

Metodologia para Regeneração de Sementes Secas do Banco de Germoplasma (BAG) Algodão

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Dione Marcia de Souza²

José Wellington dos Santos³

Joaquim Nunes da Costa⁴

Eleusio Curvelo Freire⁵

O banco de germoplasma destina-se à preservação da máxima variabilidade genética vegetal existente, desde as modernas cultivares até as espécies silvestres, tendo como objetivos: conservar fontes genéticas para futuro uso em melhoramento e estudos em genética; manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para uso em programas de melhoramento; prevenir e evitar a perda de recursos genéticos. Segundo Towill (2000), este conceito pode ser restrito ao conjunto de genótipos disponíveis para melhoramento de uma espécie cultivada. A diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização, e tem sido coletada nos centros de origem das culturas.

As coleções de germoplasma têm sido mantidas em instituições diversas que se responsabilizam por: garantir a sua diversidade genética, multiplicá-las, distribuí-las aos usuários e promover a sua caracterização por diferentes metodologias (Vieira, 2000).

Os bancos de germoplasma, segundo Pasqual (1977) podem ser constituídos de diversas formas:

Conservação *in situ* - método mais simples e um dos mais eficientes no que se refere à geração de maior variabilidade, que consiste na manutenção das plantas no seu habitat natural, onde são preservadas com o mínimo de interferência do homem e ficam sujeitas à ação de fatores bióticos e abióticos capazes de induzir mutações.

Conservação *ex vitro* - consiste em manter plantas em outro habitat que não o de origem natural, sendo denominado de banco ativo de germoplasma (BAG). Esta é uma das formas de conservação mais comuns e permite a utilização Conservação de sementes - consiste na composição dos bancos de sementes, que podem ser de dois tipos: coleção de base (na qual as sementes são preservadas sob baixas temperaturas, baixa umidade relativa do ar, com constante monitoramento do poder germinativo e vigor, com esporádica multiplicação) e coleção ativa (na qual as sementes são conservadas a curto prazo, destinando-se as mesmas à multiplicação, regeneração, caracterização e avaliação; neste método, é constante a multiplicação e a indexação dos acessos, prestando-se a ainda a distribuição de sementes e conservação por período relativamente curto, imediata para o melhoramento.

¹ Eng. agrôn., D.Sc., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: Julita@cnpa.embrapa.br

² Assistente de Pesquisa da Embrapa Algodão. E-mail: Dione@cnpa.embrapa.br

³ Eng. Agrôn., M.Sc., da Embrapa Algodão. E-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

⁴ Eng. Agrôn., M.Sc., da Embrapa Algodão. E-mail: jnunes@cnpa.embrapa.br

⁵ Eng. Agrôn., D.Sc., Chefe Geral da Embrapa Algodão. E-mail: eleusio@cnpa.embrapa.br

Conservação de sementes - consiste na composição dos bancos de sementes, que podem ser de dois tipos: coleção de base (na qual as sementes são preservadas sob baixas temperaturas, baixa umidade relativa do ar, com constante monitoramento do poder germinativo e vigor, com esporádica multiplicação) e coleção ativa (na qual as sementes são conservadas a curto prazo, destinando-as à multiplicação, regeneração, caracterização e avaliação; neste método, é constante a multiplicação e a indexação dos acessos, prestando-se ainda à distribuição de sementes e conservação por período relativamente curto).

Preservação *in vitro* - consiste no uso de técnicas de cultura de tecidos e criopreservação visando manter uma grande quantidade de acessos em um pequeno espaço. A preservação *in vitro* é especialmente útil para espécies com sementes recalcitrante, como a maioria das espécies perenes tropicais, que perdem a sua viabilidade em curto período de tempo nos sistemas convencionais de conservação. Além disso, esta forma de preservação é importante para espécies de propagação vegetativa que, por não produzirem sementes ou, mesmo que as produzam, apresentam alta segregação genética devido ao elevado grau de heterozigose, implicam na necessidade de manter-se as plantas em Bancos Ativos de Germoplasma, aumentando o custo da preservação dos acessos. As principais vantagens da preservação *in vitro* residem na manutenção de genótipos em pequeno espaço, a viabilidade de uso para espécies de propagação vegetativa ou produtoras de sementes recalcitrantes, a manutenção a longo prazo dos acessos e a facilidade de preservação de explantes isentos de viroses e outros patógenos. Porém, esta forma de preservação apresenta algumas desvantagens, tais como: necessidades de subculturas periódicas, risco de perda por contaminação, risco de danos dos equipamentos de controle ambiental, possibilidade de variação genética ao longo do cultivo e inviabilidade do material estar prontamente disponível para uso do melhorista.

A técnica de cultivo *in vitro*, cultivo de embriões zigóticos é um procedimento muito comum no melhoramento de planta para regenerar embriões de sementes secas, porém sua aplicação mais frequente é no uso de sementes imaturas (Nuniz & Becerril, 1996).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo definir o melhor protocolo para regenerar embriões de sementes seca do algodoeiro afim de aumentar os acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Algodão.

Desinfecção das sementes

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, para avaliar um protocolo adequado que induzisse a germinação *in vitro* de sementes secas do BAG, durante os meses de julho a novembro de 2001, utilizando-se a seguinte metodologia.

Após a seleção das espécies do BAG do algodão, as sementes foram envolvidas em atadura de gaze e desinfetadas em solução composta por 40% de água sanitária e 60% de água destilada e desmineralizada, adicionada com uma gota do espalhante adesivo Tween 20 (Polyoxthylene-sorbitan monolaurate) durante 20 minutos e, em seguida lavadas três vezes, em água esterilizada.

Pré-tratamento

Após a desinfecção das sementes, estas foram submetidas a um pré-tratamento, colocando-as em água destilada estéril suplementada com as concentrações de ácido giberélico (GA3) 0,0; 0,5; 0,75 e 1 mg/L, por 36 e 72 horas, e depois transferidas para meio meio básico MS (Murashige & Skoog 1962) sólido.

Germinação sementes

As sementes serão empregadas de dois modos, quais sejam: sementes com e sem tegumento. As sementes tratadas foram preparadas na câmara de fluxo laminar, e cultivadas em meio MS sem reguladores de crescimento, acrescido com 3% (m/v) de glicose e 0,55% de ágar. Após o cultivo foram mantidas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Foram utilizados 4 tubos de ensaio por tratamento, com uma semente por tubo e após 12 dias do plantio foram avaliados o número de sementes germinadas.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2x4x2 (2 tipos de sementes, 4 concentrações de ácido giberélico e 2 tempos de exposição na solução do regulador de crescimento) e 4 repetições por tratamento. Os dados foram analisados mediante o procedimento "General Linear Models (GLM)" do "SAS", versão 8.2 (SAS/ 2000) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Avaliação e Resultados

Quinze dias após o cultivo, verificou-se o número de sementes secas germinadas. Na Tabela 1, encontra-se o resultado da análise estatística de germinação das sementes secas do BAG para os efeitos tipos de semente, concentração do regulador de crescimento ácido giberélico e tempo de exposição em solução de GA3. Observou-se efeito significativo para tipo de semente, não havendo, no entanto diferença para as concentrações do regulador de crescimento ácido giberélico e para o tempo de exposição na solução de GA3. Verificou-se que nos pré-tratamentos, de imersão em solução de ácido giberélico, nas concentrações 0,0; 0,5; 0,75 e 1,0 mg/L, não diferiram entre si com relação ao número de sementes secas germinadas, entretanto a concentração de 1,0 mg/L de GA3 apresentou maior número de sementes secas germinadas.

Avidos e Ferreira (2000) acelerou a germinação de sementes de annonaceas imergindo-as, em solução de ácido giberélico, na concentração de 1,0 mg/L de água por um período de 36 horas.

Tabela 1. Valores médios do número de sementes secas germinadas resultante do pré-tratamento com ácido giberélico para os fatores tipos de semente, concentrações de GA3 e tempo de exposição.

| Fatores | Número de sementes secas germinadas ¹ |
|---|--|
| Tipos de Semente | |
| Com tegumento | 1,16 b |
| Sem tegumento | 1,30 a |
| Concentração de Ácido Giberélico | |
| 0,0 mg/L | 1,21 a |
| 0,5 mg/L | 1,23 a |
| 0,75 mg/L | 1,18 a |
| 1,0 mg/L | 1,28 a |
| Tempo exposição em solução GA3 | |
| 36 horas | 1,23 a |
| 72 horas | 1,22 a |

¹ Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Médias seguidas da mesma letra dentro de cada fator não diferem significativamente entre si, pelo teste de tukey, a 5% de probabilidade.

Aclimação

Quando as plântulas apresentarem os primeiros pares de folhas verdadeiras serão retiradas dos recipientes de cultivo, lavadas com água corrente e plantadas em saco plástico, contendo um substrato esterilizado composto com três partes de turfa e uma de vermiculita. Sobre cada plântula será colocado, um frasco de vidro invertido, borrifado com água destilada e, em seguida, incubadas na câmara de crescimento nas mesmas condições de temperatura, umidade e luminosidade do cultivo. Após uma semana, a cada dia, a cobertura será retirada gradativamente até sua completa remoção. Depois da aclimação, as plantas serão levadas a casa-de-vegetação para completar seu ciclo de cultivo.

Referências Bibliográficas

- AVIDOS, M. F. D; FERREIRA, L. T. Biotecnologia. *Ciência & Tecnologia*, n° 15, p. 36-41, 2000.
- MUÑIZ, J. F. V.; BECERRIL, J. M. C. *Práticas de mejora vegetal*. Monografia
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiologia Plantarum*, v.15. p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Aplicação no melhoramento genético de plantas**. In: PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. (Ed.). cultura de tecidos vegetais cultura de tecidos vegetais. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 123 p.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT user's guide. SAS version 8.2 Cary, 2000. 1 CD- ROM.
- TOWILL, L. E. Germplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton, CRC Press, 2000. p. 337-353.
- VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. *Biotecnologia Ciência & Tecnologia*, n° 14, p. 18-20, 2000.

**Comunicado
Técnico, 142**

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: 500

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**



**Comitê de
Publicações**

Presidente: Alderi Emídio de Araújo
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevêdo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena Avelino Araújo
Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Oriel Santana Barbosa
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa