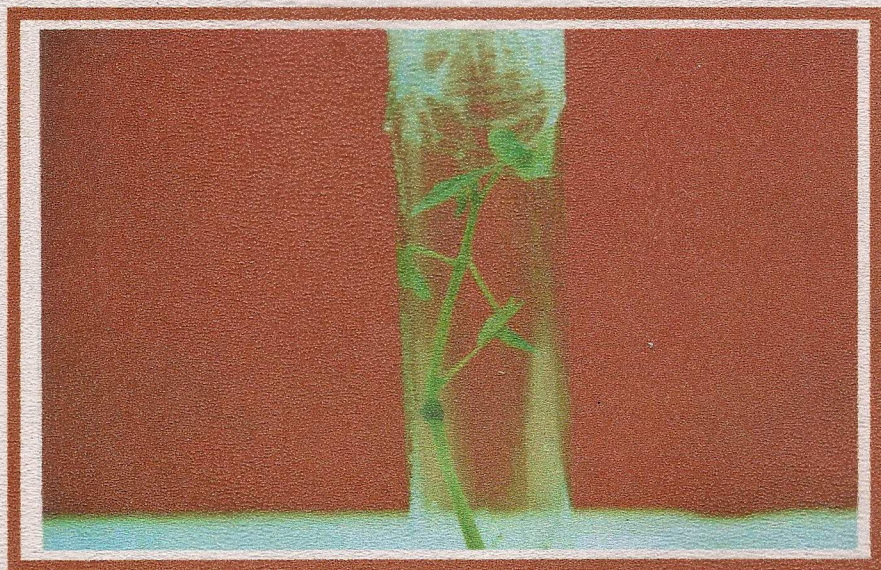


METODOLOGIA PARA DESINFECÇÃO E REGENERAÇÃO DE GEMAS REJUVENESCIDAS DO ALGODOEIRO ARBÓREO



METODOLOGIA PARA DESINFECÇÃO E REGENERAÇÃO DE GEMAS REJUVENESCIDAS DO ALGODOEIRO ARBÓREO

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Fabíola Nunes Barbosa de Almeida
Francisco Pereira de Andrade
José Wellington dos Santos

Unidade:	Embrapa
Valor aquisição:	
Data aquisição:	6-10-01
N.º N.º Fisco/Fatura:	
Fornecedor:	
N.º OCS:	
Origem:	UMT
N.º Registro:	02-0028

Embrapa

Formatizado

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz 1143, Centenário

Caixa Postal 174

Telefone (0xx83) 321-3608

Fax (0xx83) 322-7751

58107-720 - Campina Grande, PB

E-mail: algodao@cnpa.embrapa.br

<http://www.cnpa.embrapa.br>

Tiragem: 200 exemplares

Editoração Eletrônica: Maria do Socorro Alves de Sousa

Comitê de Publicações:

Presidente: Alderi Emídio de Araújo

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Demóstenes Marcos Pedrosa de Azevedo

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 Macedo Beltrão

Rosa Maria Mendes Freire

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB)

Metodologia para desinfecção e regeneração de gemas rejuvenescidas do algodoeiro arbóreo, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e outros. Campina Grande, 2001.

15p. (EMBRAPA-CNPÁ. Boletim de Pesquisa, 47)

1. Algodão Arbóreo - Regeneração - Gema. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Almeida, F.N.B. de. III. Andrade, F.P. de. IV. Santos, J.W. dos. V. Título. VI. Série.

CDD 633.51

©Embrapa 2001

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4. CONCLUSÕES	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

METODOLOGIA PARA DESINFECÇÃO E REGENERAÇÃO DE GEMAS REJUVENESCIDAS DO ALGODOEIRO ARBÓREO

RESUMO: Com este trabalho, objetivou-se estudar protocolos de desinfecção de estacas e gemas e o de regeneração de gemas rejuvenescidas do algodoeiro arbóreo. Foram instalados dois ensaios estudando-se, no primeiro, os tipos de desinfecção e tempo de exposição das gemas rejuvenescidas e, no outro, os tipos de pré-tratamento das estacas, concentração da solução desinfectante e seleção de meios adequados para regeneração dessas gemas. Os dados obtidos foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do "SAS" e as médias comparadas pelo teste de F, a 5% de probabilidade. No primeiro ensaio, a desinfecção com hipoclorito de sódio a 0,75% foi a que apresentou maior número de gemas sadias, enquanto o melhor tempo de exposição foi de 10 minutos. No segundo ensaio observou-se superioridade nas variáveis tratamento das estacas com hipoclorito de sódio a 5% + Benlate a 2g/l, desinfecção das gemas com hipoclorito de sódio a 0.75% de cloro ativo por 10 minutos e no meio MS suplemento com 1,0mg/l de BAP.

Palavras-chave: Desinfecção, hipoclorito de sódio, pré-tratamento estaca, algodão

METHODOLOGY FOR DISINFECTION AND REGENERATION OF REJUVENATED YOLKS OF THE ARBOREAL COTTON

ABSTRACT: The objective of this work, was to study protocols of disinfection of stakes and yolks and the one of regeneration of rejuvenated yolks of the arboreal cotton. Two experiments were carried out, in the first, the disinfection types and time of exhibition of the rejuvenated yolks and, in the other, the types of pre-treatment of the stakes, concentration of the solution desinfectant and selection of appropriate means for regeneration of those yolks. The data were analysed by using the "General Linear Model (GLM)" of "SAS" program, and the averages compared by the test of F, to 5% of probability. In the first experiment, the disinfection with 0.75% sodium hypochlorite was the one that presented larger number of healthies yolks, while the best time of exhibition was of 10 minutes. In the second experiment superiority was observed in the variables treatment of the stakes with 5% sodium hypochlorite + 2g/l Benomyl, disinfection of the yolks with 0,75% sodium hypochlorite of active chlorine for 10 minutes and in the medium MS supplement with 1.0mg/l BAP.

Key words: disinfection, sodium hypochlorite, treatment stake, cotton.

METODOLOGIA PARA DESINFECÇÃO E REGENERAÇÃO DE GEMAS REJUVENESCIDAS DO ALGODOEIRO ARBÓREO

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Fabíola Nunes Barbosa de Almeida²

Francisco Pereira de Andrade³

José Wellington dos Santos⁴

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma grande preocupação em se preservar a variabilidade genética existente na natureza, a qual vem sendo reduzida com o avanço da exploração dos recursos naturais. Como todo programa de melhoramento genético requer variabilidade, a fim de possibilitar a seleção de materiais superiores para determinada característica, é essencial preservar-se parte da enorme gama de genes no ambiente natural. O cultivo *in vitro* é útil para manter germoplasma de diversas espécies em um pequeno espaço e por longo período de tempo. Preferencialmente, o material a ser preservado deve ser obtido de meristemas, por ser isento de viroses e geneticamente estável. Uma das grandes vantagens da preservação *in vitro* é o intercâmbio de germoplasma, permitindo que genótipos sejam facilmente transportados entre países, com segurança de que não

¹ Eng^a Agr^a, Dr^a, Pesquisadora da Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720 - Campina Grande, PB e-mail julita@cnpa.embrapa.br

² Estagiária da UEPB

³ Eng^o Agr^o, BSc, Pesquisador da Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720 - Campina Grande, PB

⁴ Eng^a Agr^a, MSc, Pesquisador da Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720 - Campina Grande, PB e-mail jwsantos@cnpa.embrapa.br

se está introduzindo doenças ainda não encontradas num país. O material vegetativo importado *in vitro* apresenta a vantagem adicional de chegar ao seu destino em condições de ser multiplicado, o que freqüentemente não ocorre com estacas ou outro tipo de propágulo, devido ao longo tempo em que o material pode permanecer até a liberação alfandegária.

O algodoeiro arbóreo (*Gossypium hirsutum* L.r. *marie galante* Hutch) é um rico repositório de genes que podem ser de utilidade nos programas de melhoramento genético que visem incorporar muitas de suas características, em especial as relacionadas às excepcionais propriedades tecnológicas de sua fibra. Portanto, dado o estado de decadência desta lavoura urge, então, que se preserve este patrimônio genético, visando barrar o processo violento de erosão genética a que ele vem sendo submetido no Nordeste brasileiro.

O método convencional de propagação vegetativa no algodoeiro se dá através de estaca, mas a taxa de multiplicação por este procedimento é baixa mas, com a utilização da técnica da micropropagação através de gemas e/ou meristemas, é possível a obtenção de plantas geneticamente idênticas às do exemplar original, em um número elevado e num breve espaço de tempo (Gyves, 1994).

Apesar de existirem alguns trabalhos que estudaram a micropropagação através de gemas no algodão herbáceo, ainda não se definiu as condições de cultivo para a regeneração de planta completa, a partir de gema (Vesmanova & Dani, 1992).

Este trabalho tem por objetivo estudar protocolos de desinfecção de estacas e gemas e a regeneração de gemas rejuvenescidas do algodoeiro arbóreo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de algodoeiro arbóreo foram selecionadas no campo e estacas de ± 15 cm de tamanho foram coletadas e

levadas ao Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão para a indução do rejuvenescimento das gemas.

Foram instalados dois ensaios estudando-se, no primeiro, os tipos de desinfecção e o tempo de exposição das gemas rejuvenescidas e, no outro, os tipos de pré-tratamento das estacas, a concentração da solução desinfectante e a seleção de meios adequados para regeneração dessas gemas. No primeiro ensaio, antes da indução das gemas, as estacas foram lavadas com água e sabão e depois imersas numa solução de hipoclorito de sódio a 0,025%.

Foi induzida a brotação das estacas mediante sua imersão parcial em soluções de ácido naftalenoacético (NAA) (1mg/l) (Figura 1); em seguida, colocadas na câmara de crescimento e, a cada 3 dias, foram trocadas as soluções. Após 20 dias, as gemas rejuvenescidas foram excisadas, lavadas com sabão e água corrente e, depois, desinfectadas em dois tipos de desinfecção; gemas desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,75% de cloro ativo e gemas desinfectadas da mesma forma anterior mais 50mg/l de Benlate, durante 5 e 10 minutos, respectivamente. Após a desinfecção, as gemas foram lavadas três vezes, em água esterilizada, depois tratadas e cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) sem reguladores de crescimento. Utilizaram-se 15 tubos de ensaio por tratamento, com um explante por tubo avaliando-se, após 4 semanas, o número de gemas sadias e vivas; já no segundo ensaio, antes da indução das gemas as estacas foram submetidas a dois tipos de pré-tratamento, que consistiram no mesmo utilizado no primeiro ensaio e no outro, as estacas, depois de lavadas com água e sabão, foram imersas numa solução de hipoclorito de sódio a 0,12% e, em seguida, em solução de Benlate na concentração de 2g/l, por 10 minutos. As gemas rejuvenescidas foram desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e 0,75%, respectivamente, por 10 minutos. Para a seleção de meios adequado para regeneração das gemas, estas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10ml de meio básico MS

sólido, suplementado com os seguintes balanços hormonais: MSO (sem reguladores de crescimento), MS1, MS2 com 0,5 e 1 mg/ℓ de BAP (bencilaminopurina), respectivamente. Os meios dos dois ensaios foram acrescidos com 3% de glicose e 0,55% de ágar mais 0,75mg/ℓ de MgCl₂. O pH dos meios foi ajustado para, 5,7 – 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C por 20 minutos. Neste último, utilizaram-se 10 tubos de ensaios por tratamento, com um explante por tubo e após 4 semanas, avaliou-se o número de gemas regeneradas.

Em todos os casos, a incubação foi mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com um fotoperíodo de 16h luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os dados obtidos foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do "SAS" e as médias foram comparadas pelo teste de F, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, encontram-se o resultado da análise estatística do número de gemas sadias e o número de gemas vivas para os efeitos tipos de desinfecção e tempo de exposição. Para a variável número de gemas sadias, observou-se efeito significativo para os tipos de desinfecção e tempo de exposição, não havendo diferença, no entanto, para a variável número de gemas vivas, verificando-se que a desinfecção com hipoclorito de sódio a 0,75% foi a que apresentou maior número de gemas sadias, enquanto o melhor tempo de exposição foi de 10 minutos. Carvalho et al. (1999) estudando três concentrações de hipoclorito de sódio (0,12; 0,25 e 0,50%) na desinfecção de gemas rejuvenescidas do algodoeiro arbóreo, observaram que a menor contaminação foi conseguida na concentração de 0,50% de hipoclorito de sódio por 10 minutos.

Na Tabela 2, apresenta-se o resultado da análise estatística do número de gemas regeneradas para os efeitos tipos

de pré-tratamento das estacas, concentração da solução desinfetante das gemas e meios de cultivo referentes à variável número de gemas regeneradas, não apresentando efeito significativo entre nenhuma das variáveis estudadas; entretanto, observou-se superioridade no número de gemas regeneradas nas variáveis: tratamento das estacas com hipoclorito de sódio a 5% mais Benlate a 2g/l, na desinfecção das gemas com hipoclorito de sódio a 0,75% de cloro ativo e no meio MS suplementado com 1,0mg/L de BAP (Figura 2); no entanto, observou-se abaixo poder de regeneração das gemas, provavelmente por ter sido utilizado a água sanitária utilizada como fonte de hipoclorito de sódio, pois segundo Teixeira et al. (2001) não se deve utilizar água sanitária comercial por ela apresentar alto teor de hidróxido de sódio, e, conseqüentemente, alto pH, o que pode acarretar a morte das gemas.

Tabela 1. Valores médios para os fatores, tipos de desinfecção e tempo de exposição das gemas rejuvenescidas, referentes às variáveis número de gemas sadias e número de gemas vivas.

Fatores	Variáveis	
	Nº de gemas sadias ¹	Nº de gemas vivas ¹
Tipos de desinfecção		
NaOCl 0,75%	1,342a	1,031a
NaOCl 0,75% + benlate 50mg/l	1,197 b	1,021a
Tempo de exposição		
5 minutos	1,217 b	1,031a
10 minutos	1,321a	1,021a

Médias seguidas pelas mesmas letras dentro de cada fator nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de F a 5% de probabilidade

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

Tabela 2. Valores médios para os fatores tipos de pré-tratamento das estacas, concentração da solução desinfetante das gemas e meios de cultivo referentes à variável número de gemas regeneradas.

Fatores	Nº de gemas regeneradas ¹
Tipos pré-tratamento das estacas	
Hipoclorito de sódio a 1%	1,049
Hipoclorito de sódio a 5% + benlate a 2g/l	1,059
Concentração da solução desinfetante	
Hipoclorito de sódio a 0,75%	1,079
Hipoclorito de sódio a 0,50%	1,029
Meios de cultivo	
MS	1,044
MS + 0,5mg/l de BAP	1,044
MS + 1,0mg/l de BAP	1,074

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



Figura 1. Indução da brotação das estacas mediante sua imersão parcial em soluções de ácido naftalenoacético (NAA) (1mg/l).

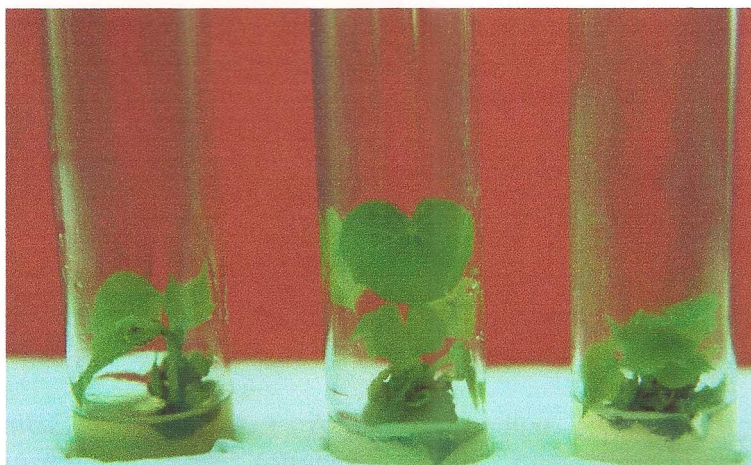


Figura 2. Gemas regeneradas do algodoeiro arbóreo no meio básico MS suplementado com 1,0mg/l de BAP.

4. CONCLUSÕES

- A concentração de hipoclorito de sódio a 0,75% é efetiva na desinfecção das gemas.
- O tempo de 10 minutos de exposição das gemas ao desinfetante foi eficiente.
- As estacas pré-tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 5% mais Benlate a 2g/l favorecem a regeneração das gemas.
- O meio MS suplementado com BAP a 1mg/l favorece a regeneração das gemas.
- Em todos os meios estudados houve baixo poder de regeneração das gemas.
- Outra fonte de hipoclorito de sódio deve ser estudada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, J.M.F.C.; CARVALHO, O.S.; ANDRADE, F.P. de; SANTOS, J.W. dos; MONTEIRO, J.A. Regeneração de gemas axilares do algodoeiro arboreo. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1999. 3p. (Embrapa-CNPA. Comunicado Técnico, 104).

GYVES, E.M. **Agrobiotecnología**. México: Iberoamérica, 1994. p.78.

MANGUEIRA, O.B. Taxa de alogamia na cultura do algodoeiro "mocó". **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v.50, p.1-22, 1971.

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

TEIXEIRA, J. B.; RAMOS CRUZ, A.R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Biotecnologia aplicada `produção de mudas. **Bio Tecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, v.3 p.42-47, 2001.

VESMANOVA, Y.; DANI, R.G. Influence of carbohydrate composition of media on clonal micropropagation ability of cotton. **Advances Plant Science**, v.5 p. 97-99, 1992. '