

## INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS NAS CULTIVARES BRS ARARIPE E BRS SERIDÓ DO ALGODOEIRO<sup>1</sup>

MARINA MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA<sup>2\*</sup>, MARIA JAISLANNY LACERDA E MEDEIROS<sup>2</sup>, SILVANY DE SOUSA ARAÚJO<sup>3</sup>, DELCIO DE CASTRO FELISMINO<sup>4</sup>, JULITA MARIA FROTA CHAGAS CARVALHO<sup>5</sup>

**RESUMO** - A cultura de calos facilita o estudo dos fatores que interferem na embriogênese somática, técnica que permite a obtenção de embriões *in vitro* a partir de tecido somático, possibilitando a propagação de plantas elite e constituindo uma ferramenta importante nos programas de melhoramento genético. Objetivou-se analisar a influência de reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos das cultivares BRS Ararape e BRS Seridó do algodoeiro. No Laboratório de Cultivo de Tecidos da Embrapa Algodão, para os ensaios de indução e proliferação de calos, segmentos hipocotiledonares foram cultivados em meio MS suplementado com os fitoreguladores ANA, KIN e 2,4-D. Na indução de calos embriogênicos, empregou-se meios de rediferenciação, com ausência de fitoreguladores. Os dados foram analisados de acordo com o teste não paramétrico do Qui-Quadrado, verificando-se elevado número de calos potencialmente embriogênicos, com consistência frável e coloração creme-esverdeado. No tratamento com adição de ANA e KIN, foi observada a formação de calos embriogênicos da cultivar BRS Seridó. A dependência do genótipo é um dos maiores problemas para a baixa frequência de embriogênese somática no algodão que, foi conseguida em poucas cultivares; sendo necessário o estudo em outras variedades para a definição de protocolos adequados a este processo.

**Palavras-chave:** *Gossypium hirsutum*. Embriogênese somática. Fitoreguladores. Calogênese

## INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLUS IN THE CULTIVARS BRS ARARIPE AND BRS SERIDÓ OF COTTON PLANT

**ABSTRACT** - The callus culture facilitates the study of factors involved in somatic embryogenesis, technique that allows the production of embryos *in vitro* from somatic tissue, making the propagation possible of elite plants and constituting an important tool in breeding programs. The objective was to analyze the influence of growth regulators on the formation of callus on cotton cultivars BRS Ararape and BRS Seridó. In the Laboratory of Tissue Culture of Embrapa Algodão, for the induction and proliferation of callus, hypocotyledonary segments were cultured on MS medium supplemented with phytohormones NAA, KIN and 2,4-D. For the induction of embryogenic callus, it was used redifferentiation medium, with no phytohormones. Data were analyzed according to the nonparametric chi-square test, being verified high number of potentially embryogenic callus, with a friable consistence and cream-greenish coloration. In the treatment with addition of NAA and KIN was observed the formation of embryogenic callus of BRS Seridó. The dependence of the genotype is a major problem for the low frequency of somatic embryogenesis in cotton that has been achieved in a few cultivars; it is necessary to study in other varieties for the definition of appropriate protocols in this process.

**Keywords:** *Gossypium hirsutum*. Somatic embryogenesis. Phytohormones. Callogenesis.

\*Autor correspondente.

Recebido para publicação em 21/09/2009; aceito em 31/03/2010.

Depto de Ciências Biológicas, Esalq/USP, av. Pádua Dias, 13418-900, Piracicaba - SP; marinamedeiros@usp.br; jaislanny@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Depto de Agronomia, UFRPE, rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife - PE; ny\_araujo@hotmail.com

<sup>4</sup>Depto de Ciências Biológicas, UEPB, rua Baraúnas, 351, Bairro Universitário, 58429-500, Campina Grande - PB; delciofelismino@gmail.com

<sup>5</sup>Embrapa Algodão, Caixa Postal 174, 58428-095, Campina Grande - PB; julita@cnpa.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem-se voltado de modo particular às plantas cultivadas, dentre elas o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), que é uma das fibras vegetais mais utilizadas no mundo e cuja produção estende-se a todas as regiões do globo onde a temperatura é apropriada para seu desenvolvimento, o qual é pouco exigente em solo e clima (RICHETTI; MELO FILHO, 2001), entretanto, de acordo com Carvalho (1996), apesar de sua relevância, o algodão é uma cultura que apresentou, e ainda apresenta muitos problemas que desafiam os pesquisadores, como um elevado número de pragas e as exigências da indústria têxtil.

Na tentativa de solucionar estes problemas, o algodoeiro vem sendo alvo de estudos em uma das áreas da biotecnologia que se tornou bastante analisada e aplicada, o cultivo de tecidos vegetais, que teve início nos anos 30, porém só tomou impulso realmente nos anos 70, com interesses na área de melhoramento genético e nas técnicas de propagação *in vitro* (CARVALHO et al., 2006a).

Segundo Arnold et al. (2002), a embriogênese somática é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, sendo imprescindível para os programas de melhoramento genético, através da propagação massal clonal de genótipos superiores em curto período de tempo e com espaço mínimo.

A indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas do cultivo *in vitro* são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais, e também de fatores inerentes ao material vegetal, como fatores hereditários e estado fisiológico do explante (JIMÉNEZ, 2005).

No algodão, a embriogênese somática vem sendo desenvolvida com certa dificuldade, uma vez que sua obtenção foi conseguida em poucas cultivares, não havendo, portanto, um protocolo definido que possa ser aplicado para diversos genótipos (CARVALHO et al., 2006b).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo analisar a influência de reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos em explantes hipocotiledonares das cultivares BRS Araripe e BRS Seridó do algodoeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo de Tecidos, da Embrapa Algodão, em Campina Grande/ PB.

As sementes empregadas como material de partida foram procedentes das cultivares de algodão BRS Araripe e BRS Seridó; as quais foram desinfes-

tadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), a 2% de cloro ativo, adicionando-se uma gota do detergente neutro Tween-20 para cada 100 ml de solução e, em condições assépticas, lavadas três vezes em água bidestilada estéril. Em seguida, as sementes foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de sais básicos e vitaminas de Murashige e Skoog (1962), com adição de 30 g.L<sup>-1</sup> de açúcar comercial e 5,5 g.L<sup>-1</sup> de agar.

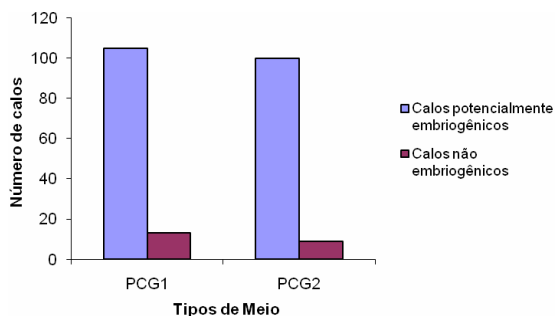
Como fonte de explantes, foram utilizados segmentos hipocotiledonares, excisados com aproximadamente 1 cm de comprimento, provenientes das plântulas cultivadas *in vitro*. Na câmara de fluxo laminar e com auxílio de instrumentos cirúrgicos esterilizados, estes segmentos foram inoculados em placas de Petri, contendo meios de cultura.

Para a indução de calos foram utilizados dois tratamentos (ICG1 e ICG2), compostos por meio MS acrescido de 160 g.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 1,8 g.L<sup>-1</sup> do solidificante Phytigel (Sigma<sup>®</sup>) e diferentes concentrações de reguladores de crescimento. No tratamento ICG1 foram utilizados 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA) e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN) e, no ICG2 foram adicionados 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ácido diclorofenóxiacético (2,4-D). Para a proliferação dos calos (PCG1 e PCG2), utilizou-se o mesmo meio da indução, subtraindo-se a tiamina, e com concentrações diferentes dos fitoreguladores. No tratamento PCP1 foram utilizados 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de KIN e, no PCP2, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Após a preparação, todos meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120 °C por 15 minutos.

Os calos provenientes da proliferação foram separados do explante inicial e transferidos aos meios de indução de calos embriogênicos, onde foram utilizadas algumas combinações de substâncias na ausência de reguladores de crescimento, tendo como base sais do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B<sub>5</sub> (GAMBORG et al., 1968), 1,9 g.L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> e 160 g.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, distribuídos em quatro tratamentos diferentes: IEG1 (1 g.L<sup>-1</sup> de glutamina + 0,5 g.L<sup>-1</sup> de asparagina + 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose); IEG2 (1 g.L<sup>-1</sup> de glutamina + 0,5 g.L<sup>-1</sup> de asparagina + 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose); IEG3 (2 g.L<sup>-1</sup> de glutamina + 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose); IEG4 (2 g.L<sup>-1</sup> de glutamina + 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose). De acordo com Carvalho (1996), os calos embriogênicos são induzidos em meios suplementados com auxina, desenvolvendo embrióides quando os calos são transferidos a um meio sem adição de fitoreguladores.

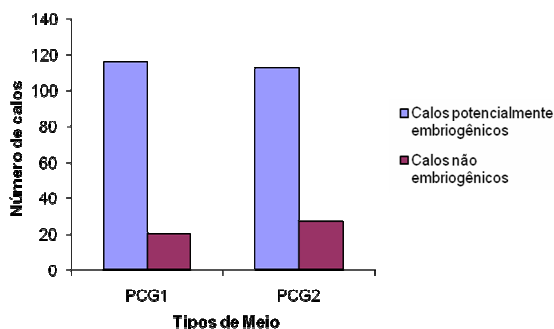
Todos os cultivos foram mantidos em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 50 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância.

A avaliação foi realizada mediante observação do número de explantes cultivados que emitiram calos, análise da consistência e coloração dos calos, que implicaram separá-los em dois grupos: 1 – po-



**Figura 1.** Número de calos potencialmente embriogênicos (Grupo 1) e não embriogênicos (Grupo 2) da cultivar BRS Araripe.

Pelo teste não paramétrico do Qui-Quadrado, a 5% de probabilidade, não houve efeito significativo para as cultivares (Tabelas 1 e 2), indicando que os meios utilizados apresentam potencial para induzir calos embriogênicos.



**Figura 2.** Número de calos potencialmente embriogênicos (Grupo 1) e não embriogênicos (Grupo 2) da cultivar BRS Seridó.

Após essa fase, os calos foram separados do explante inicial e transferidos para os meios de indução da embriogênese somática, os quais não continham fitoreguladores, entretanto, apresentavam substâncias diversas em sua composição, tais como: glu-

**Tabela 1 -** Frequências observadas para o número de calos potencialmente embriogênicos e não embriogênicos nos tratamentos utilizados, para a cultivar BRS Araripe.

| Tratamentos | Tipos de calos <sup>1</sup> |      |       |
|-------------|-----------------------------|------|-------|
|             | P.E.                        | N.E. | Total |
| ICG1        | 105                         | 13   | 118   |
| ICG2        | 100                         | 9    | 109   |

<sup>2</sup> $\chi^2_{\text{calc}} = 0,493$

<sup>2</sup> $\chi^2_{\text{tab}} (5\%) = 3,841$

1. P.E.= calos potencialmente embriogênicos; N.E.= calos não embriogênicos; Qui-Quadrado Tabelado (<sup>2</sup> $\chi^2_{\text{tab}}$ ) foi verificado em Beiguelman (1996), a 5% de probabilidade

**Tabela 2.** Frequências observadas para o número de calos potencialmente embriogênicos e não embriogênicos nos tratamentos utilizados, para a cultivar BRS Seridó.

| Tratamentos | Tipos de calos <sup>1</sup> |      |       |
|-------------|-----------------------------|------|-------|
|             | P.E.                        | N.E. | Total |
| ICG1        | 116                         | 20   | 136   |
| ICG2        | 113                         | 27   | 140   |

<sup>2</sup> $\chi^2_{\text{calc}} = 1,024$

<sup>2</sup> $\chi^2_{\text{tab}} (5\%) = 3,841$

1. P.E.= calos potencialmente embriogênicos; N.E.= calos não embriogênicos; Qui-Quadrado Tabelado (<sup>2</sup> $\chi^2_{\text{tab}}$ ) foi verificado em Beiguelman (1996), a 5% de probabilidade

tamina, tiamina, asparagina e nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), as quais têm efeitos comprovados em estudos anteriores no algodão. Segundo Carvalho (1996), a adição de glutamina favoreceu a embriogênese somática nas cultivares Precoce 2 e Coker 312. Sun et al. (2004), obtiveram calos embriogênicos de

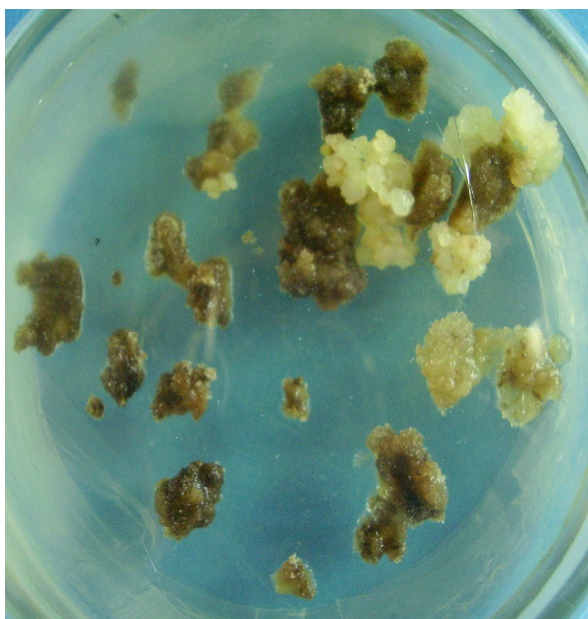
*Gossypium Klotzchianum* em meio contendo glutamina e asparagina. Hoffmann et al. (1998) afirmam que, para uma indução bem sucedida de calos embriogênicos, um suprimento reduzido de nitrogênio é necessário. Este pode ser fornecido na forma de íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e/ou um aminoácido, como glutamina ou alani-

na. O KNO<sub>3</sub> foi utilizado por Davidonis e Hamilton (1983) para a obtenção de embriões somáticos da cultivar Coker 310. Quando não se utilizam reguladores de crescimento no meio de rediferenciação, principalmente as auxinas, a maioria dos autores obtém calos embriogênicos em algodão e em outras espécies (CARVALHO, 1996; SUN et al., 2004; OROPEZA et al., 2001; HAQ, 2005; SILVA, 2010). Acredita-se que na presença continuada de auxina, o calo embriogênico expressa genes que inibem a formação de embriões maduros (FÉHER et al., 2003).

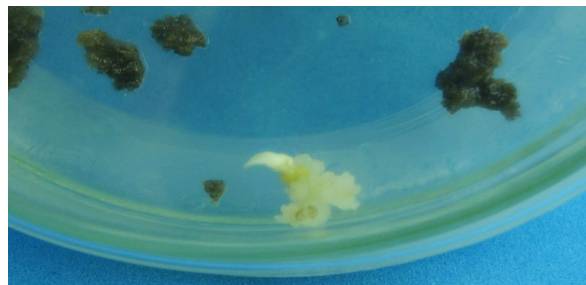
Logo após a transferência para os meios de rediferenciação, apesar da elevada quantidade de calos friáveis e creme-esverdeados que haviam sido observadas e que, segundo Carvalho (1996), são os mais propícios ao surgimento de embriões somáticos em algodão, houve escurecimento dos calos, e os mesmos permaneceram nestes tratamentos durante quatro meses, sem a realização de subcultivos. Ao longo do segundo mês, em algumas placas que continham o meio de rediferenciação IEG1, foram surgindo calos friáveis, de fácil desagregação e de coloração amarelo-esverdeada, caracterizados como calos embriogênicos (Figura 3). Estes eram provenientes do tratamento suplementado com ANA e KIN (ICG1) da cultivar BRS Seridó. De acordo com Chée (1990), calos embriogênicos podem ser distinguidos por sua aparência nodular e coloração amarelada.

No restante dos tratamentos os calos permaneceram escurecidos e indiferenciados.

No decorrer do quarto mês em meio de rediferenciação, houve o surgimento de embriões somáticos (Figura 4), formados a partir dos calos embriogênicos, entretanto, estes se apresentaram deformados, não sendo possível regenerar plantas de algodão.



**Figura 3.** Calos embriogênicos da cultivar de algodão BRS Seridó, com aparência nodular e coloração amarelo-esverdeado.



**Figura 4.** Embrião somático deformado da cultivar BRS Seridó.

Resultado semelhante foi obtido por Haq (2005), estudando a embriogênese somática na cultivar Coker 312 do algodão, utilizando diferentes concentrações dos fitorreguladores ANA, KIN e ZT. Além de embriões somáticos que, posteriormente, regeneraram plantas saudáveis, surgiram também embriões morfológicamente anormais. Existem diversos outros casos em que os embriões somáticos cultivados não se desenvolvem normalmente, não germinam, nem se convertem em plantas normais. Vários trabalhos descrevem anormalidades observadas na embriogênese somática *in vitro*, por exemplo: embriões fundidos (HU; SUSSEX, 1971), com cotilédones múltiplos, fundidos, de tamanho e forma diferentes, e cotilédones cilíndricos (CHÉE; CANTLIFFE, 1988).

Os fatores que influem no êxito do cultivo de tecidos estão relacionados à origem e ao tipo de material vegetal, destacando-se a idade da planta, o tipo de explante, a posição que este explante ocupa na planta e uma vasta lista de aspectos que, em sua totalidade, dificilmente poderão ser controlados, pois cada variedade reage ou responde de maneira diferente (RÊGO et al., 2009; CARVALHO et al., 2006a).

O fato dos calos embriogênicos terem surgido apenas na cultivar BRS Seridó e não na BRS Araripe, apesar de ter sido utilizado o mesmo meio de cultivo, nos sugere que a habilidade em formar embriões não é uma propriedade intrínseca da espécie, mas específica por genótipos. Assim, supõem-se que os meios empregados não foram capazes de satisfazer todos os requerimentos necessários para a obtenção de estruturas embriogênicas.

Embora visíveis, os avanços da biotecnologia e dos estudos relacionados à embriogênese somática, a compreensão dos estímulos e condições ideais à indução, no que se refere ao conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os hormônios da planta são envolvidos na regulação e no controle deste processo ainda são limitados. Ressalta-se que a identificação de genes associados à embriogênese somática é um recurso importante para o entendimento das interações genéticas fundamentais à sinalização e regulação das respostas, podendo contribuir para a caracterização desse processo em plantas (CARVALHO et al., 2006b).

## CONCLUSÕES

Os reguladores de crescimento utilizados nos meios de cultivo propiciam a indução e proliferação de calos, os quais variam quanto à consistência e coloração, com predominância dos friáveis e creme-esverdeados;

Na cultivar BRS Seridó, há formação de calos embriogênicos no meio de rediferenciação EIG1, o qual contém calos provenientes do tratamento suplementado com os fitorreguladores ANA e KIN (ICG1).

## REFERÊNCIAS

- ARNOLD, S. V. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n.3, p. 233-249, 2002.
- BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. 242 p.
- BEZERRA, J. S.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 259-263, 2001.
- CARVALHO, J. M. F. C. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo in vitro em la multiplicacion y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) - Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos, Universidad Politecnica de Madrid, Madrid, 1996.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 2006a. 28 p.(Documentos, 148).
- CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Embriogênese Somática**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 2006b. 35 p. (Documentos, 152).
- CHÉE, P. P. High frequency of somatic embryogenesis in recovery of fertile cucumber plants. **HortScience**, v. 25, n. 7, p. 792-793, 1990.
- CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 24, n. 9, p. 955-958, 1988.
- DAVIDONIS, G. H.; HAMILTON, R. H. Plant regeneration from callus tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) **Plant Science**, v. 32, n. 2, p. 89-93, 1983.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.
- HAQ, I. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 206-209, 2005.
- HOFFMANN, A. et al. Aplicações na micropropagação de plantas. In: PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPA, p. 50-55, 1998.
- HU, C. Y.; SUSSEX, I. M. In vitro development of embryoids on cotyledons of *Ilex aquifolium*. **Phytomorphology**, v. 21, n. 2, p. 103-107, 1971.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 3, p. 91-110, 2005.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 43, p. 473-497, 1962.
- OROPEZA, M. et al. **Optimizacion del proceso de embriogênese somática em variedades venezolanas de caña de azúcar**. 2001, 24 p. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf)>. Acesso em: 14 fev. 2006.
- RÊGO, M. M. et al. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 34-38, 2009.
- RICHETTI, A.; MELO FILHO, G. A. de. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. **Algodão: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. p. 11-22.
- SILVA, M. M. A. **Embriogênese somática direta e indireta em cana-de-açúcar: busca de correlações**

com o estresse *in vitro*. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SUN, Y. et al. Production and characterization of somatic hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G. klotzschianum* Anderss) via electrofusion. **Theoretical and applied genetics**, v. 109, n. 3, p. 472-479, 2004.