Embrapa
Algodão
CP. 174 - 58107-720 - E-mail algodao@cnpa.embrapa.br - Campina Grande, PB

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 78, set./98, p.1-4.

REGENERAÇÃO DA CULTIVAR CNPA PRECOCE 2 ATRAVÉS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Julita Maria Frota Chagas Carvalho[1]

A embriogênese somática com regeneração de planta é uma ferramenta importante nos programas do melhoramento genético de algumas culturas, mediante a utilização das técnicas de cultivo de tecido. Na investigação dos diferentes níveis de variabilidade, visando à obtenção de genótipos melhorados, a seleção de embrióides amplifica e otimiza o trabalho de seleção.

As plantas podem ser regeneradas tanto através da organogênese como por embriogênese somática. O último método é preferido, por serem os embriões somáticos originados, provavelmente, de uma única célula somática e pela sua fácil manipulação em conseqüência da ausência de uma ligação vascular destes com o tecido, o que não ocorre com plantas originadas através da organogênese.

Uma das mais significativas contribuições do cultivo de embrióides, que abriu um enorme potencial para os programas de melhoramento vegetal, bem como para pesquisas básicas e aplicadas em genética, refere-se ao cultivo de antera para produção de embrióides (Medeiros, 1997).

Até o presente momento, tem sido difícil a manipulação do algodão através do cultivo de tecidos, com obtenção da embriogênese somática em poucas cultivares de *Gossypium hirsutum* (Davidonis & Hamilton, 1983; Trolinder & Goodin, 1987; Trolinder & Xhixian, 1989; Gawel & Robacker, 1990) e da espécie silvestre *G. klotzchianum* (Price & Smith, 1979). Desafortunadamente, a embriogênese somática parece não ser uma característica favorável presente nas plantas cultiváveis atuais e, portanto, esta habilidade passa a ser dependente de cada genótipo e do meio de indução dos calos.

A produção de plantas de algodão por meio da engenharia genética está limitada pela especificidade da cultivar, já que a mesma tem que ser embriogênica para que se possa regenerar a planta; além disso, o algodão não é muito receptivo aos genes estranhos (John & Stewart, 1992) embora já se tenha conhecimento de plantas transgênicas resistentes a lagartas e tolerantes a herbicidas e a doenças. Atualmente, os genótipos que têm mostrado maior capacidade regenerativa são as cultivares Coker. As variedades Coker não são exatamente as melhores agronomicamente, mas são facilmente transformáveis podendo,

[1]Pesquisador, Dr. da Embrapa Algodão, CP. 174, CEP 58107-720 – Campina Grande, PB.

posteriormente, transferir-se os novos genes às cultivares agronomicamente superiores, por retrocruzamentos genéticos convencionais; mesmo levando-se em consideração que a transferência dos novos genes a outras cultivares não é tão fácil, com possibilidade de limitações, tais como: o número de genes que podem ser levados junto com os novos genes, transferidos, o tempo que leva e o intenso trabalho. O ideal seria estabelecer protocolos adequados para a indução da embriogênese somática e condições para conversão dos embrióides em plântulas num maior número de cultivres comerciais, para que estas possam ser transformadas.

A finalidade do presente trabalho foi desenvolver um método para a obtenção de embriões somáticos na cultivar precoce de algodão (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch cv. CNPA Precoce 2) e seu subseqüente desenvolvimento.

Descrevem-se, a seguir, os protocolos utilizados para a regeneração da cultivar CNPA Precoce 2.

Obtenção do material vegetal

O material vegetal utilizado para indução de calo da cultivar CNPA Precoce 2 foi obtido a partir de plântulas procedentes de sementes germinadas *in vitro*. Foi semeada uma semente por tubo de ensaio em meio-base de MS (Murashige & Skoog, 1962); depois de quatro a cinco dias de iniciada a germinação obtiveram-se plântulas, das quais foram retirados os explantes primários. Os explantes utilizados para a indução de calo foram fragmentos de hipocótilo de 4mm de tamanho.

Indução da embriogênese somática

Os calos foram iniciados a partir de explantes de hipocótilo em meio de Murashige & Skoog, suplementado com 0,4 mg/ℓ de tiamina mais 0,75 g/L de $MgCl_2$ + 0,1 mg/ℓ de 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) + 0,5 mg/ℓ de 2iP (6-γ,γ-dimetilalilamino purina) com 30 g/L de glicose e solidificado com 1,6 g/ℓ de gelrite. Depois de quatro semanas, os calos foram transferidos ao meio MB_5 (sais de Murashige & Skoog mais vitaminas B_5 mais 0,75 g/ℓ de $MgCl_2$) com os mesmos reguladores de crescimento e nas mesmas concentrações utilizadas na indução dos calos, substituindo-se a glicose pela sacarose, trocando-se a fonte de carbono, com base em referências que indicam a sacarose como favorável à indução da embriogênese somática (Shoemaker et al., 1986).

Posteriormente, depois de outras quatro semanas os calos foram selecionados e separados do explante inicial e, em seguida, transferidos (1g por repetição) a meio MS sem reguladores de crescimento para ser induzida a embriogênese somática. Os calos foram transferidos para meio fresco a cada quatro semanas, durante cinco subcultivos sucessivos, retirando-se os embrióides formados, que se observavam a olho nu.

O procedimento utilizado para a produção de embrióides em algodão consistiu na indução de calo em meio com auxina e citocinina, com posterior transferência para meio fresco com os mesmos reguladores de crescimento; em seguida, os calos foram cultivados em meio totalmente livre de reguladores de crescimento, sem nenhum outro suplemento para induzir a formação de embrióides (Shoemaker et al., 1986; Shoemaker et al., 1987; Finer, 1988; Firoozabady & DeBoer, 1993). Na literatura são encontrados trabalhos com *Gossypium hirsutum* com a utilização de diversas modificações do meio-base para inibir a embriogênese somática (Davidonis & Hamilton, 1983; Voo et al., 1991).

Germinação dos embrióides e regeneração das plantas

Os embrióides formados na cultivar CNPA Precoce 2, utilizados para a germinação, foram separados anteriormente dos calos, como forma de sementes nos estados globular, coração, torpedo e cotiledonar; depois, foram semeados em meio sólido ou líquido de SHs (meio de Stewart & Hsu, 1977) com 20 g/ℓ de sacarose. A cada quatro semanas os embrióides, germinados ou não, foram transferidos para meio fresco, até se obter a regeneração das plantas o que, normalmente, ocorreu entre oito a doze semanas.

Tratando-se da cultura do algodão foi obtido maior êxito na germinação de embrióides e regeneração de plantas em meio SHs, com um baixo nível iônico (Froozabady & DeBoer,1993); entretanto, em outros trabalhos os autores (Davidonis & Hamilton, 1983; Finer, 1988; Finer & McMullen, 1990) obtiveram regeneração de planta em meio MS sem NH_4NO_3, com o dobro da concentração de KNO_3.

Aclimatação

Quando as plantas originadas a partir de embrióides continham quatro a cinco folhas verdadeiras e um sistema radicular ligeiramente desenvolvido, foram transferidas para condições *ex vitro*.

Para a aclimatação das plântulas obtidas mediante embriogênese somática, seguiram-se os seguintes passos:

1. as plantas foram retiradas com cuidado para não danificar o sistema radicular;
2. a zona que estava imersa no meio foi lavada com água corrente, para eliminar os restos do mesmo;
3. foi realizado o transplante das plântulas para vasos de plástico de 10cm de diâmetro com uma mistura de turfa e vermiculita, na proporção de 1:1 (v/v). As plântulas foram cobertas com frascos de vidro, colocados em posição invertida.

Depois de vinte dias, as cobertas protetoras foram retiradas progressivamente; depois do período de aclimatação as plântulas foram transplantadas para vasos maiores e transferidas para a casa-de-vegetação, para completar o seu desenvolvimento até a floração e formação de frutos.

O processo todo, desde o pequeno explante até a obtenção da uma planta regenerada através de embriões somáticos crescida no solo, pode demorar de 9 a 12 meses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIDONIS, G.H.; HAMILTON, R.H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. **Plant Science Letters**, v.32, p.89-93, 1983.

FINER, J.J. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v.7, p. 399-402, 1988.

FINER, J.J.; MCMULLEN, M.D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v.8, p. 586-589, 1990.

FIROOZABADY, E.; DeBOER, D.L. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivares of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Vitro Cell Developmental Biology,** v.29, p.166-173, 1993.

GAWEL, N.J.; RAO, A.P.; ROBACKER, C.D. Somatic embryogenesis from leaf and petiolocallus cultures of *Gossypium hirsutum* L. **Plant Cell Reports,** v.5, p.457-459, 1986.

GAWEL, N.J.; ROBACKER, C.D. Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. **Plant Cell Tissue Organ Culture,** v.23, p.201-204, 1990.

JOHN, M.E.; STEWART, J. Mc. Genes for jeans: biotechnological advance in cotton. **Tibtech,** v.10, p.165-170, 1992.

MEDEIROS, J.D. Embrióides em plantas superiores. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento,** v.1, p.10-12, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum,** v.15, p.473-497,1962.

PRICE, H.J.; SMITH, R.H. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzchianum* Andress. **Planta,** v. 145, p.305-307, 1979.

SHOEMAKER, R.C., CHRISTOFFERSON, S.E.; GALBRAITH, D.W. Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports,** v.3, p.178-181,1987.

SHOEMAKER, R.C.; COUCHEL, J.; GALBRAITH, D.W. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Plant Cell Reports,** v.3, p.178-181, 1986.

STEWART , J.M.; HSU, C.L. In-ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Planta,** v.137, p.113-117, 1977.

TROLINDER, N.L.; GOODIN, J. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports,** v.6, p.231-234, 1987.

TROLINDER, N.L.; XHIXIAN, C. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. **Plant Cell Reports,** v.8, p.133-136, 1989.

VOO, K.S.; RUGH, C.L.; KAMALAY, J.C. Indirect somatic embryogenesis and plant recovery from cotton *(Gossypium hirsutum* L.). **Vitro Cell Developmental Biology,** v.27, p.117-124, 1991.