



## Efeito de Reguladores de Crescimento na Obtenção de Calos Embriogênicos do Algodoeiro

Julita Maria Frota Chagas Carvalho<sup>1</sup>  
Maria Jaislanny L. e Medeiros<sup>2</sup>  
Marina Medeiros de A. Silva<sup>2</sup>  
Roseane Cavalcanti dos Santos<sup>3</sup>

A propagação *in vitro* é o nome dado ao conjunto de técnicas de cultura de tecidos usadas para multiplicação de plantas a partir de pequenos explantes. Essa técnica permite a obtenção de um grande número de plantas em um espaço físico e temporal pequeno, cujos indivíduos são geneticamente idênticos à planta doadora dos explantes (SANTOS, 2003).

Na cultura de tecidos, a propagação *in vitro* é a modalidade que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (ERIG; SCHUCH, 2005); constitui-se em um modo de se manter, sempre disponíveis, explantes saudáveis e livres de contaminação (CABRAL et al., 2003).

De acordo com Carvalho (1996), o cultivo de tecidos permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais (iluminação e temperatura) controladas. Essa técnica baseia-se, principalmente, no

aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões que darão lugar a uma planta inteira (embriogênese somática) em um meio de cultivo favorável.

Gomes et al. (2007) afirmam que o estabelecimento de cultura de calos é um importante passo para futuros estudos da organogênese e da embriogênese somática. Conforme Ferreira et al. (2005), pelo segundo método, podem-se regenerar plantas-elite *in vitro*, em larga escala, sendo também uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião.

Embriogênese somática é o processo pelo qual células se desenvolvem através de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta sem que ocorra fusão de gametas (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986 apud GUERRA et al., 1999). Esse processo é uma ferramenta importante nos programas de melhoramento de algumas culturas, mediante a utilização das técnicas de cultivo de tecido. Segundo Gyves (1994), essas técnicas são

<sup>1</sup>Eng. Agrôn. Dr. da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720 Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual da Paraíba, Estagiárias da Embrapa Algodão. E-mail: jaislanny@yahoo.com.br; marinamedeirosas@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Eng. Agrôn. D.Sc. da Embrapa Algodão. E-mail: caval@cnpa.embrapa.br

fundamentais para se resolver, em curto e médio prazos, os múltiplos problemas referentes ao melhoramento genético do algodão, muito embora não objetivem substituir as convencionais mas, sim, complementá-las.

A embriogênese é empregada sobretudo na propagação massal clonal de genótipos superiores, sendo importante na obtenção de plantas geneticamente transformadas.

Com este trabalho, objetivou-se obter embriões somáticos da cultivar de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) BRS Verde, para, assim, colocar essas técnicas à disposição do melhoramento e da biotecnologia.

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultivo de Tecidos da Embrapa Algodão. Após sete dias da germinação *in vitro* em meio MS básico Murashige e Skoog (1962), segmentos de hipocótilo da cultivar BRS Verde foram cultivados durante quatro semanas, em placas de Petri, com diferentes meios de indução de calo.

Utilizaram-se cinco tipos de meios de indução, todos contendo sais do meio MS + 10 ml.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> + 30 g.L<sup>-1</sup> de maltose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina + 2,5g.L<sup>-1</sup> de gelrite, variando os fitoreguladores e suas concentrações: ICP2: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D (ácido diclorofenoxiacético) + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN (cinetina); ICP3: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP(6-( $\gamma$ - $\gamma$ -dimetilalimino) purina); ICP4: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D + 0,3 mg.L<sup>-1</sup> PRC (Picloran); ICP5: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftaleno acético) + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; ICP6: 0,3 mg.L<sup>-1</sup> PRC + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de KIN.

Passado esse período, os calos foram transferidos para os meios de proliferação compostos de sais do meio MS + 5 ml.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> + 30 g.L<sup>-1</sup> de glucose + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina + 2,5 g.L<sup>-1</sup> de gelrite + diferentes concentrações de reguladores de crescimento: PCP2: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN; PCP3: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D + 5 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; PCP4: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D + 2 mg.L<sup>-1</sup> PRC; PCP5: 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 5 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; PCP6: 2 mg.L<sup>-1</sup> PRC + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de KIN. Os calos permaneceram durante três semanas nesses meios.

Após as quatro semanas de indução e as três da proliferação, os calos foram submetidos a uma avaliação, observando-se coloração, textura e contaminação. Posteriormente fez-se uma raspagem dos calos transferindo-os para quatro diferentes meios de indução da embriogênese somática, todos com sais do meio MS acrescido com vitaminas do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), 5mg.L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, glutamina, asparagina, 2,5g.L<sup>-1</sup> de gelrite e sem reguladores de crescimento: MIEG1 (30 g.L<sup>-1</sup> de glucose), MIEG2 (20 g.L<sup>-1</sup> de glucose), MIEG3 (30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + KNO<sub>3</sub>) e MIEG4 (20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + KNO<sub>3</sub>). Enfim, todos foram subcultivados e avaliados a cada quatro semanas, observando-se a formação de embriões.

Todos os tratamentos foram eficientes na formação de calos e os resultados da avaliação, após a indução, estão demonstrados na Tabela 1, na qual se observaram algumas diferenças, de acordo com o meio. Nesta tabela, o cálculo da percentagem dos calos baseou-se em um total de 180 explantes distribuídos em 20 Placas de Petri.

Verifica-se, de acordo com a Tabela 1, que o tratamento ICP2 (Fig. 1) apresentou maior desenvolvimento de calos friáveis e de coloração esverdeada, destacando-se dos demais tratamentos, pois são esses calos os mais propícios ao surgimento de embriões somáticos.

Após as três semanas no meio de proliferação, fez-se nova avaliação dos calos, observada na Tabela 2.

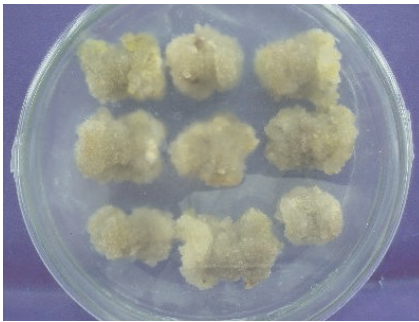
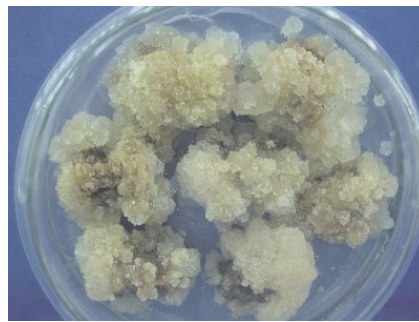
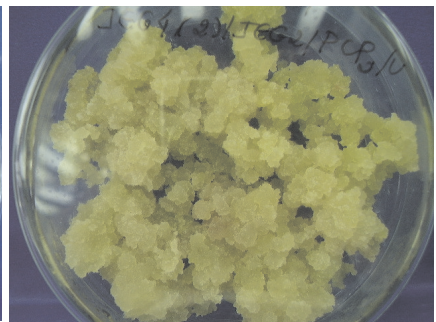
Pode-se averiguar, na Tabela 2, que o meio PCP3 (Fig. 2) apresentou a maior percentagem de calos de coloração esverdeada e textura friável, constatando-se também, o aparecimento de contaminações fúngicas e/ou bacterianas nos tratamentos ICP4 e ICP5 e um acentuado aumento da contaminação no meio ICP6.

Após a proliferação, os calos foram separados do explante inicial e transferidos para os meios MIEG1, MIEG2, MIEG3 e MIEG4, que são os meios de indução da embriogênese somática ou meios de rediferenciação (Fig. 3). Eles permaneceram nesses meios durante quatro subcultivos, realizados a cada quatro semanas.

Realizaram-se, durante esses subcultivos, avaliações

**Tabela 1.** Percentagem de calos na cultivar BRS Verde nos diferentes tratamentos da indução

Tipos de calo	Tratamentos (%)				
	ICP2	ICP3	ICP4	ICP5	ICP6
Verde e friável	86,1	63,9	46,7	4,4	
Verde, friável e com antocianina				26,2	
Verde e duro				69,4	
Marrom e friável	10,6	7,8	44,4		34,4
Marrom e duro		7,8	8,9		60,6
Branco e friável	3,3	20,5			
Contaminados					5,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

**Fig. 1.** Indução de calo**Fig. 2.** Proliferação de calo no meio ICP2**Fig. 3.** Calos em meio de PCP3 rediferenciação**Tabela 2.** Percentagem de calos na cultivar BRS Verde nos diferentes tratamentos da proliferação

Tipos de calo	Tratamentos (%)				
	ICP2	ICP3	ICP4	ICP5	ICP6
Verde e friável	76,3	79,3		10,4	
Verde e duro				56,3	
Marrom e friável			60,0		13,3
Marrom e duro	23,7	20,7	20,0		40,0
Contaminados			20,0	33,3	46,7
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

para verificar o surgimento de embriões, porém até o quarto subcultivo realizado os mesmos não foram originados.

Diferentemente deste estudo, Carvalho et al. (1998) obtiveram embriões quando os calos embriogênicos foram transferidos aos meios com e sem glutamina,

embora as cultivares usadas tenham sido CNPA Precoce 2 e Coker 312.

Vão et al. (1991) também observaram a embriogênese somática na cultivar Coker 312 nos calos induzidos em meio MS mais vitaminas do meio B5 e ácido 3-indolacético e kinetina.

Firoozabady e DeBoer (1993) constataram que os calos da cultivar Coker produziram embriões ao serem transferidos para um meio sem fitorreguladores; Davidonis e Hamilton (1983) conseguiram o aumento de proembriões em *Gossypium hirsutum* depois que os calos foram transferidos para meios sem reguladores de crescimento.

A produção do algodoeiro por meio da biotecnologia está limitada pela especificidade da cultivar, tendo a mesma que ser embriogênica para que se possa regenerar uma planta (CARVALHO, 1999). A indução da embriogênese somática é muito difícil, senão impossível no caso de muitas espécies vegetais. A Coker é a cultivar de algodão que se tem mostrado mais embriogênica.

Pôde-se observar, pelo estudo realizado, que todos os meios foram eficientes na formação dos calos.

Na indução, o meio em que se utilizou os reguladores de crescimento 2,4D e KIN, apresentou o maior índice de calos friáveis e verdes, enquanto

na proliferação, o meio com 2,4D e 2iP sobressaiuse, na formação de calos friáveis e verdes.

Os calos formados, quando passados para os meios de rediferenciação, não foram eficientes na origem dos embriões.

## Referências Bibliográficas

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. de C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 101).

CARVALHO, J. M. F. C. **Aplicación de las técnicas de cultivo in vitro em la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L.).** 1996. 174 p. Tese (Doutorado) - Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.

CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de Micropropagação.** Embrapa Algodão: Campina

Grande, 1999. 39 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 64).

CARVALHO, J. M. F. C.; BENITO, E. G.; PEREZ, C.; SANTOS, J. W. Respostas de duas cultivares de algodão à embriogênese somática em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas.** Campina Grande, v. 2, n. 1, p.13-19, 1998.

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

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural.** Disponível em : <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a39v35n4.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2005.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, 2005.

FIROOZABADY, E.; DeBOER, D. L. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many E. e cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant,** Columbia, v. 29, p. 166-173, 1993.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research,** New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

GOMES, K. K. P.; VIEIRA, G. S.; LEDO, A. S.; BLANK, A. F. **Efeito de diferentes concentrações de BAP e tipos de explantes na indução de calo em Nim Indiano.** Disponível em : <[http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/44\\_639.pdf](http://200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/44_639.pdf)>. Acesso em: 12 jul. 2007.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa - CBAB, 1999. v. 2, p. 533 - 568.

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

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

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de

tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. 1. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.415-426.

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

**Comunicado  
Técnico, 343**

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: Nair Helena Castro Arriel  
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes  
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevêdo  
Everaldo Paulo de Medeiros  
Fábio Aquino de Albuquerque  
Francisco das Chagas Vidal Neto  
João Luiz da Silva Filho  
José Wellington dos Santos  
Luiz Paulo de Carvalho  
Nelson Dias Suassuna

**Expedientes:** Supervisor Editorial: Nivia Marta Soares Gomes  
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão  
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho  
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho