

103

Circular
Técnica

Campina Grande, PB
Setembro, 2006

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Eng. Agrôn., Dr. da Embrapa
Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143,
Centenário, CEP 58107-720,
Campina Grande, PB. E-mail:
julita@cnpa.embrapa.br

Marleide Magalhães de Andrade Lima
Eng. Fl. Dr. da Embrapa algodão, E-
mail: marleide@cnpa.embrapa.br

Roseane Cavalcanti dos Santos
Eng. Agrôn., Dra. da Embrapa
Algodão, E-mail:
caval@cnpa.embrapa.br

Júlio Zoé de Brito
Eng. Agrôn. Dr. IPA/CETENE,
CP1022, CEP 50710-000, Recife, PE

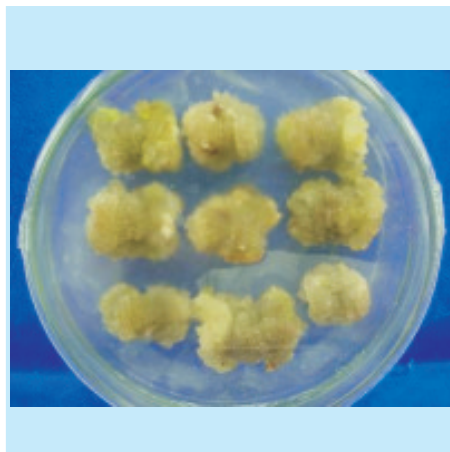
Virgínia Maria Tenório Donato
Eng. Agrôn. Dr. Bolsista IPA/UFAL,
CP1022, CEP 50710-000, Recife, PE

Marina Medeiros de Araújo Silva
Universidade Estadual da Paraíba,
Estagiárias da Embrapa Algodão,
E-mail:
marinamedeirosas@yahoo.com.br

Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba,
Estagiárias da Embrapa Algodão,
E-mail: jaislanny@yahoo.com.br

Embrapa

Procedimentos para indução de calos embriogênicos em algodão



Na investigação dos diferentes níveis de variabilidade visando à obtenção de genótipos melhorados, a seleção de embrióides amplifica e otimiza o trabalho de seleção.

Por se tratar de uma ferramenta importante nos programas de melhoramento genético de algumas culturas, a produção de embrióides

somáticos, mediante o cultivo de tecidos *in vitro*, é uma técnica de interesse, já que permite a obtenção de embrióides em grande escala, com elevada taxa de multiplicação e o rejuvenescimento do material vegetal (SANTANA, 1993).

Segundo Zhang e Zhao (1997), citados por Zhang et al. (2000), técnicas *in vitro* podem prover meios de se obter ou induzir variação somoclonal ou, ainda, introduzir importantes genes, como genes para resistência a pragas e doenças, através da engenharia genética. As técnicas da engenharia genética estão amplamente baseadas no cultivo de tecidos, pois a transformação requer que se possa cultivar, *in vitro*, protoplastos, células e tecidos vegetais, que se vão transformar e cujas células transformadas possam regenerar plantas (GYVES, 1994).

De acordo com Tuli e Kumar (2004), os maiores problemas para o êxito das aplicações da biotecnologia em algodão estão na dependência do genótipo (GANESAN e JAYABALAN, 2005) e na baixa frequência de embriogênese somática, resultando na dificuldade da regeneração de tecidos transformados, razão por que, até o momento, a manipulação do algodão através do cultivo de tecidos por meio da embriogênese somática, se limita a poucos acessos de *Gossypium hirsutum* (DAVIDONIS e HAMILTON, 1983; TROLINDER e GOODIN, 1987; TROLINDER e XHIXIAN, 1989), *Gossypium klotzchianum* (PRICE e SMITH, 1979) e *G. barbadense* (SAWAHEL, 2001).

A eficiência da embriogênese somática em algodão também pode estar associada a genes que codificam suas proteínas envolvidas em respostas inicial e fisiológica, bem como nos subseqüentes estádios de desenvolvimento dos embrióides somáticos (ZENG et al., 2006).

Entre as cultivares de *Gossypium hirsutum* L., as mais utilizadas nos trabalhos de embriogênese somática são as linhagens derivadas da cv. Coker, devido a competência para regeneração, tal como Coker 201 e Coker 312, que se têm tornado cultivares padrão em cultura de tecidos e transformação genética de algodão (RAO et al., 2006). Apesar de já existir um protocolo de regeneração descrito para a Coker, a reprodutibilidade em nível laboratorial tem sido limitada, fazendo-se necessários alguns ajustes para estabelecimento de um protocolo de larga utilização na área de cultivo de tecidos.

Esta Circular Técnica apresenta metodologia de indução de calos embriogênicos em algodão, de modo a otimizar um protocolo efetivo que possa ser utilizado nos programas de melhoramento genético e, conseqüentemente, no processo de obtenção de plantas de algodão transgênicas.

Procedimentos para indução dos calos embriogênicos

Inicialmente, 300 sementes da cultivar Coker 312 foram colocadas em tubos de ensaios (uma semente/tubo), contendo meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), para germinação *in vitro* e servirem de planta-matriz. Para a indução dos calos sete dias após a germinação, tomaram-se segmentos de hipocótilo os quais foram colocados em placas de Petri e aí cultivados por quatro semanas. O meio básico de cultivo utilizado foi o MS - 30 g/L de glucose, 2,5 g/L de gelrite e 0,75 mg/L de $MgCl_2$, suplementado com: 1) 0,1 mg/L de 2,4D (ácido diclorofenoxiacético) + 0,5 mg/L de Cinetina - MS1; 2) 0,1 mg/L de ANA (Ácido naftalenoacético) + 5,0 mg/L Cinetina - MS2, ambos ajustados para o pH = 5,8.

Para proliferação dos calos após as quatro semanas, os explantes com os calos desenvolvidos foram transferidos para os respectivos meios onde foram mantidos durante mais quatro semanas.

Decorrido este período, os calos (na fase de rediferenciação) foram separados do explante inicial e transferidos para o meio contendo sais MS e

vitaminas do meio B5 (GAMBOR et al., 1968), na ausência de fitorreguladores, com o dobro de nitrato de potássio (1,9 g KNO_3).

Utilizaram-se, para cada tratamento, 15 repetições com 12 explantes por placa. Em todos os casos os cultivos foram mantidos a 30 °C com um fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Para constatação da rediferenciação dos tecidos e da formação de embrióides, retiraram-se amostras de calos subcultivados na ausência de fitorreguladores os quais foram analisados por microscopia eletrônica de varredura; para tanto, as amostras foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, contendo glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), durante 12 horas; após este período foram lavados três vezes em tampão cacodilato 0,1 M, durante 10 minutos por lavagem e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (1%), em tampão cacodilato 0,2 M por 1 hora. Procederam-se a mais três lavagens em tampão cacodilato 0,1 M, durante 10 minutos e posterior desidratação progressiva com etanol 10% a 100% de etanol, por 10 minutos cada uma; na última lavagem as amostras permaneceram 1 hora em etanol 100% antes de se realizar a secagem até o ponto crítico. As amostras foram montadas em suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador Fine Coat – íon Sputter/JFC-1100 e observadas no microscópio de varredura (JEOL – JSM/5600LV/Scanning Electron Microscope).

Tem-se, a seguir, o fluxograma de obtenção de embrióides (Figura 1).

Obtiveram-se, através do protocolo MS suplementado com 0,1 mg/L de 2,4D + 0,5 mg/L de Cinetina, calos de coloração amarelo-esverdeado e aspecto friável.

Quando os calos obtidos não foram inoculados em meio MS na ausência de fitorreguladores, observou-se que embrióides foram induzidos, sendo observados a olho nu (Figura 2).

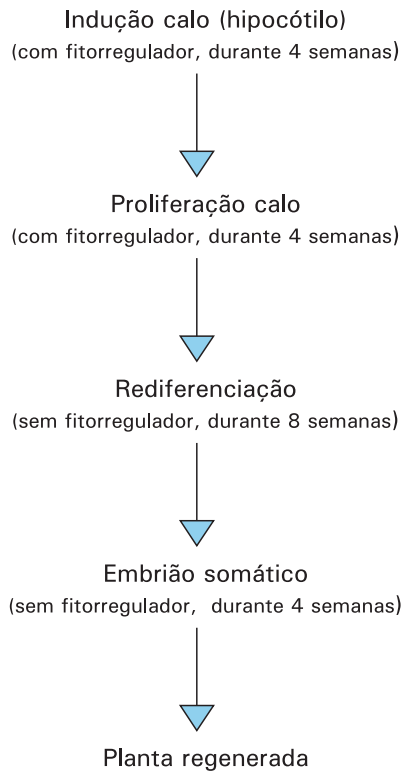


Fig. 1. Fluxograma das etapas da regeneração de plantas de algodão a partir de explante de hipocótilo, via embriogênese somática

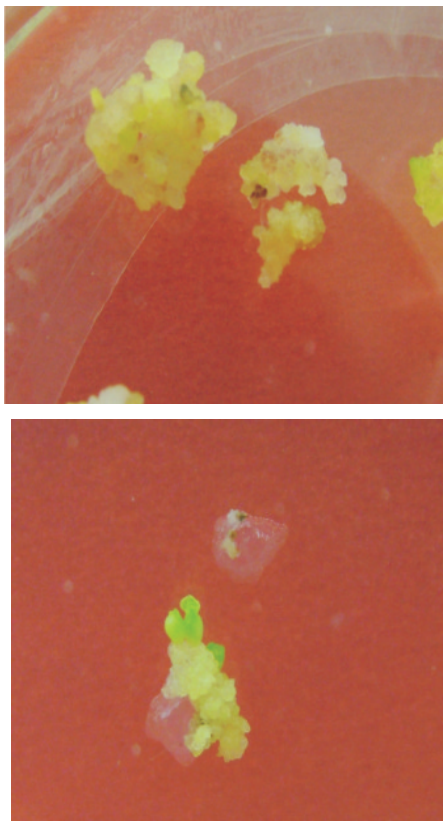


Fig. 2. Indução de calos embriônicos (A) e de embriões (B) da cultivar Coker 312 em meio MS na ausência de fitorreguladores, a partir do meio suplementado com 2,4 D e Cinetina.

No protocolo MS suplementado com 0,1 mg/L de ANA + 5,0 mg/L Cinetina, não se constatou a formação de embriões e os calos escureceram nos subcultivos sucessivos.

A partir da análise dos tecidos processados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 3), nas amostras dos calos provenientes do protocolo MS suplementado com 0,1 mg/L de 2,4D + 0,5 mg/L de Cinetina e subcultivados em meio MS (na ausência de fitorreguladores), foi possível se constatar a rediferenciação dos tecidos, confirmando a embriogênese somática.

Coker 312 em meio MS na ausência de fitorreguladores, a partir do meio suplementado com 2,4 D e Cinetina

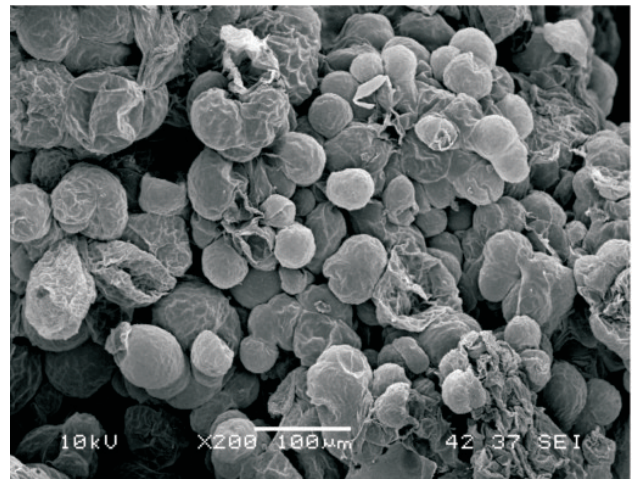


Fig. 3. Rediferenciação dos tecidos e formação de embriões, na ausência de fitorreguladores, analisados por microscopia eletrônica de varredura.

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.
- GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration cotton, *Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2 through suspension cultures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.43, p.921-925, 2005

GYVES, E.M. **Agrobiotecnologia**. México: Iberoamérica, 1994.78p.

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.

RAO, A.Q.; HUSSAIN, S.S.; SHAHZAD, M.S.; BOKHAIR, S.Y.A.; RAZA, M.H.; RAKHA, A.; MAJEED, A.; SHAHID, A.A.; SALEEM, Z.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium spp.*) **Journal Zhejiang University**, v.7, n.a4, p. 291-298, 2006.

SANTANA, N. **Embriogênese somática en el cultivo del cafeto (Coffeasp.)**. 1993. 230f. Tese (Graduação) – INCA.

SAWAHEL, W.A. Stable genetic transformation of cotton plant using polybrene-spermidine treatment. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.377-377, 2001.

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.

TULI, R.; KUMAR, M. Plant regeneration in cotton: a short-term inositol starvation promotes developmental synchrony in somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**. v.40, n.3, p.294-298, 2004

ZENG, F.; ZHANG, X.; ZHU, L. TU, L.; GUO, X.; NIE, Y. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p.167-183, 2006.

ZHANG, B.H.; LIU, F.; YAO, C.B. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.89-91, 2000

**Circular
Técnica, 103**

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: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Secretária Executiva: Nívia M.S. Gomes
Membros: Cristina Schetino Bastos
Fábio Akiyoshi Suinaga
Francisco das Chagas Vidal Neto
José Américo Bordini do Amaral
José Wellington dos Santos
Luiz Paulo de Carvalho
Nair Helena Castro Arriel
Nelson Dias Suassuna

Expedientes: Supervisor Editorial: Nívia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho