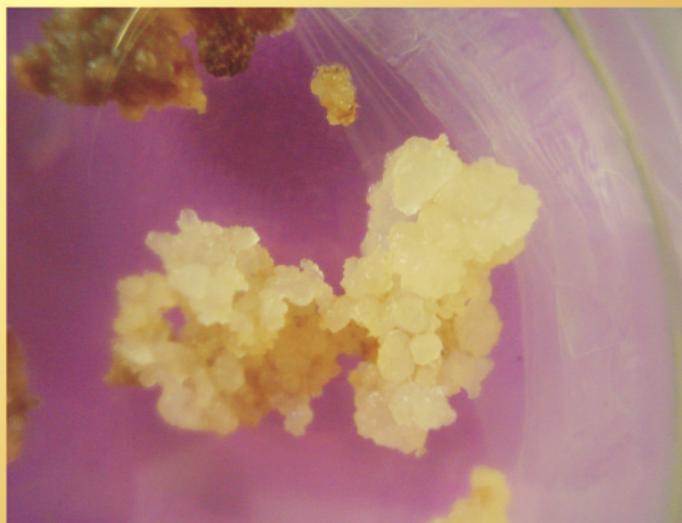


Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa 79
e Desenvolvimento

ISSN 0103-0841
Junho, 2007

**Indução de Embriogênese Somática
em Algodão**



Embrapa

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Reinhold Stephanes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

José Renato Cortez Bezerra
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0841
Junho, 2007

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79

Indução de Embriogênese Somática em Algodão

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Marleide Magalhães de Andrade Lima
Roseane Cavalcanti Santos
Júlio Zoé de Brito
Virgínia Donato
Marina Medeiros de Araújo Silva
Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros

Campina Grande, PB.
2007

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares 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

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Edição Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Indução de Embriogênese Somática em Algodão, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e outros. Campina Grande, 2007.

14p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 79).

1. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Lima, M.M. de A. III. Santos, R.C. IV. Brito, J.Z. de V. Donato, V. VI. Silva, M.M. de A. VII. Medeiros, M.J.L. e VIII. Título. IX. Série

CDD 620.8

© Embrapa 2007

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão	10
Conclusões	12
Referências Bibliográficas	13

Indução de Embriogênese Somática em Algodão

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹
Marleide Magalhães de Andrade Lima²
Roseane Cavalcanti Santos¹
Júlio Zoé de Brito³
Virgínia Donato⁴
Marina Medeiros de Araújo Silva⁵
Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros⁵

Resumo

A produção de embriões somáticos mediante o cultivo de tecidos *in vitro*, é uma técnica que permite a obtenção de embriões em grande escala, constituindo-se em uma ferramenta importante nos programas de melhoramento genético de algumas culturas. Objetivando-se induzir a formação de calos embriogênicos em algodão a partir da embriogênese somática, germinaram-se, *in vitro*, sementes da cultivar Coker 312 e, sete dias após a germinação, segmentos de hipocótilo foram cultivados durante quatro semanas em placas de *Petri*, para a indução de calos, em diferentes meios. Para constatação da rediferenciação dos tecidos e da formação de embrióides, retiraram-se amostras de calos subcultivados na ausência de fitorreguladores e analisados por microscopia eletrônica de varredura. Obtiveram-se calos de coloração amarelo-esverdeado e com aspecto friável no tratamento com 2,4 D a partir de segmentos de hipocótilo da cultivar Coker 312, com maior proliferação a partir da quarta semana de cultivo. Calos da mesma cultivar induzidos em meio MS1 (2,4D e cinetina), quando subcultivados em meio básico MS, sem de adição de fitorreguladores, desenvolveram calos embriogênicos; os calos induzidos em meio MS2 (ANA e cinetina) não se diferenciaram quando transferidos para o meio MS, mas se observou coloração escura.

Termos para indexação: calos embriogênicos, fitorreguladores, protocolo

¹Eng. Agr., Dra. da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br; caval@cnpa.embrapa.br

²Eng. Fl., Dra. da Embrapa Algodão, E-mail: marleide@cnpa.embrapa.br

³Eng. Agr., Dr. do IPA/Cetene, CP 1022, CEP 50761-000, Recife, PE. E-mail: zoe@ipa.br

⁴Eng. Agr., Dra. Bolsista IPA/Cetene, E-mail: vmtdonato@uol.com.br

⁵Universidade Estadual da Paraíba; Estagiárias da Embrapa Algodão. E-mail: jaislanny@yahoo.com.br; marinamedeirosas@yahoo.com.br

Somatic induction of embryogenesis in cotton.

Abstract

Production of somatic embryos by tissues culture *in vitro* is one technique that allows the large-scale attainment of embryos, consisting in an important tool for programs of genetic improvement of some cultures. Objectiving to induce the formation of embryonic callus in cotton from somatic embryogenesis, seeds of Coker 312 cultivar had been germinated *in vitro* and, seven days after the germination, segments of hypocotyls had been cultivated during four weeks in *Petri* dishes, for the induction of callus, in different medium. To evidence the redifferentiation of tissues and the formation of embryoid, samples of callus subcultivated in the absence of growth regulator and analyzed by electronic microscopy of sweepings had been removed. Callus of yellow-green coloration and with friable aspect had been gotten in the treatment with 2,4 D from segments of hypocotyls of Coker 312 cultivar, with bigger proliferation from the fourth week of culture. Induced calluses of the same cultivar in MS1 medium (2,4D and kinetine), when subcultivated in basic MS medium, without addition of growth regulator, had developed embryogenic callus; the induced callus in MS2 medium (ANA and kinetine) had not been differentiated when transferred to the MS medium; dark coloration was observed.

Index terms: Embryogenic calli, growth regulators, protocol

Introdução

A embriogênese somática é uma ferramenta importante nos programas de melhoramento genético de algumas culturas, especialmente nos trabalhos que visam à regeneração de plantas nos processos de transformação (SANTANA, 1993).

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das culturas mais significativas e, quando geneticamente modificado – algodão transgênico, sua importância se torna mais relevante; contudo, para a obtenção de plantas transformadas o processo requer o cultivo *in vitro* de protoplasma, células e tecidos da planta que se deseja transformar e as células e tecidos transformados resultem na regeneração de uma planta transgênica (GYVES, 1994), de grande importância no melhoramento de plantas (BRASILEIRO, 1998).

Mediante o cultivo de tecidos *in vitro*, a produção de embriões somáticos é uma técnica que permite a obtenção de embriões em grande escala, com elevada taxa de multiplicação e o rejuvenescimento do material vegetal (Santana, 1993), tornando-se uma ferramenta por excelência nos programas de melhoramento genético de algumas culturas. Na investigação dos diferentes níveis de variabilidade visando à obtenção de genótipos melhorados, a escolha de embrióides amplifica e otimiza o trabalho de seleção.

Os protocolos para a obtenção de embrióides somáticos estão disponíveis na literatura para um grande número de espécies vegetais; para a cultura do algodão, entretanto, a obtenção da embriogênese somática tem sido limitada a poucos acessos de *Gossypium hirsutum* (DAVIDONIS e HAMILTON, 1983; TROLINDER e GOODIN, 1987; TROLINDER e XHIXIAN, 1989), *G. klotzchianum* (PRICE e SMITH, 1979) e *G. barbadense* (SAWAHEL, 2001).

Entre as cultivares de *Gossypium hirsutum* L., as mais utilizadas nos trabalhos de embriogênese somática são as linhagens derivadas da cv. Coker, devido à competência para regeneração, tal como Coker 201 e Coker 312, que têm tornado variedades modelo 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 oportunos alguns ajustes para estabelecimento de um protocolo de larga utilização na área de cultivo de tecido.

No presente trabalho se testaram diferentes meios de cultivo, a fim de induzir a formação de calos embriogênicos em algodão de modo a otimizar um protocolo efetivo para a cultura, a partir da embriogênese somática.

Material e Métodos

Sementes da cultivar Coker 312 foram germinadas *in vitro* e, sete dias após a germinação, segmentos de hipocótilo foram cultivados por quatro semanas, em placas, para a indução de calos. O cultivo foi realizado em placas de *Petri*, contendo meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 30 g/L de glicose, 2,5 g/L de gelrite e 0,75 mg/L de $MgCl_2$, sendo 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.

Após as quatro semanas os calos foram transferidos para os respectivos meios, onde foram mantidos por mais quatro semanas; decorrido este período, os calos foram separados do explante inicial, 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 (1,9g KNO_3); para cada tratamento foram utilizadas 15 repetições com 12 explantes por placa, com e sem papel de filtro (MN-640M). Em todos os casos, os cultivos foram mantidos a 30°C com um fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $50 \mu mol/m^2/s^{-1}$.

Para constatar a rediferenciação dos tecidos e a formação de embriões, retiraram-se amostras de calos subcultivados na ausência de fitorreguladores e analisados por microscopia eletrônica de varredura; para isto, as amostras foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0,2M, contendo glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), durante 12 horas; após este período, foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1M, durante 10 minutos por lavagem e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio (1%), em tampão cacodilato 0,2M por 1 hora. Procederam-se a mais três lavagens em tampão cacodilato 0,1M, por 10 minutos e posterior desidratação progressiva com etanol 10% a 100% de etanol durante 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, então, montadas em suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador Fine Coat – íon Sputter/JFC-1100 e observadas ao microscópio de varredura (JEOL – JSM/5600LV/Scanning Electron Microscope).

Resultados e Discussão

Obtiveram-se calos de coloração amarelo-esverdeado e com aspecto friável no tratamento com 2,4 D, partir de segmentos de hipocótilo da cultivar Coker 312, com maior proliferação a partir da quarta semana de cultivo (Figura 1).

A indução dos calos somáticos foi ainda testada por subcultivos diretamente sobre o meio e em papel de filtro, observando-se que a proliferação maior ocorreu no tratamento em que os calos foram subcultivados diretamente ao meio (Figura 2). A obtenção de embriões da cultivar Coker 312 foi conseguida em meio MS na ausência de fitorreguladores, sendo observados a olho nu (Figura 3).

No protocolo com ANA não ocorreu formação de embriões e os calos escureceram nos subcultivos sucessivos.

De acordo com Tuli e Kumar (2004), os maiores problemas para o êxito das aplicações da biotecnologia em algodão estão na dependência do genótipo e na baixa frequência de embriogênese somática, resultando na dificuldade da regeneração de tecidos transformados; porém, Leelavathi et al. (2004) conseguiram a regeneração de um elevado número de plantas de algodão transgênico, cerca de 83%, a partir de calos embriogênicos, após a transformação por *Agrobacterium*.

É possível que a divergência dos resultados, quanto à eficiência da embriogênese somática em algodão, deva estar associada a genes que codificam proteínas envolvidas em respostas inicial e fisiológica da mesma, e nos subseqüentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos (ZENG et al., 2006).

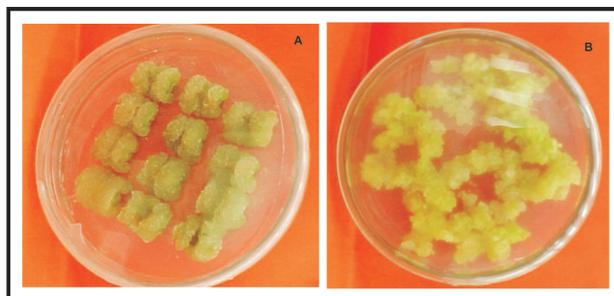


Fig. 1. Proliferação de calos da cultivar Coker 312 em meio MS (A) cultivos com 4 semanas; (B) Cultivos com 8 semanas

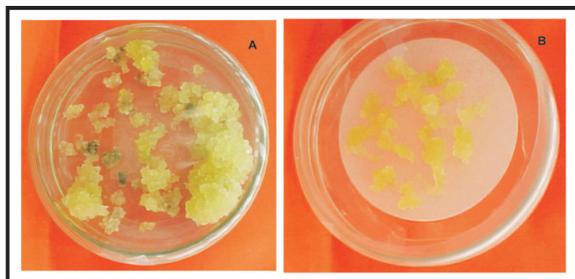


Fig. 2. Indução de embriogênese somática. (A) Calos subcultivados diretamente sobre o meio. (B) Calos subcultivados sobre papel de filtro

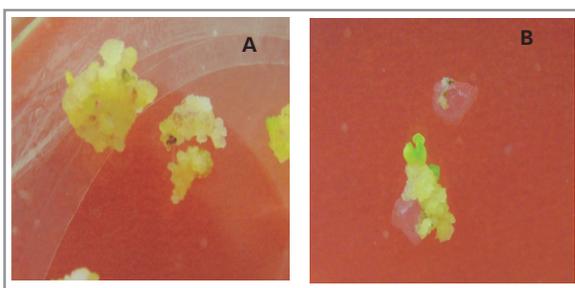


Fig. 3. Indução de calos embriogênicos (A) e de embriões (B) da cultivar Coker 312 em meio MS na ausência de fitorreguladores, a partir do meio suplementado com 2,4 D e Kinetina

A partir da análise dos tecidos processados para microscopia eletrônica de varredura (Figura 4), nas amostras dos calos provenientes do meio MS1 subcultivados em meio MS, na ausência de fitorreguladores, foi possível constatar a rediferenciação dos tecidos, confirmando a embriogênese somática.

No protocolo em que o meio MS foi suplementado com a combinação dos fitorreguladores 0,1 mg/L de ANA e 5,0 mg/L Kinetina não se deu a formação de embriões e os calos foram escurecendo nos subcultivos sucessivos.



Fig. 4. Micrografia de varredura dos calos embriogênicos.

Conclusões

Calos da cultivar Coker 312 induzidos em meio MS1 (2,4D e cinetina), quando subcultivados em meio básico MS, sem de adição de fitorreguladores, desenvolveram calos embriogênicos; os calos induzidos em meio MS2 (ANA e cinetina) não se diferenciaram quando transferidos para o meio MS, observando-se coloração escura.

Referências Bibliográficas

- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.R. de C. (eds). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília:Embrapa SPI/Embrapa Cenargem, 309p.1998.
- DAVIDONIS, G.H.; HAMILTON, R.H. Plant regeneration from callus tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) **Plant Science Letters**, v.32, p.89-93, 1983.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Expression Cell Research**, n.50, p.151-158. 1968
- JOHN, M.E.; STEWART, J. Mc. Genes for jeans: biotechnological advance in cotton. **Tibtech**, v.10, p. 165-170, 1992.
- 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.
- 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.
- 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, 2006P Jo
- SANTANA, N. **Embriogênese somática en el cultivo del cafeto (Coffeasp.)**. Local: INCA, 1993. 230p. Tesis de Grado.

SAEAHEL, W.A. Stable genetic transformation of cotton plant using polybrene-spermidine treatment. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.377-377, 201.

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. Insolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Plant Molecular Biology*, v. 60, p.167-183, 2006.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

