

128

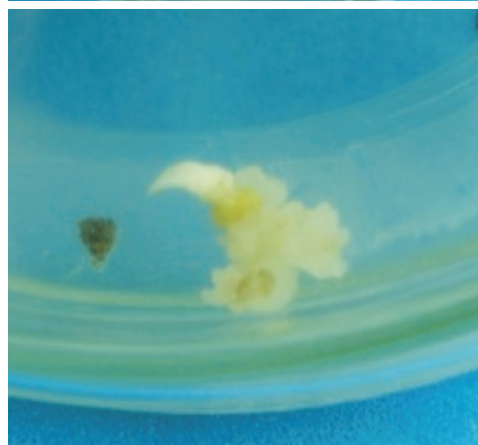
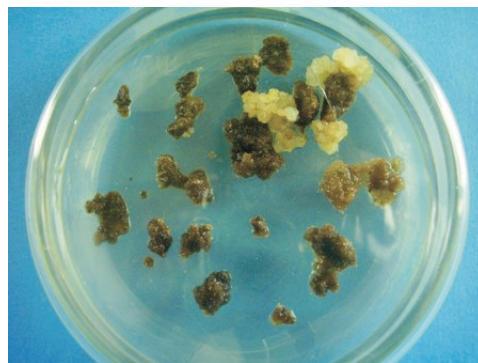
Circular
TécnicaCampina Grande, PB
Novembro, 2009

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Engenheira Agrônoma,
Ph.D. em Microbiologia,
Pesquisadora da Embrapa
Algodão,
Campina Grande, PB,
julita@cnpa.embrapa.br.

Marina Medeiros de Araújo Silva
Bióloga, Mestrando em
Melhoramento Genético de
Plantas, UFRPE,
Rua Dom Manoel de
Medeiros, s/n, Recife, PE
marinamedeirosas@yahoo.com.br.

Propagação *In Vitro* de Algodão Via Embriogênese Somática



O algodoeiro vem sendo alvo de estudos em uma das áreas da Biotecnologia que se tornou bastante analisada e aplicada, a Cultura de Tecidos Vegetais, com particular interesse nas aplicações voltadas para a área de melhoramento genético e nas técnicas de propagação *in vitro*. Entre essas técnicas, destaca-se a embriogênese somática que, segundo Barros (1999), é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta.

A indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas do cultivo *in vitro* são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (VASIL, 1987), além daqueles inerentes ao material vegetal, como fatores hereditários e estado fisiológico do explante (THORPE et al., 1991).

No algodão, a embriogênese somática vem sendo desenvolvida com certa dificuldade, uma vez que sua obtenção foi conseguida em poucas cultivares (CARVALHO, 1999). Além disso, esse processo é altamente genótipo-dependente, não havendo, portanto, um protocolo definido que possa ser aplicado a diferentes cultivares.

Esta circular técnica apresenta a metodologia utilizada na indução da embriogênese somática em algodão, utilizando as cultivares BRS-Seridó e BRS-Araripe, desenvolvidas pelo CNPA e destinadas à agricultura familiar do semi-árido nordestino.

Obtenção de Plantas Matrizes

As sementes de algodão foram lavadas com detergente comercial em água corrente e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio, a 2% de cloro ativo, adicionada de duas gotas de Tween-20, durante 20 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, procederam-se três enxágues em água bidestilada estéril. Essas sementes foram transferidas para tubos de ensaio (Figura 1) contendo o meio MS básico (MURASHIGE; SKOOG, 1962), onde permaneceram por 10 dias até a formação da planta matriz (Figura 2).

Indução e obtenção de calos embriogênicos em algodão:

Como explantes foram utilizados segmentos hipocotiledonares com 1 cm de comprimento, os quais foram inoculados em placas de Petri (Figura 3) contendo tratamentos de indução de calos (IC1 e IC2), compostos por meio MS acrescido de 160

g.L⁻¹ de MgCl₂, 0,3 mg.L⁻¹ de tiamina, 30 g.L⁻¹ de glicose, 1,8 g.L⁻¹ do solidificante Phytigel e diferentes concentrações de reguladores de crescimento: IC1 - 2,0 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 1,0 mg.L⁻¹ de cinetina (KIN) e, IC2 - 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e 0,1 mg.L⁻¹ de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D).



Fig. 1. Semente de algodão inoculada em meio MS.



Fig. 2. Planta matriz cultivada *in vitro*.



Fig. 6. Embrião somático deformado da cultivar BRS-Seridó do algodoeiro.

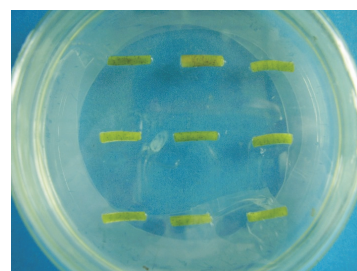


Fig. 3. Segmentos de hipocótilo em meio de indução de calos.

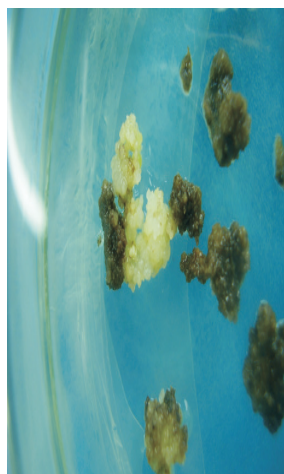


Fig. 5. Aspecto nodular de calo embriogênico de algodão.



Fig. 4. Calos do grupo 1: textura friável e coloração creme-esverdeada.

Após quatro semanas, os calos obtidos foram transferidos para os meios de proliferação (PC1 e PC2), compostos pelas mesmas substâncias do meio da indução, subtraindo-se a tiamina, e com concentrações diferentes dos fitoreguladores: PC1 - 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 0,1 mg.L⁻¹ de KIN e, PC2 - 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 0,05 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Passadas mais quatro semanas, os calos foram transferidos aos meios de regeneração, na ausência de reguladores de crescimento, tendo como base o meio MS, acrescido de vitaminas do meio B₅ (GAMBORG, 1968), 1,9 g.L⁻¹ de KNO₃ e 160 g.L⁻¹ de MgCl₂, distribuídos nos seguintes tratamentos: R1 (1 g.L⁻¹ de glutamina + 0,5 g.L⁻¹ de asparagina + 30 g.L⁻¹ de glicose); R2 (1 g.L⁻¹ de glutamina + 0,5 g.L⁻¹ de asparagina + 20 g.L⁻¹ de sacarose); R3 (2 g.L⁻¹ de glutamina + 30 g.L⁻¹ de glicose); R4 (2 g.L⁻¹ de glutamina + 20 g.L⁻¹ de sacarose).

Todos os tratamentos utilizados tiveram o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 50 mmol.m⁻²s⁻¹.

Observou-se elevada eficiência dos tratamentos quanto à formação e proliferação de calos (Figura 4). Comparando os valores obtidos para as cultivares utilizadas, verifica-se maior número de calos potencialmente embriogênicos (friáveis e creme-esverdeados) em relação aos não embriogênicos (compactos e esverdeados ou marrons), com média de 102,5 e 11,0 para a cultivar BRS Araripe e de 114,5 e 23,5 para a BRS Seridó, respectivamente.

Após 45 dias em meio de regeneração, no tratamento R1, surgiram calos friáveis, nodulares, de fácil desagregação e coloração amarelo-esverdeada, caracterizados como calos embriogênicos (CHÉE, 1990), provenientes do tratamento IC1 da cultivar BRS Seridó (Figura 5). No decorrer do quarto mês, houve o surgimento de embriões somáticos (Figura 6) formados a partir dos calos embriogênicos, entretanto, estes não seguiram o desenvolvimento normal, apresentando-se deformados.

O sucesso da embriogênese somática depende de inúmeros fatores relacionados à origem e ao tipo de material vegetal que, em sua totalidade, dificilmente poderão ser controlados, pois cada variedade reage ou responde de maneira diferente. Assim, o fato dos calos embriogênicos terem surgido a partir de apenas uma das cultivares estudadas, mesmo utilizando tratamentos idênticos para ambas, nos sugere que a habilidade em formar estruturas embriogênicas não é uma propriedade intrínseca da espécie, e sim do genótipo.

Referências

- BARROS, L. M. Embriogênese Somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.
- CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de Micropropagação**. Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1999. 39 p. (Embrapa – CNPA. Documentos, 64)
- CHÉE, P. P. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. **HortScience**, v. 25, n. 7, p. 792-793, 1990.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.
- VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p. 193-218, 1987.

**Circular
Técnica, 128**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Endereço: Oswaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
Fone: (83) 3182 4300
Fax: (83) 3182 4367
E-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): 500

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

**Comitê de
publicações**

Presidente: *Carlos Alberto Domingues da Silva*
Secretário-Executivo: *Geraldo Fernandes de S. Filho*
Membros: *Fábio Aquino de Albuquerque, Giovani Greigh de Brito, João Luis da Silva Filho, Máira Milani, Maria da Conceição Santana Carvalho, Nair Helena Castro Arriel, Valdinei Sofiatti, Wirton Macêdo Coutinho.*

Expediente

Supervisão editorial: *Geraldo Fernandes de S. Filho*
Revisão de texto: *Tarcisio Marcos de Sousa Gondim*
Tratamento das ilustrações: *Oriel Santana Barbosa*
Editoração eletrônica: *Oriel Santana Barbosa*