance to *B. thuringiensis* subsp. aizawai in the diamondback moth Lepidoptera: Plutellida. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1332-1335.
- Tabashnik, B. E., T. Malvar, Y. B. Liu, N. Finson, D. Borthakur, B. Y. S. Shin, S. H. Park, L. Masson, R. A. de Maagd, and D. Bosch. (1996) Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2839-2844.
- Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L., Ballester, V. Granero, F., Mensua, J. L. and Ferre, J. (1997) Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *PNAS.* **94**, 12780-12785.
- Taylor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L. and Ely, S. (1992) Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* **6**, 1211-1217.
- Van Rie, J. (2000) *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 463-469.

## **Pollen-tube pathway transformation: Optimization for Brazilian cotton cultivar**

Raquel Sampaio de Oliveira<sup>(1,3)</sup>, Paulo Henrique Alves da Costa<sup>(1,2)</sup>, Osmundo Brilhante de Oliveira Neto<sup>(1)</sup>, Thales Lima Rocha<sup>(1)</sup> and Maria Fátima Grossi de Sá<sup>(1,3)</sup>

<sup>(1)</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB final W5 norte, CEP 70.770-900, Brasília – DF. E-mail: thales@cenargen.embrapa.br, fatimasa@cenargen.embrapa.br.

<sup>(2)</sup>Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB). E-mail: costapha@yahoo.com.br.

<sup>(3)</sup>Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB). E-mail: raquelsam@gmail.com

Abstract - Cotton is an economically important crop throughout the world. The production of this commodity in Brazil is highly affected by pest attacks. Although insect-resistant transgenic cotton exists in some varieties, the transformation methods are still limited due to the difficulties imposed by tissue culture steps. To overcome this problem, the pollen-tube pathway technique has been successfully applied to *Bt* transgenic cotton, especially in China. The optimization of this procedure using Brazilian cultivars is presented here. Comparisons among non-microinjected plants and those microinjected with DNA or water were accomplished in different hours of the day. In addition, floral buds microinjected with pFS-BTCI/Tar plasmid were later sealed with vaseline and floral buds only pierced with needle were also evaluated. The results showed that higher bolls abortion rate occurred when floral buds were microinjected in the morning with no significant differences among the other treatments. The removal of the floral appendices and the holes caused by the needle did not increase the natural abscission of young bolls. In conclusion, floral buds should be microinjected during periods of the day presenting higher relative humidity and lower temperatures. The improvement of this technique might contribute to generate resistant transgenic plants against the main cotton insect pest in Brazil.

Index terms: *Gossypium hirsutum*, genetic transformation, pollen-tube pathway.

## Introduction

The Brazilian and worldwide textile industries demand for the fiber is growing considerably in the last years. Despite, the production of this commodity in Brazil is highly affected due to enormous losses caused mainly by insect pests. Currently, the control of these threats is based on the excessive use of insecticides, which are very dangerous to the human health and the environment (Hossain et al., 2004). In this context, the transgenic plants come to light as a feasible alternative.

Different techniques for plant transformation have been developed, allowing the introduction of important agricultural traits in several crops around the world. Among the available methods used in plant transformation, DNA-coated microprojectile bombardment and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation are the most common used. Other methods, including the direct delivery of DNA into protoplasts by electroporation and PEG-mediated gene transfer have also been successfully exploited (Vain, 2007; Chilton, 2005). In spite of the vast number of generated transgenic plants, using the methods described above there is still several constraints to apply these techniques for some varieties. This occurs mainly due to the difficulties in the establishment of efficient protocols for plant regeneration. Although successful plant regeneration methods have been mentioned in the literature to several cultivars, some important crops can be particularly challenging and require a huge effort for the protocol refinement. Furthermore, plant regeneration from single transformed cells often produces somaclonal variations, which affect the phenotype and genotype of the plant (Larkin, 2004). Several unwanted and unintended variations have been described, including point mutations, gene duplication, chromosomal rearrangements, chromosome number changes, transposable element movement and changes in DNA methylation (Oh et al., 2007; Larkin, 2004). These variations usually result in off-types that reduce the commercial plants value. All these difficulties lead to searching for new alternatives which prevent the tissue culture steps use favoring a simple and rapid genotype-independent transformation protocol.

Due to the lack of efficient protocols to regeneration to particular varieties, cotton remains a recalcitrant crop for genetic transformation studies. Therefore, the use of pollen-tube pathway transformation technique in this plant species has been described as a promising approach. Direct introduction of naked DNA into a plant embryo through the pollen tube pathway after pollination was first reported by Zhou et al. (1983). These authors demonstrated that foreign DNA was introduced into pollinated ovary. The DNA molecules follow along the

pollen tube pathway and eventually enters in the embryonic sack where integrates into the fertilized zygotic cells. At this moment, the ovule is destitute of cell wall and did not start the cell division, which allows the DNA molecules integration. This transformation method has been successfully used to introduce total exogenous genomic DNA or plasmid DNA into varieties of cotton (Ni et al., 1998), maize, (Zhang et al., 2005), rice (Luo & Wa, 1989), soybean (Liu et al., 1997; Zhao et al., 1995), wheat (Yu et al., 1999), and watermelon (Chen et al., 1998) respectively.

One of the main problems for Brazilian cotton varieties has been related to the high level of bolls abortion during the microinjection period. Abscission of the floral buds and bolls is a natural and necessary process due to the plant physiological difficulty in nurturing all the initiated buds until their maturity (Oosterhuis & Jernstedt, 1999). This is worsened by adverse environmental conditions such as low humidity, temperature and water stresses, nutrient inadequacy, pest attacks and diseases (Tarpley & Sassenrath, 2006; Warner & Erwin, 2005; Holman & Oosterhuis, 1999). The mechanic stress caused by the floral buds manipulation might also increase even more the bolls fall.

Aiming to get the resistant transgenic plants the pFS plasmid containing the genes *bctI* coding for black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor and *tarI* coding for tarine active against insect pest were used in the transformation experiments.

In this work, we showed clearly the effect of microinjections procedure on the bolls abortion level. Furthermore, the establishment of a reliable and repetitive protocol for pollen-tube pathway transformation to Brazilian cotton varieties was demonstrated, and it will contribute to generate resistant transgenic plants against the main cotton insect pest.



## Materials and Methods

### Plant Material and Culture Conditions

Cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) var. BRS Cedro used for the microinjection experiments were cultivated in plastic bags containing soil and they were maintained in greenhouse conditions. The temperature and relative humidity during the experimental period was 30°C and 54% at the morning, and 26°C and 62% at night, respectively.

### Construction of Plant Transformation Vector

The genes *btc1* (coding for black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor) and *tar1* (coding to tarine) were subcloned in pBTCI15 and pTAR35 vectors. In order to construct the plant transformation vector used in the microinjection experiments, the two cassettes were adjacently inserted in the pCAMBIA2300 binary vector at *SacII* and *ApaI* restriction sites to generate the pFS-BTCI/Tar vector.

### Experimental Delineation

The experimental design was completely randomized with 240 plants, being 40 plants to each treatment and 10 microinjections by plant. The first injections were carried out 59 days after the sowing. The treatments were done as described below. **Control**, non-microinjected plants; **Morning microinjection**, the plants were microinjected with the pFS-BTCI/Tar plasmid between 6:00 and 9:00 A.M.; **Night microinjection**, the plants were microinjected with pFS-BTCI/Tar plasmid between 6:00 and 9:00 P.M.; **Vaseline**, microinjected plants had the hole left by the needle sealed with Vaseline; **Water**, the plants were microinjected only with water; **Needle**, floral buds were pierced with needle but no sample were introduced. Except to the **Morning** treatment, all the microinjections were carried out during the night period. The evaluations were performed 30 and 60 days after the first microinjections, and when all bolls had been harvested. The data related to bolls drop were collected and subjected to analysis of variance, and the means compared by p-values calculated by chi-square test.

### Pollen-tube Pathway Transformation Procedure

During the bloom period the floral buds were selected for each treatment. Treated flowers were identified by tagging, and untreated flowers were removed. In order to use the pollen-tube pathway transformation technique the pollination has to be completed with consequent pollen tube development and fecundation. This process is indicated by petals color, which are

creamy white during the flowering day when anthesis and pollination occur turning purple in the following day (Figure 1). The flower petals, stamens and style were carefully removed to expose the young boll. Plasmid DNA aliquots containing 10  $\mu$ L with concentration of 0.1 mg/mL were applied on the superior portion of the young boll using the Hamilton microsyringe.

## Results and Discussion

The amount of flowers normally found in the cotton plant is much larger than the number of produced bolls. The young bolls abscission is a cotton plant natural occurrence reaching around 60% (Grimes & El-Zik, 1990). It is possible that pollen-tube pathway transformation procedure can cause harms to the floral buds, inducing their abscission due to inadequate manipulation. Experiments to check the influence of this technique in the young bolls abortion rate were performed. In the first evaluation 1,558 microinjections have been accomplished, corresponding to 64.9% of the total microinjections predicted in the experiment, showing in average 6.5 microinjected floral buds per plant. The bolls abortion average rate was around 28% for all the treatments. For the control treatment the natural drop was 24.2% (Figure 2). The highest abortion rates were observed in the treatments denominated Morning (37.7%), Night (30.6%) and Water (32.2%). In the floral buds that have been only pierced with the needle and in those microinjected containing orifices closed with Vaseline, no significant differences were observed. In the second analyzes 2,260 microinjections were applied, corresponding to 94% from the total predicted. This evaluation was carried out 60 days after the first microinjections and exhibited a general average bolls abortion rate of 50.4% (Figure 2). The natural drop of young bolls observed in the control was 43.3%. A similar abortion level was observed in the Needle treatment (43.2%). Microinjections applied in the night period (Night, Water and Vaseline treatments) showed in average 51.3% abortion rates. Again the bolls originated from the floral buds microinjected in the morning presented the highest abortion rate (61.5%).

The last evaluation finished with 2,390 floral buds microinjected (Figure 2 and Table 1). In general, the bolls abortion rate was 54%, against 46.3% related to the natural abscission. The Night, Water and Vaseline treatments did not present significant differences among themselves and they were slightly superior to the control. On the other hand, Morning treatment showed a bolls drop rate of 66.3% which was 43% higher than the one observed for the control. No significant difference was noted for the Needle treatment (Table 2).

According to Guinn & Brummet (1988) the cotton fruit exhibit pronounced changes in their abortion rate during the time. Floral buds rarely abscise, however, after anthesis the young bolls have a high probability of abscission, what is normally observed about 5 to 6 days. In our experiments the bolls fell  $12 \pm 4.6$  days after microinjection. As expected the microinjections applied in the morning induced higher bolls drop. A possible reason for this might be related to bolls desiccation due to the hole caused by the needle and/or to the

damages provoked by the floral appendices removal. Nevertheless, the microinjection damages apparently did not affect the bolls drop, since that the Needle and Control treatments were statistically similar (Table 2). Probably, the main reasons for the bolls drop seems to be correlated to the low humidity and high temperatures observed in the morning. May be if vaseline is used to close the hole caused by the needle in the floral bud the abscission process could be reduced but unfortunately this was not evaluated in our experiments. According to Zhao et al. (2005) in high temperatures the cotton plants can use more photosynthate for respiration and for vegetative growth rather than for bolls development. Therefore, photoassimilates limitation in reproductive organs under high temperature and enhanced UV-B radiations in growing plants could be one of the major reasons to increase the young bolls abscission.

Although transgenic cotton exists in some varieties, the transformation methods normally using microprojectile bombardment (Aragão et al., 2005) and co-culture with *Agrobacterium* (Guo et al., 2007) are still limited due to the difficulties imposed by tissue culture steps. As consequence pollen-tube pathway transformation technique represent a quite promising alternative to generate transgenic cotton plants. In this context, the improvement of the efficiency observed for this technique relies on the seeds income obtained from the microinjected floral buds. In China this transformation technique is normally used in large-scale in the field, providing a vast seeds production (Huang & Wang, 2002). Contrasting, the Brazilian legislation is extremely severe in relation to field experiments using genetically transformed plants. Because of that, this kind of study has almost always to be carried in greenhouse conditions, which decrease the experimental number of plants and the seed yield. For that reason, the abortion of the microinjected floral buds must be minimized. Finally, in this work, was demonstrated that the efficiency of the method can be obtained taking in account the microinjections in the periods of lower heatstroke and higher humidity.

## **Conclusions**

1. The removal of the floral appendices and holes caused by the needle does not increase natural abscission of young bolls.
2. Floral buds must be microinjected during periods of the day that present higher relative humidity and lower temperature.
3. The establishment of a reliable and repetitive protocol for pollen-tube pathway transformation technique to Brazilian cotton varieties was demonstrated, and it will contribute to transgenic plants resistant production against the main cotton insect pest.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Brazilian government (EMBRAPA and CNPq) and Instituto Mato-Grossense do Agodão (IMA).

## References

- Aragão, F.J.L.; Vianna, G.R.; Carvalheira, S.; Rech, E.L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. **Plant Science**, v.168, p.1227-1233, 2005.
- Chen, W.S.; Chiu, C.C.; Liu, H.Y.; Lee, T.L.; Chen, J.T.; Lin, C.C.; Wu, Y.J.; Chang, H.Y. Gene transfer via pollen-tube pathway for anti-fusarium wilt in watermelon. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 46, p.1201-1209, 1998.
- Chilton, M.D. Adding diversity to plant transformation. **Nature Biotechnology**, v.23, p.309-310, 2005.
- Grimes, D.W.; El-Zik, K.M. Cotton. In: Stewart, B.A.; Nielsen, D.R. (Ed.). **Irrigation of agricultural crops**. Wisconsin: ASA, CSSA, SSSA, 1990. p.741-773.
- Guinn, G.; Brummett, D.L. Changes in Abscisic Acid and Indoleacetic Acid before and after Anthesis Relative to Changes in Abscission Rates of Cotton Fruiting Forms. **Plant Physiology**, v.87, p.629-631, 1988.
- Guo, X.; Huang, C.; Jin, S.; Liang, S.; Nie, Y.; Zhang, X. *Agrobacterium*-mediated transformation of Cry1C, Cry2A and Cry9C genes into *Gossypium hirsutum* and plant regeneration. **Biologia Plantarum**, v.51, p.242-248, 2007.
- Holman, E.M.; Oosterhuis, D.M. Cotton Photosynthesis and Carbon Partitioning in Response to Floral Bud Loss Due to Insect Damage. **Crop Science**, v. 39, p.1347-1351, 1999.
- Hossain, F., Pray, C.E., Lu, Y., Huang, J., Fan, C., Hu, R. Genetically Modified Cotton and Farmers' Health in China. **Int. J. Occup. Environ. Health**, v.10, p.296-303, 2004.
- Huang, J.; Wang, Q. Agricultural Biotechnology Development and Policy in China. **AgBioForum**, v.5, p.122-135, 2002.
- Larkin, P. **Somaclonal Variation: Origins and Causes**. Encyclopedia of Crop and Plant Science. Marcel Dekker, New York, 2004 p.1158-1161.
- Liu, D.P.; Liao, L.; Yuan, Y.; Liu, Y.Z. Gaining of soybean lines resistant to SMV by introducing exogenous DNA. **Soybean Science**, v.16 p.277-281, 1997.
- Luo, Z.X.; Wa, R. A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway. **Plant Molecular Biology Report**, v.7, p.69-77, 1989.
- Ni, W.C.; Zhang, Z.L.; Guo, S.D. Development of transgenic insect-resistant cotton plants. **Scientia Agricultura Sinica**, v.31, p.8-13, 1998.
- Oh, T.J.; Cullis, M.A.; Kunert, K.; Engelborghs, I.; Swennen, R.; Cullis, C.A. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). *Physiologia Plantarum*, v.129, p.766-774, 2007.

Oosterhuis, D.M.; Jernstedt, J. Morphology and Anatomy of the Cotton Plant. In: Smith, C.W. & Cothren, J.T. (Ed.). **Cotton: Origin, History, Technology, and Production**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1999. p.175-206.

Tarpley, L.; Sassenrath, G.F. Carbohydrate profiles during carbohydrate floral bud (square) development. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.192, p.363-372, 2006.

Vain, P. Thirty years of plant transformation technology development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p.221-229, 2007.

Warner, R.; Erwin, J.E. Naturally-occurring variation in high temperature induced floral bud abortion across *Arabidopsis thaliana* accessions. **Plant, Cell and Environ.**, v.28, p.1255-1266, 2005.

Yu, H.X.; Liu, J.J.; Feng, Z.L.; Dong, J.D. Study on introduction of vermin-resistance gene (CpTI) into wheat through pollen-tube pathway method. **J. ShanDong Agric. Sci.**, v. 99, p.5-8, 1999.

Zhang Y.S.; Zhai, S.; Yang, A.; Zhang, J. Maize transformation via pollen tube pathway and the inheritance of transgene in progeny. **High Technology Letters**, v.11, p.202-206, 2005.

Zhao, D.; Reddy, K.R.; Kakani, V.G.; Koti, S.; Gao, W. Physiological causes of cotton fruit abscission under conditions of high temperature and enhanced ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum**, v.124, p.189-199, 2005.

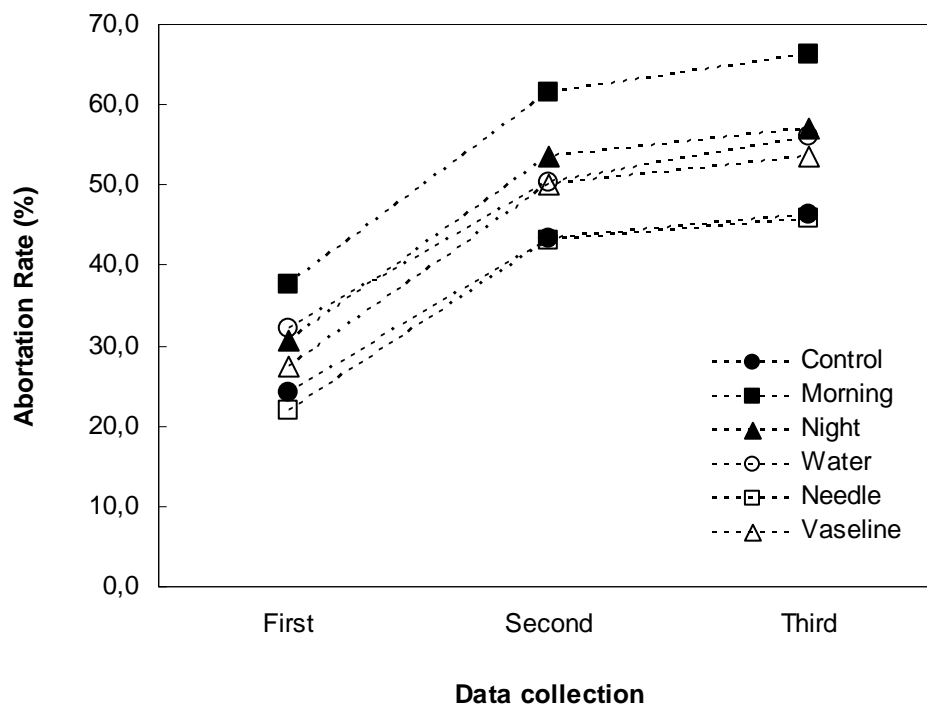
Zhao, L.M.; Liu, D.P.; Sun, H.; Yun, Y.; Huang, M. A sterile material of soybean gained by introducing exogenous DNA. **Soybean Science**, v.14, p.83-87, 1995.

Zhou, G.Y.; Weng, J.; Zhen, Y.S.; Huang, J.G.; Qian, S.Y.; Liu, G.L. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Methods in enzymology**, v.101, p.433-481, 1983.

## Figures



**Figure 1.** Bloom stages showing flowers before and after fecundation.



**Figure 2.** Evaluation of bolls abortion rate during the time.



## Tables

**Table 1.** Effects of the treatments on the cotton bolls abortion after all the bolls have been harvested.

<i>Treatments</i>	<i>Microinjections</i>	<i>Remain Bolls</i>	<i>Dropped Bolls</i>	<b>Abortion Rates (%)</b>
Control	400	215	185	46.3
Morning	400	135	265	66.3
Night	400	172	228	57.0
Water	390	171	219	56.1
Needle	400	217	183	45.8
Vaseline	400	186	214	53.5
<b>Total</b>	2,390	1,096	1,294	<b>54.1</b>

**Table 2.** P-values obtained amongst treatments calculated by chi-square test to abortion rate variable.

	<i>Control</i>	<i>Needle</i>	<i>Vaseline</i>	<i>Night</i>	<i>Water</i>
<i>Morning</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	0,0071	0,0088
<i>Control</i>		0,8872	0,0403	0,0024	0,0054
<i>Needle</i>			0,0284	0,0015	0,0035
<i>Vaseline</i>				0,3195	0,4537
<i>Night</i>					0,8104

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)