

Campina Grande, PB
Maio, 2005

Autores

Roseane Cavalcanti dos Santos
Eng^o, Agr^o, Dr^a em Biologia
Molecular. da Embrapa
Algodão, Campina Grande, PB,
roseane@cnpa.embrapa.br

Gláucia Barbosa Cabral
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia. SAIN- Parque
Rural, W3 Final Norte, 70770-
900, Brasília, DF.

Lucília Helena Marcelino
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Eugen Silvano Gander
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia



Transformação de Algodão (*Gossypium Hirsutum* L.) Através do Uso de Policátion



As técnicas de transferência de genes para plantas através das ferramentas da engenharia genética, têm sido utilizadas há mais de 20 anos e, desde então, várias características agrônômicas foram incorporadas a culturas de importância econômica, sobretudo às oleaginosas e fibrosas, como soja, milho, canola e algodão (BORÉM e AZEREDO, 2003).

No algodão, as principais demandas em termos de melhoria agrônômica via transgenia, se centram nas características das fibras, resistência a herbicidas e a fitopatógenos, em particular a insetos e fungos (KISER, 1995; MOREIRA et al., 1999); todavia, apesar das tecnologias atualmente disponíveis para transformação, a obtenção de plantas transgênicas de algodão ainda depende do tipo da cultivar e do método de transformação. Segundo Carvalho et al., (1998), nem todas as cultivares de algodão são embriogênicas e esta é uma das características necessária para que se possa regenerá-las após a transformação.

Além dessa limitação, o aparecimento de plantas anormais oriundas de embriões somáticos é muito comum o que prejudica o processo de obtenção da planta transformada (SATYAVATHI et al., 2002).

Entre as cultivares de *G. hirsutum* L., a mais utilizada para fins de transformação é a Coker 312 devido à competência para regeneração (CARVALHO, 1999; MOREIRA et al., 1999). Esta cultivar, contudo, não se adapta às condições fisiográficas brasileiras, de modo que os produtos dela obtidos necessitam de vários ciclos de hibridação e retrocruzamentos para incorporação do transgene e manutenção das demais características já definidas na cultivar comercial. Devido a esses ciclos, todo processo na obtenção da cultivar transgênica demanda mais tempo, tornando-o tão demorado quanto o do melhoramento convencional (MOREIRA et al., 1999; SAWAHEL, 2001).

Carvalho et al., (1998) ajustaram um protocolo para obtenção de embriogênese somática na cultivar comercial CNPA Precoce I, da Embrapa Algodão, e obtiveram calos embriogênicos e, posteriormente, embriões, no mesmo percentual que a Coker 312, abrindo-se daí uma oportunidade de se

conseguir plantas geneticamente modificadas desta cultivar, em tempo relativamente mais curto.

Quanto aos métodos de transformação aplicados para algodão, os mais conhecidos e já estabelecidos são aqueles mediados por *Agrobacterium* ou por biobalística. O método via *Agrobacterium* é simples e de fácil manipulação, mas é aplicado a um número limitado de cultivares que podem ser regeneradas em plantas férteis através da embriogênese somática. A questão da limitação deste método ocorre mais em função da relação patógeno-hospedeiro que devido à regeneração (FINER e MULLEN, 1990; RAJASEKHARAN et al., 1996; SATYAVATHI et al., 2002); o método de biobalística é mais oneroso e sua eficiência depende do controle de alguns fatores ligados à técnica, como tamanho dos microprojéteis, resistência ao vácuo, força de propulsão e uniformidade na superfície do tecido alvo. Segundo Milki et al., (1993), o controle de todos esses fatores é difícil entre e dentro do experimento, dificultando, a comparação do nível de expressão gênica entre tecidos; além dessas metodologias, uma outra técnica de transferência de DNA de uma célula a outra vem sendo desenvolvida, a de uso de policação.

O uso de policações (poliethilenoglicol - PEG, polivinil álcool - PVA etc) na transferência de genes é feito desde o início da década de 80, tanto em células vegetais como em fumo (PASZKOWSKI et al., 1984), milho (ANTONELLI e STADLER, 1989), arroz (TSUGAWA et al., 1998) e algodão (SAWAHEL, 2001), quanto em células animais (WAGNER et al., 1990; KABANOV et al., 1993).

A característica desse método se baseia no uso das propriedades químicas do policação que se liga efetivamente ao DNA, por ser este negativamente carregado. A eficiência na transferência do DNA mediado por policações baseia-se no aumento da permeabilidade da membrana, facilitando a entrada do complexo na célula e na proteção que o polímero fornece ao DNA contra ação de nucleases.

Sawahel (2001) desenvolveu um protocolo simples para transformação de calos de algodão *G. barbadense* L., utilizando como fonte de policação, o brometo de hexadimetrina (polibrene). Este protocolo foi utilizado

por pesquisadores da Embrapa para transformar *G. hirsutum* L.; contudo, a eficiência de transformantes foi baixa, razão porque se procederam a alguns ajustes no protocolo que possibilitaram resultados mais expressivos, conforme descritos a seguir.

Metodologia de transformação

Indução de calos: Sementes deslintadas de *G. hirsutum* cv. Coker 312 foram desinfetadas como descrito por Sawahel (2001) e cultivadas em meio basal MSB sólido (MURASHIGE e SKOOG, 1962), mais 3% de sacarose e suplementado com 10 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético) e 0,5 mg/L de 2-ip (isopenteniladenina) (CARVALHO et al., 1998). O meio foi solidificado com 0,16% de Phytigel. Sete dias após a germinação das sementes, o hipocótilo de cada plântula foi cortado em fragmentos de 5 mm² e inoculados no meio MSB sólido em magentas, que foram incubadas a 27 ± 2 °C, sob condições de 16h de luz e 8h de escuro.

DNA plasmidial: Utilizou-se o vetor binário pCAMBIA 1301, que contém o gene marcador *gusI*, e o de seleção *hplI*, ambos sob o controle do promotor 35S do CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*).

Protocolo de transformação: Calos da cultivar Coker 312 (200 mg) foram submetidos a pré-plasmólise durante 4 horas em microtubos (1,5 mL) contendo 1 mL de tampão fosfato, pH 7, cuja solução era trocada a cada hora e mantidos a temperatura ambiente; a seguir, os calos foram centrifugados a 402 x *g* (eppendorf, mod. 5402), durante 2 min e ressuspensos em solução contendo 300 mL de MSB líquido aos quais foram adicionados 200 mL de espermidina 0,5 M. A fonte de policação utilizada foi polibrene, preparado na concentração de 0,3 mg/mL em MSB líquido e adicionado ao meio MSB/espermidina contendo os calos; depois, adicionou-se o DNA plasmidial à concentração de 50 mg/mL em 400 mL MSB líquido, adicionando-o à solução final MSB/espermidina/polibrene. A mistura total foi colocada em agitador por 20 min e, posteriormente, incubada a 28 °C/6h. Depois desse período, cada amostra foi transferida para placas de petri (Corning 35mm), contendo 4 mL de MSB

líquido e incubadas por dois dias, a 28°C.

Expressão transiente do gene *gus*: Depois da incubação dos calos cada amostra foi filtrada, coletando-se 100 mg de calos, os quais foram transferidos para placa de ELISA e incubados a 37 °C durante 19 hs em solução contendo X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucoronídeo), na concentração de 50 mg/mL, para análise histoquímica do *gus* (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). Dez calos foram testados para cada tratamento e as amostras analisadas com auxílio de microscópio estereoscópico.

Seleção em higromicina: Os calos remanescentes (100 mg) foram transferidos para meio MSB sólido contendo 50 mg/L de higromicina. Em cada magenta distribuíram-se dez calos, que foram cultivados durante 60 dias, em câmara de crescimento, no escuro. Cada tratamento teve seis repetições.

Análise de PCR: Utilizaram-se os calos crescidos em meio contendo higromicina para análise via PCR. O protocolo de extração de DNA usado foi o descrito Brasileiro e Carneiro (1998). Para a reação de PCR (25 mL), empregou-se 1 mL de DNA (10 ng/mL) extraído de cada tratamento de acordo com metodologia descrita por Brasileiro e Carneiro (1998). Oligonucleotídeos específicos do gene *hptII* foram utilizados. As condições de PCR foram: um ciclo de desnaturação a 94 °C/5 min, 35 ciclos de desnaturação (94 °C/1 min): anelamento (55 °C/1 min); extensão (72 °C/1 min) e um ciclo final de extensão a 72 °C/5 min. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8 %) contendo brometo de etídio (1 %) e posteriormente visualizados em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye).

Southern blot: Os produtos de PCR dos calos transformados com o vetor pCAMBIA 1301 foram transferidos para membrana Hybond-N-Nylon (Amersham Life Science[®]) através de Vacuum blotter (Bio-Rad) por 2 horas; em seguida, fixou-se os produtos à membrana com auxílio de um *Crosslinker* por 30 seg. Um fragmento do gene *hptII* contendo 480 pb foi usado como sonda e marcado com a P³² dCTP. A sonda foi preparada utilizando-se o *kit random primed-DNA-labeling* (Pharmacia). A hibridização ocorreu a 65

°C durante 18h em tampão SSPE 6X (NaCl₂ 0,9M + NaPO₄ 60 mM pH 7,6 + EDTA 6 mM + SDS 0,5% + solução de Denhardt 5X e 100 mL de DNA esperma de salmão, previamente denaturado). Após a hibridização, a membrana foi lavada duas vezes em tampão SSPE 2X/SDS 0,1% por 20 min a temperatura ambiente, uma vez em SSPE 1X/SDS 0,1% por 15 min a 65 °C e uma vez SSPE 0,1X/SDS 0,1% por 15 min 65 °C. A seguir, a membrana foi exposta a filme de raio X por 18 h a - 70°C.

Resultados obtidos

Meio de indução de calos

O meio de cultivo de algodão empregado neste trabalho, possibilitou a proliferação de calos friáveis de maneira uniforme e em quantidade suficiente para as etapas necessárias nos ensaios de transformação. Em ensaios prévios, em que adotou-se o protocolo descrito por Sawahel (2001), utilizando-se 1% de sacarose e apenas uma auxina (2,4-D) como regulador de crescimento, observou-se lento crescimento dos calos e acelerada oxidação devido ao alto teor de compostos fenólicos que, normalmente, a planta de algodão possui. Com o ajuste do protocolo, a elevação da concentração de sacarose (3%) e, em especial, a adição ao meio de uma citocinina (2ip) possibilitaram expressivo crescimento dos calos de algodão, tanto em quantidade como em precocidade (Figura 1).



Fig. 1. Detalhe de calos crescidos em MS acrescido de sais, vitaminas, sacarose (3%), auxina (2,4-D) e citocinina (2-ip)

Expressão do gene *gus*

Na análise histoquímica do gene *gus* verificou-se grande quantidade de calos transformados, revelada pela reação enzimática com X-Gluc (Figura 2). Dos dez calos



Fig. 2. Expressão de *gus* em calos transformados com o vetor pCAMBIA 1301. Esquerda: Calos de algodão crescidos em MSB/espermidina/polibrene (controle). Direita: Calos de algodão transformados, mostrando reação enzimática positiva para o *gus*.

testados, a reação foi positiva em sete. Em ensaios prévios com a Coker 312, observou-se baixa expressão do *gus* quando o vetor pCAMBIA 1301 foi utilizado na mesma concentração descrita em Sawahel (2001), de 30 mg/mL. Do total de dez calos testados, em apenas um se detectou reação positiva.

Seleção em higromicina

A taxa de crescimento dos calos em 50 mg/mL de higromicina foi baixa devido, provavelmente, à alta concentração desse antibiótico, fazendo com que se elevasse a pressão de seleção dos transformantes; ainda assim, em cada repetição se constataram entre 50% e 60% de crescimento desses calos, enquanto os calos dos tratamentos controle (sem plasmídeo) que foram inoculados em meio com higromicina, não cresceram no meio seletivo. Em ensaios de expressão em que se utiliza o gene *hptII*, a concentração verificada na literatura se situa entre 7.0 e 40 mg/mL (STRIZHOV et al., 1996; PONNAPA et al., 1999; CHOI et al., 2000). Em seu trabalho de Sawahel (2001), procede à seleção dos transformantes com 100 mg/mL de higromicina; esta concentração é muito elevada podendo incorrer em descarte de transformantes positivos, em virtude de não suportarem a forte pressão de seleção, em função da quantidade de antibiótico encontrada no meio de crescimento.

Análises de PCR e de Southern blot

Constatarem-se produtos de PCR amplificados para

detecção do gene *hptII*. O fragmento interno, de aproximadamente 500 pb, confirmou a presença do respectivo gene do pCAMBIA nos calos transformados (Figura 3A); a presença do vetor foi confirmada através da sonda de *hptII* em análise de Southern blot (Figura 3B).

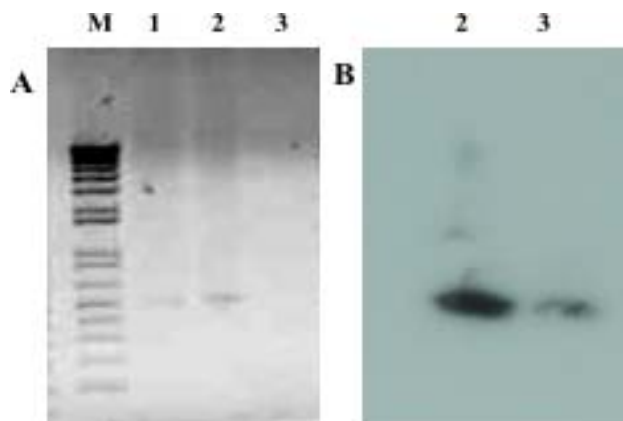


Fig. 3. Produto de PCR em gel de agarose (0.8%). M- Marcador de peso molecular: 1Kb DNA ladder Plus. 1- DNA de calos de plantas não transformadas (controle); 2- DNA de calos transformados com pCAMBIA 1301; 3- sonda do gene *hptII* (500pg/mL). Seta indica o fragmento de ~ 500 pb de *hptII*. B- Auto-radiografia de Southern blot. 1- DNA de calos transformados com pCAMBIA 1301; 2- fragmento correspondente à sonda do gene *hptII*.

Os resultados apresentados nesse estudo demonstram a aplicabilidade e facilidade do uso da técnica de policações para transformação em algodão *G. hirsutum* L. No trabalho de Sawahel (2001) a eficiência de transformação em *G. barbadense* situou-se em 4,4%, considerando-se o número de transformantes/mg DNA.

Aqui, não se estimou a eficiência de transformação; contudo, com o ajuste demonstrado no protocolo, descrito por Sawahel (2001) para *G. hirsutum* sugere-se que a eficiência de transformação possa situar-se nesse mesmo nível ou brevemente superior.

Conclusão

A técnica de transformação de algodão através do uso de polibrene é de grande simplicidade, rápida e com custos equivalentes aos dependidos com a de *Agrobacterium*; ela apresenta, ainda, a vantagem de ser menos tóxica que outros policações, a exemplo do PEG e é perfeitamente adaptável a qualquer outra cultura, desde que se estabeleçam as condições para obtenção de calos viáveis.

Referências Bibliográficas

- ANTONELLI, N.M.; STADLER, J. Chemical methods for direct gene transfer to maize protoplasts: I. Efficient transient expression after treatment with the polycation Polybrene. **MNL**, v.63, p.21-22, 1989 (artigo disponível em <http://www.maizegdb.org/mnl/63/40antonelli.html>)
- BOREM, A.; AZEREDO, R.M.C. Segurança nutricional de produtos comerciais. In: COSTA, N.M.B.; BOREM, A. **Biotecnologia e nutrição**. São Paulo: Nobel, 2003. 214p.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 309p.
- CARVALHO, J.M.F.C.; GONZALEZ-BRITO, E.; PEREZ, C.; SANTOS, J.W. dos. Resposta de duas cultivares de algodão à embiogênese somática em diferentes meios de cultivo. **Revista de Oleaginosas e Fibras**, v.2, n.1, p.13-20, 1998.
- CARVALHO, L.P. Contribuição do melhoramento ao cultivo do algodão no Brasil. In: BELTRÃO, N.E. de M. Org. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. v.1, 491p.
- CHOI, S.; BEGUN, D.; KOSHINSKY, H.; OW, D.W.; WING, R.A. A new approach for identification and clone of genes: the pBACwch system using *Cre/lox* site-specific recombination. **Nucleic Acid Research**, v.28, n.7, p.19-25, 2000.
- FINNER, J.; MULLEN, M.M.C. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Report**, v.8, p. 586-589, 1990.
- KABANOV, A.V.; ASTAFIEVA, I.V.; MAKSIMOVA, I.V.; LUKANIDIN, E.M.; GEORGIEV, G.P.; KABANOV, V.A. Efficient transformation of mammalian cells using DNA interpolyelectrolyte complexes with carbon chain polycations. **Bioconjugate Chemistry**, v.4, n.6, p.448-454, 1993.
- KISER, J. Transgenic cotton products from Stoneville. In: BELT-WIDE COTTON CONFERENCES, 1995, Memphis. **Proceedings**...Memphis: National Cotton Council, 1995. p. 169-170.
- MILKI, B.L.; FOBERT, P.E.; CHAREST, P.J.; IYER, V.N. Procedure for introducing foreign DNA into plants. In: GLICK, B.R.; THOMPSON, J.E. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. London: CRC Press, 1993. Chap.6, 342p.
- MOREIRA, J.A.N.; NÓBREGA, M.B.M.; VIEIRA, R.M. Engenharia genética no algodoeiro. In: BELTRÃO, N.E. de M. Org. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. v.1, 491p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PASZKOWSKI, J.; SHILLITO, R.D.; SAUL, M.; MANDAK, V.; HOHN, T.; HOHN, B.; POTRYKUS, I. Direct gene transfer to plants. **EMBO Journal**, v.3, p.2717-2722, 1984.
- PONNAPA, T.; BRZOZOWSKI, A.E.; FINNER, J.J. Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. **Plant Cell Reports**, v.19, p.6-12, 1999.
- RAJASEKHARAN, K.; GRULA, J.W.; HUDSPETH, R.L.; POFELIS, S.; ANDERSON, D.M. Herbicide resistance Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase. **Molecular Breeding**, v.2, p. 307-319, 1996.
- SATYAVATHI, V.V.; PRASAD, V.; GITA LAKSHMI, B.; LAKSHMI S.G. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 162, n.2, p. 215-223, 2002.
- SAWAHEL, W.A. Stable Genetic Transformation of Cotton Plants Using Polybrene-Spermidine Treatment. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.377a-377f, 2001.
- STRIZHOV, N.; KELLER M.; MATHUR, J.; KONCZ-KÁLMÁN, Z.; BOSCH, D.; PRUDOVSKY, E.; SCHELL,

J.; SNEH, B.; KONCZ, C.; ZILBERSTEIN, A. A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. Proceedings of the National Academy of Science of USA., v.93, p.15012-15017, 1996.

TSUGAWA, H.; OTSUKI, Y.; SUZUKI, M. Efficient transformation of rice protoplasts mediated by a

synthetic polycationic amino polymer. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, n.7, p. 1019-1026, 1998.

WAGNER, E.; ZENKE, M.; COTTEN, M.; BEUG, H.; BIRNSTIEL, M.L. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 87, p. 3410-3414, 1990.

**Circular
Técnica, 81**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª Edição
Tiragem: 2000



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
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria 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