



Metodologia para Obtenção de Plantas de Algodão pelo Resgate de Embrião Imaturo

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Robison Silva Cavalcanti³

José Wellington dos Santos²

O cultivo de embrião consiste no isolamento e crescimento, *in vitro*, em condições asépticas, de embriões imaturos, com o fim de obter plantas viáveis, Pierik (1990).

O cultivo de embriões zigóticos tem sido utilizado para vários fins: superar dormência de sementes devido à imaturidade do embrião ou presença de substâncias inibidoras no endosperma, estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião e testar viabilidade de sementes; sendo o mais utilizado na recuperação de híbridos raros de cruzamento incompatíveis.

Hanning (1904) foi considerado o pioneiro da técnica de cultivo de embriões imaturos *in vitro*, em meios salinos, suplementados com açúcares.

Os estudos de Laibach (1929) deram um grande impulso ao cultivo de embriões zigóticos, já que demonstraram a importância da aplicação prática nos programas de melhoramento de plantas, mais especificamente nos cruzamentos interespecíficos.

Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos oferecem, aos melhoristas de plantas um método

para aumentar a variabilidade genética e para transferir genes desejáveis entre espécies, principalmente das selvagens para as cultivadas. Em tais cruzamentos, podem ocorrer barreiras tanto de pré como de pós-fertilização, resultando em sementes murchas e embriões abortivos. Por exemplo, o pólen pode falhar em penetrar um pistilo estranho ou dois genomas muito distantemente relacionados podem ser incapazes de produzir um embrião viável quando combinados entre si. No entanto, o uso de hibridação entre espécies estreitamente relacionadas está frequentemente limitado por falhas do desenvolvimento do endosperma pós-fertilização, ou seja, a fertilização ocorre e os embriões começam a se desenvolver, porém degeneram antes de atingir a maturidade, devido à inabilidade do endosperma em suprir nutricionalmente os embriões. Estes embriões híbridos podem ser salvos se forem removidos e cultivados artificialmente sobre um meio nutritivo antes que ocorra o aborto.

A possibilidade de se cultivar embriões imaturos também oferece excelente oportunidade para se

¹ Eng. agrôn., D.Sc., da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

² Eng. agrôn., M.Sc., da Embrapa Algodão. E-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

³ Aluno de graduação da UFPB, CP 10.087, CEP 58109-970, Campina Grande, PB

estudar a nutrição do embrião em diferentes estádios de desenvolvimento (Montoya, 1991); entretanto, as possibilidades de êxito neste tipo de cultivo, dependem muito do estágio de desenvolvimento do embrião no momento de ser resgatado. Também os embriões isolados *in vitro* geralmente mostram uma germinação precoce, já que ocorre uma perda dos inibidores ao retirar a cobertura seminal; outra razão poderia ser que o potencial osmótico negativo existente nos embriões *ex vitro*, tenha este valor muito mais alto *in vitro* (PIERIK, 1990).

De acordo com o exposto, achou-se conveniente identificar qual seria a idade das maçãs para o resgate das sementes-traço, a temperatura de incubação e a concentração de sacarose utilizada no meio de cultivo, para se obter maior número de embriões desenvolvidos.

O ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação e no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, durante os meses de março a julho de 2000, utilizando-se a seguinte metodologia.

Preparação das maçãs

Sementes F1 resultantes do cruzamento de duas espécies tetraplóides ($2n = 4x = 52$) *G.ossypium barbadense* (CNPA 9801) e *G.hirsutum* (CNPA 7H) foram cultivadas em casa-de-vegetação, a fim de se realizar a autofecundação. Para evitar a queda dos botões florais, foi aplicada, em sua base, até o 05º ou 08º dias após a polinização, uma solução de água destilada suplementada com 100 mg/L mais 50 mg/L dos hormônios ácido naftalenoacético (NAA) e ácido giberélico (GA_3), respectivamente.

Assepsia das maçãs

As maçãs recém-coletadas com 3, 5, 7 e 9 dias após a polinização, foram transportadas para o Laboratório de Biotecnologia, onde foram lavadas com sabão e água corrente e, em seguida, imersas em etanol a 70% por 1 minuto e posteriormente em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por 5 minutos, seguidos de três enxágües.

Extração das sementes-traço

Concluída a descontaminação da câmara de fluxo laminar, as sementes- traço estéreis foram excisadas e colocadas em placas de Petri estéril sendo posteriormente cultivadas em frascos contendo meio básico de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) na concentração de 50% com 0,5% de ágar suplementado com 10, 8, 6 e 4% de sacarose e 0,3% de carvão ativado.

Incubação cultivo sementes-traço

Após o plantio das sementes- traço estas foram incubadas a 25 ou 28 °C no escuro. Decorrido um período de 35 a 40 dias os embriões foram resgatados das sementes-traço e cultivados em meio fresco a fim de regenerarem plântulas.

Foram utilizados dez frascos por tratamento; cada um com cinco sementes- traços por frasco. Trinta e cinco dias após o plantio das sementes- traço avaliou-se o número de sementes- traço germinadas. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado no arranjo fatorial 4x4x2 (quatro idade de maçãs, quatro meios, duas temperaturas) com 10 repetições por cada tratamento. A avaliação foi realizada aos 35 dias após o plantio. Os dados foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do "SAS", versão 6 (1985) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Observa-se na Tabela 1 o efeito significativo para meios de cultivo, idade das sementes-traço e temperatura de incubação; entretanto, não houve efeito significativo entre as interações: concentração de sacarose com temperatura de incubação e concentração de sacarose com idade da maçã. Estes resultados não estão de acordo com aqueles apresentados por Rietsema et al. (1953) e por Hu e Ferreira, (1990) os quais evidenciaram que diferentes estudos de desenvolvimento do embrião da planta ornamental (*Datura stramonium*) quando cultivados *in vitro*, requerem diferentes concentrações de sacarose e que de uma maneira geral, quanto mais jovem for o embrião excisado, mais alta será a osmolaridade requerida do meio, respectivamente.

Tabela 1. Resumo da análise de variância referente à variável número de sementes-traço germinadas.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios ¹
Meio de cultivo	3	0,088 **
Idade maçã	3	0,041 *
Temperatura incubação	1	0,077 *
Concentração sacarose x Idade maçã	9	0,025ns
Concentração sacarose x Temperatura incubação	3	0,005ns
Idade maçã x Temperatura incubação	3	0,019ns
Concentração sacarose x Idade maçã x Temperatura incubação	9	0,0024ns
Erro	2,892	0,015
CV(%)		11,75

¹ Dados transformados em $\sqrt{x+1}$; * Significativo (P<0,05); * Significativo (P<0,01); ns não significativo (P<0,05).

Na Tabela 2 encontra-se o resultado da análise estatística de germinação das sementes-traço resultante da hibridação entre *G.ossypium* barbadense (CNPA 9801) e *G.hirsutum* (CNPA 7H) para os efeitos de meios de cultivo, idade das maçãs e temperatura de incubação. Observa-se efeito significativo para meios de cultivo e temperatura de incubação, não havendo, no entanto, diferença para a idade das maçãs. Verificou-se que os meios MS suplementado com 10, 8 e 6% de sacarose não

Tabela 2. Valores médios do número de sementes-traço germinadas resultantes da hibridação entre *G.ossypium* barbadense (CNPA 9801) e *G.hirsutum* (CNPA 7H) para os fatores concentração de sacarose, idade maçã e temperatura de incubação.

Fatores	Nº Sementes-traço Germinadas ¹
Meios de Cultivo	
½ MS c/ 10% sacarose	1,03 b
½ MS c/ 8% sacarose	1,02 b
½ MS c/ 6% sacarose	1,02 b
½ MS c/ 4% sacarose	1,10 a
Idade da Maçã	
3 dias	1,01 a
5 dias	1,07 a
7 dias	1,03 a
9 dias	1,06 a
Temperatura de Incubação	
25 °C	1,03 b
28 °C	1,06 a

¹ Dados transformados em $\sqrt{x+1}$; * Significativo (P<0,05); * Significativo (P<0,01); ns não significativo (P<0,05).

diferiram entre si com relação ao número de sementes-traço germinadas, entretanto no meio acrescido com 4% de sacarose apresentou maior número de sementes-traço germinadas. Em geral, pode-se dizer que, concentração mais baixa de sacarose favorece a germinação das sementes-traço.

Com relação à temperatura de incubação, a que apresentou maior número de sementes-traço germinadas, foi a 28 °C.

Conclusões

- Concentrações mais baixas de sacarose favorecem a germinação de sementes-traço;
- a idade da maçã não influenciou no número de sementes-traço germinadas;
- as sementes-traço germinam melhor à temperatura de incubação de 28 °C;
- concentrações de sacarose inferiores a 4% devem ser estudadas.

Referências Bibliográficas

- HANNIG, E. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Ueber die cultur von Cruciferen-Embryonen ausserhalb des embryosacks. **Botanical Ztg.** v. 62: p. 45-80, 1904.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embrião. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA- CNPH, 1990. p. 71-85.
- LAIBACH, F. Ectogenesis in plants. Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. **Journal Hered.**, v. 20, p. 201-208, 1929.
- MONTOYA, L. M. **Cultivo de tejidos vegetales.** Ealon: Medellin, 1991. 77 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15. p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.S. **Cultivo in vitro de las Plantas superiores.** Madrid Mundi- Prensa, Madrid, 1990. 326 p.
- RIETSEMA, J.; SANTINAS, S.; BLAKEESLEE, A. F. The effect of sucrose on the growth of *Datura*

stramonium embryos *in vitro*. **American Journal Botany**, v. 40, p. 538-545, 1953.

SAS INSTITUTE INC. **SAS userguide: Basics** 5 ed. Cary, 1985. 1290 p.

**Comunicado
Técnico, 126**

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: Alderí Emídio de Araújo
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes
Membros: Eleusio Curvelo Freire
Francisco de Sousa Ramalho
José da Cunha Medeiros
José Mendes de Araújo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena Avelino Araújo
Malaquias da Silva Amorim Neto

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Oriel Santana Barbosa
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa