



Metodologia de Transformação Genética de Algodão por Meio de Gotejamento de Suspensão Bacteriana

Márcia Soares Vidal¹

Julita Maria Frota Chagas Carvalho²

O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, veio trazer nova perspectiva para a obtenção de culturas com características de interesse comercial, que até então não puderam ser obtidas através do melhoramento convencional.

Atualmente, a transformação genética do algodão emprega a biolística e o cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens*; todavia, os resultados se apresentam como genótipos específicos e com baixa frequência de transformantes; desta forma, esforços para a otimização de metodologias de transformação para genótipos desenvolvidos pelo Brasil se fazem necessários, a fim de se aumentar a competitividade do algodão brasileiro no mercado internacional.

Com o presente trabalho, objetivou-se apresentar a otimização de uma metodologia de transformação genética do algodoeiro baseada no gotejamento de

suspensão de cultura de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta metodologia é uma adaptação do método de transformação de *Arabidopsis thaliana* com base no mergulho floral descrito por Clough e Bent (1999).

Dez exemplares dos genótipos ACALA, AROEIRA, CEDRO, BRS-VERDE, TB-90, 97-668, 97-1682 e 98-1034, foram semeados em vasos com capacidade de 20 L e mantidos em casa-de-vegetação durante todo o experimento. Na floração, passou-se a avaliar, todos os dias o número de botões de cada genótipo para se montar o número de transformações a serem realizadas. Selecionou-se uma flor de cada genótipo que serviria como progenitor masculino (doador de pólen) e as flores que serviriam como genitores femininos foram emasculadas na tarde do dia precedente àquele em que as flores atingiram seu maior desenvolvimento (Figura 1).

¹Bióloga, Dra., Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. e-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

²Eng. Agr., Dra., Embrapa Algodão. e-mail: julita@cnpa.embrapa.br



Fig. 1. Emasculação de botão floral maduro de algodão.

Neste mesmo dia foi realizada, também, a multiplicação da cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, ABI(pC2760) contendo o vetor binário p35S-Gus em 500 mL meio de cultura LB líquido suplementado com os antibióticos canamicina (50 mg/L) e espectinomicina (50 mg/L); a cultura foi mantida a 28° C sob agitação de 250 rpm durante 16 horas; no dia seguinte, foi submetida a centrifugação a 5000 rpm, por 10 minuto, e o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em uma solução de sacarose 5% contendo o detergente Silwet L-77 até a D.O. (Densidade Ótica) de 0,8, após o que cerca de 2 mL deste caldo bacteriano foram distribuídos em 10 tubos de fundo cônico de 50 mL. Este material foi levado a casa-de-vegetação, onde se realizou o gotejamento (Figura 2); para tal, o pólen do progenitor masculino de cada genótipo foi coletado nos respectivos tubos contendo o caldo bacteriano, que foi homogeneizado para então se realizar o gotejamento propriamente dito. No momento do gotejamento, os canudinhos foram retirados das



Fig. 2. Coleta de grãos de pólen maduros de progenitor masculino.

flores emasculadas e se gotejaram cerca de 100 µL da mistura pólen + bactéria; feita esta operação, os canudinhos foram recolocados nas flores, para protegê-las (Figura 3). As flores que receberam o gotejamento foram identificadas por meio de amarração com etiquetas contendo o nome do genótipo, a data de realização do cruzamento e o vetor binário empregado e as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, até a maturação dos frutos, os quais foram coletados e as sementes, potencialmente modificadas geneticamente (geração R₁) foram germinadas em sacos de plástico com capacidade de 2 kg contendo substrato (Massame: esterco e solo, nas proporções de 3:3:4).



Fig. 3. Gotejamento de suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* + pólen em botão floral emasculado, de algodão.

Tabela 1, observou-se um número elevado de aborto dos frutos, porém este fato pode não estar relacionado diretamente ao processo de transformação propriamente dito e, sim, estar relacionado aos cuidados tomados durante a emasculação, entre outros fatores (PENNA, 1999). Outro fato verificado foi a formação de frutos deformados, embora se tenha constatado, também, a formação de frutos normais (Figura 4).

Tabela 1. Porcentagem de "pegamento" dos frutos empregando-se o método de transformação por gotejamento em algodão.

Genótipos	Número de flores gotejadas	Número de frutos recuperados	"Pegamento" em porcentagem (%)
ACALA	35	5	14
AROEIRA	48	11	23
CEDRO	48	10	21
BRS-VERDE	31	7	23
TB-90	44	8	18
97-668	59	18	31
97-1682	52	9	17
98-1034	74	5	7

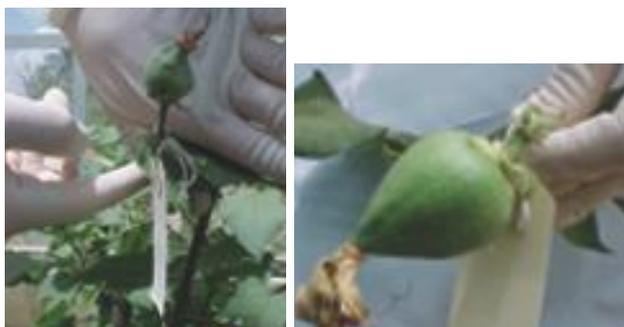


Fig. 4. Frutos originados por meio de transformação genética de algodão por gotejamento. (A) Fruto de aparência deformada; (B) Fruto com aparência normal

A avaliação dos eventos de transformação será realizada a partir da extração de DNA total de folhas jovens das plântulas recuperadas, que será empregado na amplificação por PCR de gene *uidA*.

Referências Bibliográficas

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v. 16, p. 735-743, 1999.

PENNA, J.C.V. Híbridação em Algodão. In: BORÉM, A. (eds). Híbridação artificial de plantas. Viçosa: Ed. UFV, 1999. p. 63-81.

Comunicado Técnico, 195

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 315 4300 Fax: (83) 315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena A. Araujo
Márcia Barreto de Medeiros
Mária Auxiliadora Lemos Barros
Mária José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de M. Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho