

Influência de meios de cultura e suplementações hormonais sobre a indução e desenvolvimento de calos *in vitro* em variedades de *Gossypium hirsutum* L.

Silva, Kleptura de Oliveira e¹; Lima, Jailma Almeida de²; Aloufa, Magdi Ahmed Ibrahim³.

¹Bióloga, Centro de Biociências/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN. Campus Universitário, Lagoa Nova; Sem N°. CEP: 59072-970, Natal/RN. EMAIL: kletinha@yahoo.com.br; Fone/Fax: (0**84) 3215 3189; ²Aluna do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica/ BDQ/UFRN. Centro de Biociências/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN. Campus Universitário, Lagoa Nova; Sem N°. CEP: 59072-970, Natal/RN. EMAIL: biolottus23@yahoo.com.br; Fone/Fax: (0**84) 3215 3189; ³Dr.Professor do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia/DBEZ. Universidade Federal do Rio Grande do Norte./UFRN. Campus Universitário, Lagoa Nova; Sem N°. CEP: 59072-970, Natal/RN. EMAIL: magdi-aloufa@bol.com.br; Fone/Fax: (0**84) 3211-9205

INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento na cultura do algodão em todo o mundo têm passado por grande desenvolvimento tecnológico nas últimas décadas, motivado principalmente pelo combate às diversas pragas que infestam o algodoeiro. A utilização das plantas selecionadas *in vitro* em programas de melhoramento é uma realidade em muitos países. No Brasil, especificamente, o objetivo principal é aumentar a produtividade com conseqüente melhora da qualidade das variedades, elevando as características das fibras (Freire, 1999) e aumentando a resistência dos genótipos (Jimenez, 2001) principalmente em relação às doenças, e desenvolver a diversidade dos bancos de germoplasma.

Um sistema eficiente de regeneração de plantas *in vitro* caracteriza-se pela rápida e contínua produção de embriões somáticos (Zhang et al. 2000). Esse tipo de sistema permite a obtenção de embriões em larga escala e rejuvenescimento do material vegetal, fator essencial para a seleção dos genótipos melhorados. A solução de boa parte das patogenias que afetam essa cultura por meio da resistência genética constitui-se num fator relevante para os melhoristas, geneticista e fitopatologistas, pois o uso de variedades mais resistentes a doenças poderá contribuir, principalmente em regiões em desenvolvimento, para o aumento da produtividade, a diminuição dos custos de produção e a proteção do meio ambiente, complementando a agricultura convencional.

Objetivou-se, com este trabalho, averiguar o efeito de dois meios de cultura, Murashige e Skoog (1962) e Nitch (1974), na indução de calos embriogênicos e seu desenvolvimento (peso); sob influência dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 2IP (2-isopenteniladenina) em três variedades distintas de algodão.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Empregaram-se sementes oriundas do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPQ) em Campina Grande - Pb, de plantas de algodão das variedades **CNPQ ITA 96; CNPQ BRS 201 e CNPQ FACUAL**.

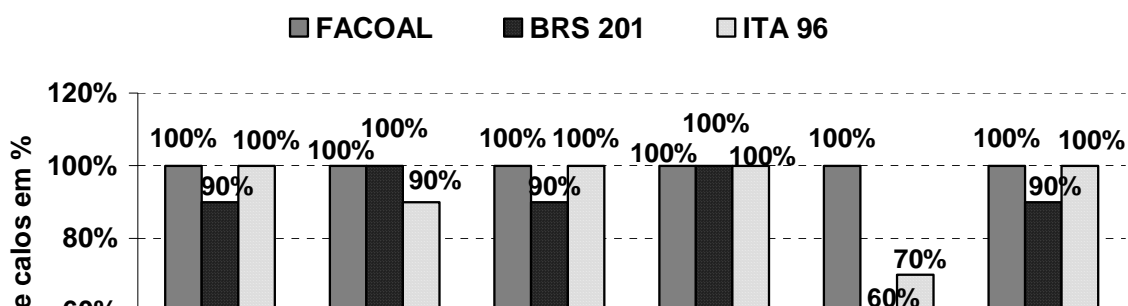
As sementes foram desinfestadas por imersão em etanol a 70%, durante cinco minutos e, em seguida, mergulhadas em hipoclorito de sódio (2%) por 20 minutos, e então enxaguadas três vezes em água destilada e esterilizada, permanecendo em cada enxágüe por cinco minutos. Posteriormente, as mesmas foram escarificadas, retirando-se totalmente o tegumento, e inoculadas, para germinação, sobre folhas de papel filtro, em frascos de 300 mL de capacidade e 6,0 cm de diâmetro contendo água destilada e esterilizada (30 mL). As culturas foram mantidas em sala de incubação, sob condições controladas de luz (intensidade luminosa de 30 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (12 horas de luz), temperatura ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa controlada.

Após três dias de germinação das sementes foram retiradas porções de hipocótilo com 1,0 cm de comprimento a partir de plantas germinadas *in vitro*, e inoculadas em frascos de 300 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. Os meios empregados na indução de calos foram MS (Murashige e Skoog, 1962) e Nitch (1974), nos quais adicionaram-se suplementações hormonais (2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 5,0 mg.L⁻¹ de 2IP-C₁, 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg.L⁻¹ de 2IP-C₂, 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg.L⁻¹ de 2IP C₃). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três tratamentos e dez repetições por tratamento em cada variedade. O pH foi ajustado para 5,7. As culturas permaneceram incubadas a uma temperatura de 26 ± 2°C, sob um fotoperíodo de 12 horas-luz e intensidade luminosa de 30 µM.m⁻². s⁻¹. Após quatro semanas, os calos formados foram subcultivados para meio fresco com a mesma composição inicial, a fim de obtenção de um melhor desenvolvimento, totalizando três subcultivos subseqüentes para realização das observações durante noventa dias.

Os parâmetros avaliados foram: taxa de indução de calos e peso fresco dos mesmos, sendo realizada a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da taxa de indução de calos nas variedades testadas, a FACOAL demonstrou resultados máximos(100%) nos dois meios de cultura (Figura 1), enquanto a variedade BRS 201 obteve percentagens relativamente menores 90, 90, 60% para MS e 100, 100 e 90% no meio Nitch, respectivamente, nas três concentrações. No meio MS, a variedade ITA 96 demonstrou taxa mais reduzida na concentração C₃. Para os meios propostos em nosso estudo, o Nitch revelou maiores valores na indução de calos, sendo a concentração C₂ a que mais propiciou a indução calogênica nas três variedades: FACOAL (100%), BRS 201 (100%) e ITA 96 (100%). Os resultados obtidos evidenciaram a capacidade de embriogênese somática nessa cultura *in vitro*. Embriões somáticos foram observados por Trolinder e Goodin (1987) em suspensões celulares de oito cultivares de *G. hirsutum* cultivados em meio MS com diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina. Os resultados obtidos evidenciam formação de embriões somáticos nas três variedades trabalhadas, o que ocorreu após o segundo subcultivo dos calos. Devemos destacar que a indução embriogênica de uma célula somática não é exclusivamente dependente do uso de reguladores de crescimento, pois Guerra et al. (1999) narram que choques térmicos, variações nos níveis de pH e utilização de outros produtos químicos, como carvão ativado, podem também induzir capacidade embriogênica em células somáticas de espécies vegetais, contudo, observou-se que o uso dos reguladores 2,4-D e 2IP induziu calos embriogênicos nas variedades propostas. Os resultados quanto à média de peso fresco de calos, para todas as variedades em estudo nos meios MS e Nitch, suplementados com as três concentrações (C₁, C₂ e C₃), estão apresentados na Figura 2. No meio MS, observou-se que os melhores resultados foram da variedade FACOAL, para as concentrações C₁ e C₂, enquanto que para a variedade ITA 96, foi a concentração C₃ (0,79g). Para o meio Nitch, a variedade FACOAL demonstrou a maior média de peso fresco em todas as concentrações (2,21g; 2,69g e 1,03g). Ammirato (1986) explicitou, em seus estudos sobre técnicas de propagação e cultura de células em plantas, que as condições ideais para o cultivo *in vitro* variam com o genótipo em estudo. Valores análogos podem ser observados quanto à média de peso fresco, comparando-se uma mesma variedade ou quando se analisam todas conjuntamente nos diferentes meios e concentrações.



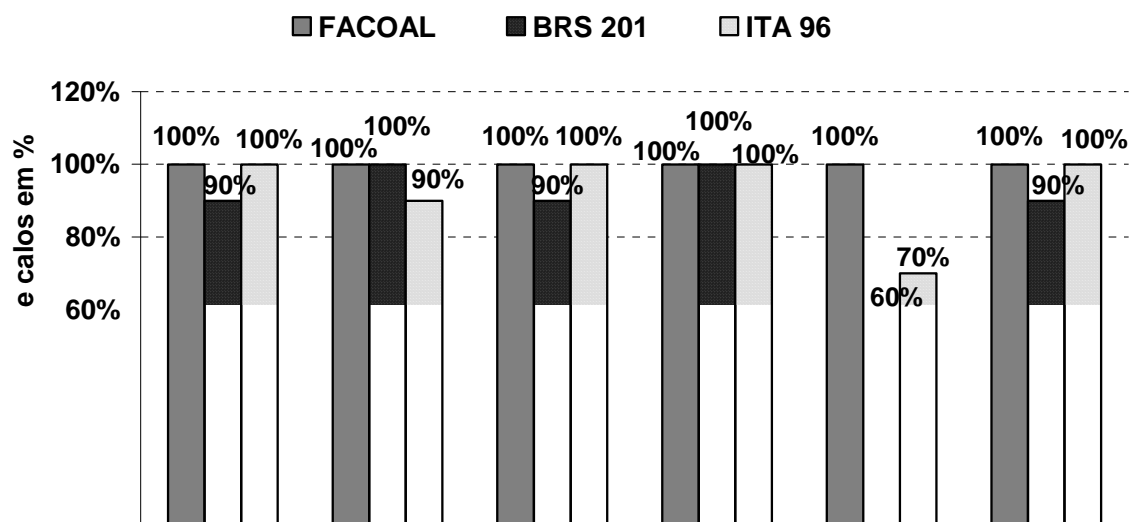


Figura 1 – Efeito de três concentrações hormonais na indução de calos de *Gossypium hirsutum* L; variedades CNPA ITA 96, CNPA BRS 201 e CNPA FACOAL nos meios MS e NITCH.

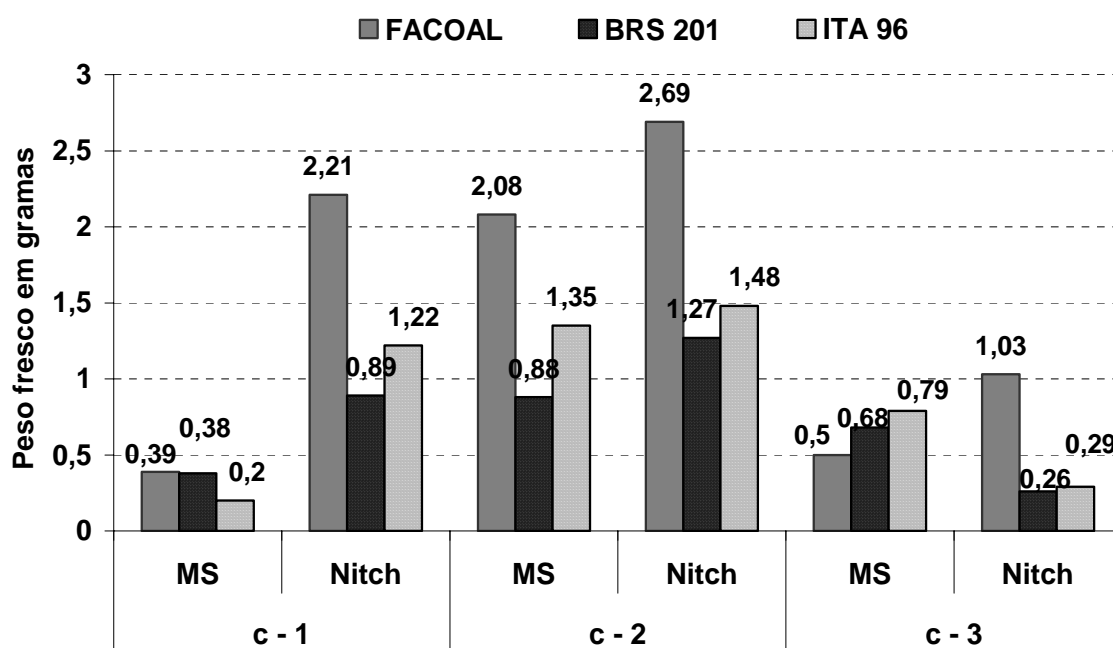


Figura 2 – Desenvolvimento de calos de algodão em gramas nas variedades CNPA ITA 96, CNPA BRS 201 e CNPA FACOAL sob o efeito de três concentrações hormonais nos meios de cultura.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que, os meios de cultura utilizados junto com as concentrações hormonais influenciam na indução de calos e no peso fresco (desenvolvimento) dos mesmos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V. **Embryogenesis**. In: EVANS, D. A et al. **Handbook of plant cell culture-techniques for propagation and breeding**. New York: Mcmillan Publish, 1986. p. 82-123.

FREIRE, E. C.; Algodão Colorido. **BIO Tecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília ano II, n. 9, p. 36-39, 1999.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. Cap. II, v. 2, p. 533-568, 1999.

JIMÉNEZ, V. M. **Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones**. Revista Brasileira de Fisiologia. Veg., V.13, n. 2, p.196-223, jun. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

NITCH, C. La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. **C. R. Academic Science**, Paris, v. 278, p. 1031-1034, 1974.

TROLINDER, N. L.; GOODIN, J. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Report**. Berlin, v. 6, p. 231-234. 1987.

ZHANG, B.; LIU, F.; YAO, C. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, p. 89-94, 2000.

PALAVRAS-CHAVES

Cultura de tecidos; Embriogênese somática; Regeneração *in vitro*.