



### Otimização da Metodologia da Regeneração de Embrião Imaturo de Algodão

Julita Maria Frota Chagas Carvalho<sup>1</sup>

Rosemberg Lima de Sousa Júnior<sup>2</sup>

Kilson Pinheiro Lopes<sup>3</sup>

José Wellington dos Santos<sup>4</sup>

As técnicas de engenharia genética na área vegetal estão avançando rapidamente. Os métodos de regeneração de plantas constituem condição prévia essencial para se alcançar as metas da engenharia genética. A regeneração de plantas a partir do cultivo de embrião *in vitro*, é uma técnica que vem sendo utilizada há bastante tempo; já em 1941, Van Overbeek conseguiu que embriões imaturos desenvolvessem pela suplementação de sacarose, sais minerais e leite de coco (WAREING et al., 1970).

A técnica de cultivo de embriões zigóticos *in vitro* vem sendo empregada para superar a dormência de sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma; estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; testar a viabilidade das sementes; recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis e como fonte de explantes com tecido de elevada totipotência (HU et al., 1998).

O cultivo de embriões, assim como qualquer outra técnica de cultura de tecidos, exige cuidados

fundamentais para o seu sucesso. A assepsia do material estudado deve ser rigorosa, de modo que impeça a proliferação de organismos que possam contaminar os explantes, tais como fungos e bactérias. No isolamento de embriões jovens tem-se feito uso *de* cultura estéril, com o cuidado, porém, para não danificá-lo no momento da excisão (WAREING, et al., 1970).

Com relação ao meio de cultivo, deve conter os nutrientes básicos para o desenvolvimento do embrião. Os embriões imaturos só podem desenvolver com sucesso quando são colocados em meio contendo elementos aditivos mais complexos que os exigidos pelos embriões maduros (STEEVES et al., 1972). As mudanças nos nutrientes do meio, principalmente alterações envolvidas no balanço de auxina e citocinina, são essenciais para o desenvolvimento do embrião (WAREING et al., 1970). O IAA se concentra especialmente em regiões de crescimento, como os cotilédones em desenvolvimento; já a citocinina regula o crescimento pela estimulação da divisão celular (MITCHELL, 1970). A sacarose está presente como fonte de carbono para a glicólise e o ciclo de Kre,

<sup>1</sup>Eng. Agr. Ph.D., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CP 174, CEP 58.107-720, Campina Grande, PB. e-mail: julita@cnpa.embrapa.br

<sup>2</sup>Estudante de Biologia, Departamento de Farmácia e Biologia, UEPB/CCBS, Campina Grande, PB. e-mail:saojunio@hotmail.com

<sup>3</sup>Eng. Agr., M.Sc., Doutorando em agronomia, DF/CCA/UFPB, Areia, PB. e-mail: kilsonlopes@terra.com.br

<sup>4</sup>Eng. Agr., M.Sc., da Embrapa Algodão, e-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

devido ao explante não ser autotrófico (CID, 2001).

As maçãs do algodoeiro *Gossypium hirsutum* cultivar Coker 312, com 18, 20 e 25 dias após autofecundação, foram obtidas de plantas cultivadas em 2002 em casa de vegetação da Embrapa Algodão, localizada em Campina Grande, PB, e levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa, onde foram submetidas a desinfestação em etanol (EtOH) 70% durante um minuto, e posteriormente em hipoclorito de sódio (NaOCl) (alvejante comercial com 2 a 2,5% de cloro ativo) durante cinco minutos sob agitação em agitador magnético; logo em seguida, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foram efetuadas três lavagens em água destilada estéril.

Os embriões imaturos foram retirados com o auxílio de lupa, bisturi e pinça esterilizados em ambiente estéril. Com o auxílio do bisturi foi aberta a maçã e retiradas as sementes; destas, retirou-se o excesso de fibras da superfície. As sementes foram submetidas a um corte para separar o endosperma do embrião; em seguida, os embriões foram cultivados no meio basal MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 5,5 (g.L<sup>-1</sup>) de ágar, carvão ativado (1,5 g.L<sup>-1</sup>) suplementados com: ME0 – MS básico + 0,1 mg.ml<sup>-1</sup> IAA; ME1- MS + 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>IAA + 10% de água de coco; ME2 - MS + 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>IAA + 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>KIN + 10% de água de coco; ME3 - MS + 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>IAA + 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>KIN + 10% de água de coco; ME4 - MS + 1,5 mg.ml<sup>-1</sup>IAA + 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>KIN + 10% de água de coco; ME5 - MS + 1,5 mg.ml<sup>-1</sup>IAA + 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>KIN + 250 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, todos com o pH ajustado para 5,8.

Depois de cultivados os embriões foram colocados em estufa B.O.D. a 28 °C onde permaneceram 20 dias no escuro; passado esse período, os embriões foram submetidos a fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) com intensidade luminosa de 50 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Utilizaram-se dez frascos por tratamento, com cinco embriões cada um. Os embriões foram avaliados após os 25 dias no claro. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado no arranjo fatorial 3x6 (três idades e seis meios) com 15 repetições por cada tratamento. Os dados obtidos foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  e analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do "SAS", versão 6 (1985) com médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Figura 1 encontra-se o resultado da análise estatística da regeneração dos embriões imaturos

*Gossypium hirsutum*, variedade Coker 312, para os efeitos de meios de cultivo e idade das maçãs. Constatou-se efeito significativo para os meios de cultivo e para as idades. As idades dos embriões influenciaram na regeneração, de modo que, quanto mais jovem o embrião for, menor será o seu potencial de regeneração. Se os embriões forem excisados em fase muito jovem, eles não se desenvolverão, mesmo se suplementados com sacarose e sais minerais (WAREING et. al., 1970).

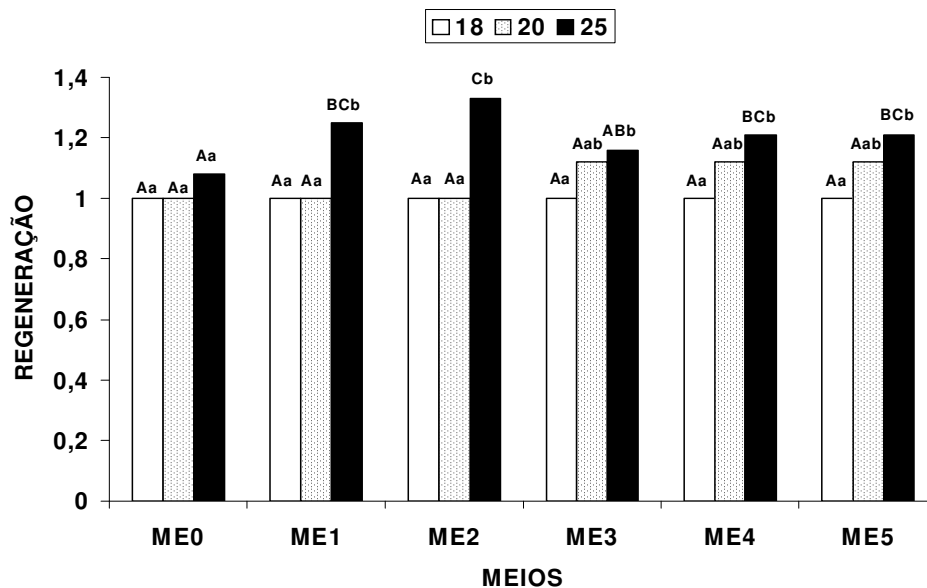
Os embriões com 18 dias não regeneraram em nenhum dos meios estudados, mesmo quando suplementados com reguladores de crescimento. Embriões de 20 dias demonstraram ser mais viáveis que aos dos embriões de 18 dias nos meios ME3, ME4 e ME5, porém o seu desempenho é inferior aos embriões de 25 dias, pois esses se regeneraram nos meios ME1, ME2, ME3, ME4 e ME5; entretanto, no meio ME2 (MS + 0,1mg/L IAA + 0,1mg/L KIN + 10% de água de coco) foi obtido o maior número de embriões regenerados.

## Conclusão

- Os embriões de 18 dias são inviáveis para a obtenção de plântulas a partir da regeneração do embrião imaturo.
- Os embriões com idade de 25 dias apresentam grande potencial de regeneração, tornando-se, assim, os mais favoráveis para a obtenção de plântulas.
- O meio MS suplementado com 0,1 mg/L IAA + 0,1 mg/L KIN + 10% de água de coco é o mais adequado para a regeneração de embriões imaturos de 25 dias.

## Referências Bibliográficas

- CARVALHO, J.M.F.C.; CAVALCANTI, R.S.; SANTOS, J.W.dos. Obtenção de plantas de algodão pelo resgate de embrião imaturo. In: Congresso Brasileiro de Algodão, 3, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campina Grande Embrapa Algodão, 2001. p.38-40.
- CID, P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**- v.3, n.19, p.16-21, 2001.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embrião In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1998 p. 71-85.



**Fig. 1.** Número de embriões regenerados de diferentes idades em meio MS, com variação dos reguladores de crescimento IAA e KIN. Letras minúsculas comparam as diferentes idades em um mesmo meio e letras maiúsculas comparam os diferentes meios em uma mesma idade. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e maiúsculas, não são significativamente diferentes entre si. Dados transformados em  $\sqrt{x + 1}$

MITCHELL, R.L. **Crop growth and culture.** Iowa: The Iowa State University Press, Iowa, 1970.

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

STEEVES, A.T.; SUSSEX, I.M. **Patterns in plant development.** New Jersey:- Prentice-Hall, New Jersey, 197.

WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **The control of growth & differentiation in plants – Great Britain ,** Pergamon Press Ltda, 1970.

#### Comunicado Técnico, 173

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Algodão  
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174  
58107-720 Campina Grande, PB  
Fone: (83) 315 4300 Fax: (83) 315 4367  
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br  
1ª Edição  
Tiragem: 500



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  
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