

108

**Circular
Técnica**Campina Grande, PB
Outubro, 2007**Autores****Paulo Augusto Vianna Barroso**Eng. agrôn., M.Sc., da
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
58107-720 – Campina Grande, Pb
E-mail: pbarroso@cnpa.embrapa.br**Guilherme da Silva Pereira**Graduando em Ciências Biológicas
Univesidade Estadual da Paraíba
estagiário da Embrapa Algodão**Lúcia Vieira Hoffmann**Eng. agrôn., D.Sc., da
Embrapa Algodão
E-mail: hoff@cnpa.Embrapa.br**Técnicas de Autofecundação Controlada e de
Cruzamento Artificial em Algodoeiros**

As espécies agrícolas podem ser divididas em dois grupos quanto à biologia reprodutiva: autógamas (por serem predominantemente autopolinizadas) ou alógamas (por se reproduzirem basicamente por polinização cruzada). Sob o ponto de vista do melhoramento de plantas, as técnicas adotadas em seus programas baseiam-se nessa distinção. O seu objetivo e os detalhes de sua execução são determinados, por exemplo, pela facilidade com que híbridos controlados podem ser reproduzidos, ou indivíduos escolhidos, autofecundados (ALLARD, 1971).

O algodoeiro apresenta flor completa e hermafrodita, cuja conformação, produção e forma de dispersão do pólen são características (Fig. 1). Em relação à taxa de fecundação cruzada, possui taxas de autopolinização variáveis, mas superiores aos 5% das alógamas e inferiores aos 95% das autógamas, em ambiente natural. É considerada, logo, uma espécie intermediária (FREIRE et al., 2002).

A polinização cruzada é mediada por insetos, sendo os himenópteros os mais importantes. A coloração das pétalas e os nectários florais que secretam líquido rico em carboidratos atraem os insetos para as flores. Do hábito de forrageamento de abelhas melíferas e silvestres depende a dispersão do pólen, inclusive a longas distâncias. O pólen aderido ao corpo dos insetos é depositado sobre o pistilo que se projeta acima da coluna estaminal, que pode receber pólen de várias plantas diferentes devido às várias visitas de abelhas que uma mesma flor pode receber (FREIRE et al., 2002; PENNA, 1999;).

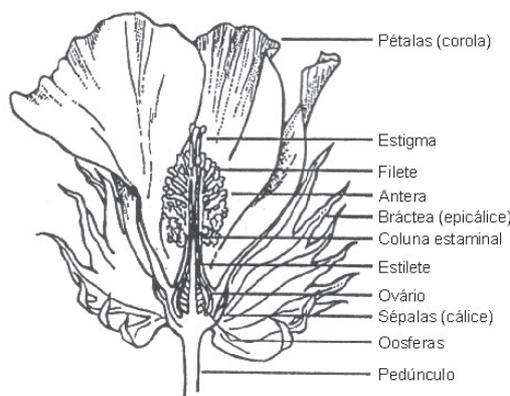


Fig. 1. Seção longitudinal de flor de algodão típica no dia da antese. É sustentada por um pedúnculo e é composta por: i) epicálce, formado por três brácteas; ii) cálce, constituído por cinco sépalas fundidas; iii) corola, abrangendo cinco pétalas; iv) androceu, organizado na coluna estaminal de filetes mais anteras; v) gineceu, formado pelo estigma mais estilete e pelo ovário que abriga as oosferas. Fonte: Adaptado de OOSTERHUIS e JERNSTEDT, 1999.

A autopolinização ou autofecundação consiste em técnica relativamente simples para i) evitar polinização cruzada e conseqüente hibridação indesejada, tanto nos campos de melhoramento, como na produção de semente pura, e ii) dirigir a reprodução conforme as necessidades dos vários métodos de melhoramento. O isolamento espacial ou o uso de barreiras artificiais são, de modo geral, facilmente aplicáveis para se evitar ou minimizar a polinização cruzada natural.

O processo de hibridação em plantas consiste em se levar ao estigma de uma flor (genitor feminino, ou receptor de pólen), grãos de pólen de outra flor (genitor masculino, ou doador de pólen), de tal modo que, caso haja compatibilidade sexual e genética, originam-se sementes híbridas. A hibridação é desejada em diversas situações. No melhoramento, os cruzamentos são importantes para gerar populações recombinantes para fins de seleção, bem como na transferência de genes via retrocruzamentos.

Esses procedimentos, entretanto, apresentam algumas limitações que podem afetar significativamente o sucesso dos programas. Segundo Penna (1999), uma dessas limitações para algodoeiros refere-se ao período de execução. Embora o período de floração seja relativamente prolongado, a experiência revela que as hibridações efetuadas mais cedo apresentam maior chance de pegamento, são menos sujeitas ao ataque de pragas tardias e são mais facilmente identificadas na abertura das maçãs. Condições ambientais como temperaturas elevadas (acima de 36 °C) e estresse hídrico podem ocasionar "shedding" (queda das maçãs), assim como o encharcamento do solo ou a falta de nutrientes.

Um fator imprescindível para a realização dos cruzamentos é coincidência de florescimento entre ou genitores. Florescimentos sem sincronia ou reações fotoperiódicas distintas, que ocorrem em latitudes mais elevadas, podem levar a perdas significativas de oportunidades de cruzamentos. Esse problema pode ser solucionado com a devida caracterização dos genitores e, de posse dos dados, faz-se plantio escalonado de forma a coincidir as florações. De modo geral, os cruzamentos entre algodoeiros de espécies diferentes com o mesmo conjunto genômico não apresentam problemas. Grande dificuldade, entretanto, é observada nos cruzamentos entre tetraplóides e diplóides (WENDEL e CRONN, 2003).

Autofecundação controlada

Vários métodos de autopolinização em flores de algodoeiro podem ser utilizados. Devem ser realizados na tarde do dia que antecede a abertura do botão floral, geralmente após as quinze horas, quando o botão apresenta-se em tamanho adequado para a manipulação (Fig. 2). Embora a amarração, principalmente com fio de cobre, seja mais usada, pode-se optar por outra tática a depender das circunstâncias. Nos casos em que os estigmas das flores ultrapassam as pétalas em tamanho quando da abertura, a utilização da amarração dificilmente será bem-sucedida. Assim, pode-se optar pelo encapsulamento do botão floral com sacos pequenos de papel leve. Em outro caso, quando não se terá acesso às plantas dentro de alguns dias (por um fim de semana, por exemplo), a colagem das pétalas com cola de isopor ou esmalte mostra-se satisfatória.

Amarração

1. Segurar o pedúnculo do botão floral, sem torcê-lo, dando pelo menos três voltas (sem apertar) com um fio de cobre (20 cm) ao seu redor. No uso de barbantes (também de 20 cm), estes são amarrados com folga ao pedúnculo;

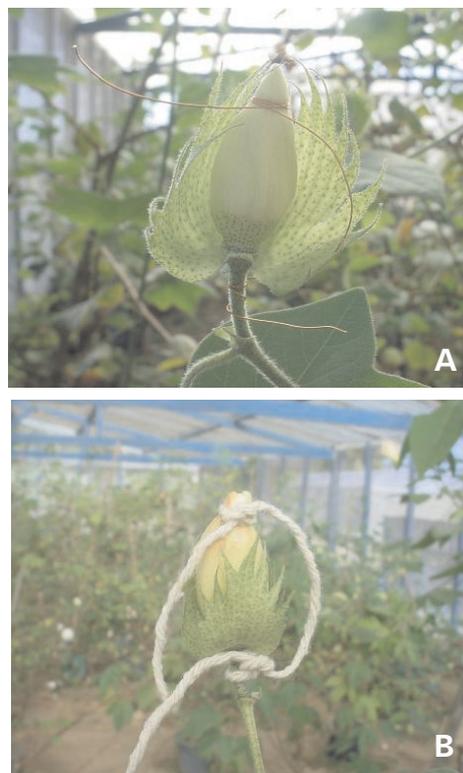


Fig. 2. Botão floral de algodoeiro autofecundado pelo processo de amarração das pétalas por fio de cobre (A) e com barbante (B).

2. Enrolar o fio em torno do ápice do botão, na terminação das pétalas, dando cerca de três voltas, com firmeza, mas não com força, pois o ápice pode ser cortado. Utilizando-se barbante, a extremidade livre deve ser amarrada com segurança ao ápice, tomando o mesmo cuidado para não danificar as pétalas;
3. A identificação dá-se pelo próprio fio ou barbante amarrado ao pedúnculo da flor (Fig. 2).

Encapsulamento

1. Recobrir o botão floral com um saco pequeno de papel leve (pouco maior que o tamanho da flor), sem pressionar o fundo do saco contra o ápice;
2. Amarrar a abertura do saco ao pedúnculo do botão com auxílio de fio de cobre (20 cm), sem deixar folgas para a entrada de insetos intrusos;
3. O próprio saco serve para identificar os botões autofecundados (Fig. 3);



Fig. 3. Autofecundação de flor de algodão pela técnica de encapsulamento com saco de papel.

4. Dado que a flor de algodoeiro dura apenas um dia, pode-se retirar os sacos no dia seguinte após a abertura da flor.

Colagem

1. Depositar sobre o ápice do botão floral quantidade suficiente de cola de isopor ou de esmalte de tal modo que as pétalas não consigam se descolar quando o estigma estiver receptivo. Isso se consegue, de modo geral, recobrimdo cerca de meio centímetro das pétalas sobre e em torno do ápice;
2. Identificar a autofecundação amarrando-se fio de cobre ou barbante ou, ainda, atando-se etiqueta ao pedúnculo do botão floral (Fig. 4).

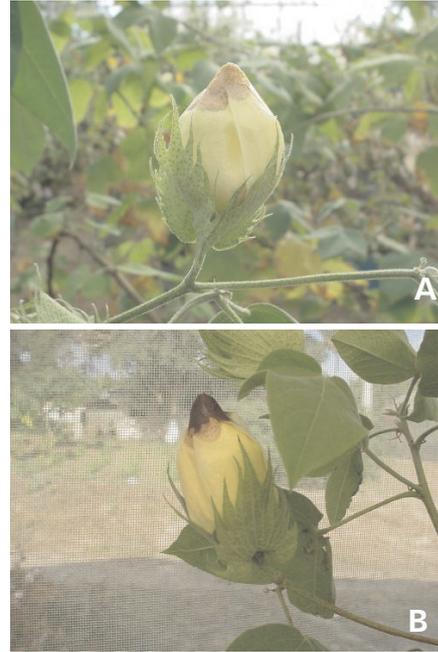


Fig. 4. Aspecto de flores de algodoeiros (já no dia da antese) autofecundadas pela técnica de colagem das pétalas com cola de isopor (A) e com esmalte (B).

Cruzamento artificial em algodoeiros

Escolhidos de acordo com os objetivos, os pais são plantados em fileiras, se possível, emparelhadamente. Faz-se necessário que número representativo de cada genitor seja utilizado no cruzamento, buscando-se aproveitar a possível variabilidade genética dos pais. É essencial que o florescimento dos genitores coincida. Portanto, deve-se considerar o comportamento das plantas quanto à duração do período vegetativo para determinar quando a semeadura de cada genótipo envolvido no esquema de cruzamentos será realizada. Também é recomendável realizar plantios escalonados dos genitores, de modo que pequenas variações de ciclo não dificultem a realização dos cruzamentos. A escolha de qual genótipo será usado como genitor feminino ou masculino deve considerar:

A) Genitor feminino

Organelas celulares portadoras de DNA são herdadas do genitor feminino. Caso o DNA extracromossômico condicione efeitos fenotípicos positivos ou negativos, o genitor feminino deve ser escolhido de modo a aproveitá-los ou a evitá-los, respectivamente. Caso não haja efeito citoplasmático, o genitor feminino deve ser aquele capaz de produzir maior quantidade de sementes por fruto ou aquele que fornecer maior porcentagem de pegamento de frutos oriundos de cruzamento seja mais elevado.

O preparo das flores dos genitores femininos (ou emasculação) é efetuado na tarde do dia precedente à abertura do botão floral, período em que se mostra mais desenvolvido (aproximadamente a partir das quinze horas) (Fig. 5).

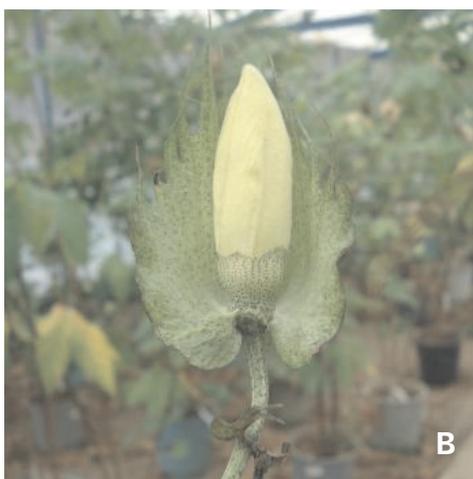
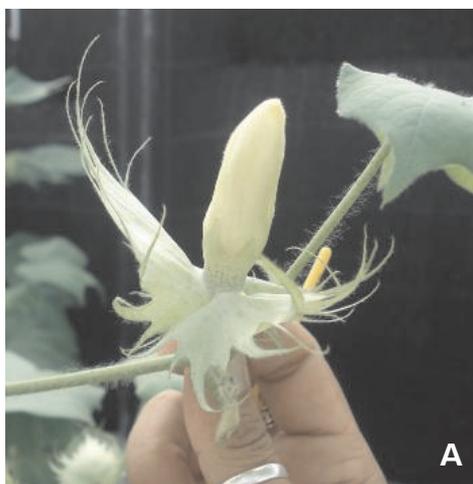


Fig. 5. Aspecto externo de botões florais de genótipos de *Gossypium hirsutum* (A), *G. barbadense* (B) e *G. mustelinum* (C) em seus respectivos estágios de desenvolvimento adequados para a emasculação.

B) Genitor masculino

Uma característica importante do genitor masculino é a quantidade de pólen produzida. Se o genótipo produz pouca quantidade de pólen, maior número de flores será necessário para realizar as polinizações. De modo geral, uma flor fornece pólen suficiente para realizar fecundações em quatro ou cinco flores emasculadas. Porém, se poucas flores a serem usadas como fonte de pólen estão disponíveis, pode-se usar uma mesma flor para fecundar até dez flores emasculadas. Neste caso, entretanto, pode-se ter uma menor quantidade de sementes por capulho.

Preparo das flores do genitor feminino

1. Remover a corola com auxílio de tesoura pequena de ponta (ou de bisturi, estilete, ou mesmo de um emasculador próprio) (Fig. 6). Pode-se também retirar as pétalas e a coluna estaminal simultaneamente, fazendo uma pequena pressão com a unha do polegar na base das sépalas e puxando todo o conjunto com delicadeza (Fig. 7). Deve-se procurar manter as brácteas, por proporcionarem proteção à maçã jovem. O amarelecimento das brácteas é um indicativo de que ocorrerá o abortamento;
2. Caso apenas as pétalas tenham sido retiradas, eliminar as anteras manualmente ou com o auxílio da tesoura (Fig. 8).
3. Opcionalmente, pode-se lavar o estigma com água destilada armazenada em piseta, a fim de remover completamente grãos de polens imaturos e umedecer a flor, evitando dessecação em dias muito quentes;



Fig. 6. Corola removida em botão floral de algodoeiro.



Fig. 7. Esquema da emasculação manual em botão floral de algodoeiro: pressiona-se delicadamente a base do botão floral com a unha do polegar (A); força-se à liberação das pétalas (B); remove-se toda a corola, juntamente com a coluna estaminal (C).



Fig. 8. Corola e anteras imaturas eliminadas (emasculação) em flor de algodoeiro.

4. Proteger o estigma com canudo de papelão cortado um pouco maior que o tamanho do pistilo e dobrado em uma das pontas, impedindo a polinização por insetos intrusos (Fig. 9).

Polinização

1. Recolher flores do parental masculino em sacos de papel identificados, por volta das nove horas (ou quando a manhã estiver quente e ensolarada) e avaliar se a antese já ocorreu;



Fig. 9. Canudo de papelão recobrimdo o estigma do botão floral emasculado.

2. Opcionalmente, se o dia estiver nublado e frio, pode-se incubar as flores por cinco minutos, a 35-40 °C, em estufa, ou levá-las para outro ambiente mais quente;

3. Retirar o canudo de papelão que recobre o gineceu da flor emasculada e esfregar os estames da flor doadora contra o estigma da flor emasculada para a deposição do pólen (Fig. 10);

4. Recolocar o canudo de papelão para proteger o estigma novamente;

5. Identificar com etiqueta, na qual se anota os genitores (feminino e masculino) utilizados no cruzamento, o operador que realizou o cruzamento e a data de execução deste. As etiquetas devem apresentar tamanho reduzido, para não forçar excessivamente o pedúnculo. Ainda, deve-se ficar atento ao desaparecimento de anotações em etiquetas devido às intempéries. Canetas esferográficas facilmente se apagam com água, devendo-se preferir lápis grafite escuro para as anotações.



Fig. 10. Polinização da flor emasculada por meio do esfregamento das anteras da flor do genitor masculino.

Referências Bibliográficas

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971.
- FREIRE, E. C.; BARROSO, P. A. V.; PENNA, J. C. V.; BORÉM, A. Fluxo gênico: análise do caso de algodão no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 104-113, 2002.
- OOSTERHUIS, D. M.; JERNSTEDT, J. Morphology and anatomy of the cotton plant. In: SMITH, W. C.; COTHREN, T. J. (Ed.). **Cotton: origin, history, technology, and production**. John Wiley & Sons., 1999.
- PENNA, J. C. V. **Hibridação em algodão**. In: BORÉM, A. (Ed.). Hibridação artificial de plantas. Viçosa: UFV, 1999. p 63-81.
- WENDEL, J. F.; CRONN, R. C. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. **Advances in Agronomy**, v. 78, p. 139-186.

Circular Técnica, 108

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: Nair Helena Castro Arriel
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevedo
Everaldo Paulo de Medeiros
Fábio Aquino de Albuquerque
Francisco das Chagas Vidal Neto
João Luiz da Silva Filho
José Wellington dos Santos
Luiz Paulo de Carvalho
Nelson Dias Suassuna

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