

## Indução de Calos a partir de Embriões Zigóticos Imaturos em Duas Cultivares de Algodão

Márcia Soares Vidal  
Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
José Wellington dos Santos  
Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro  
Jeane Ferreira Jerônimo

Vários protocolos têm sido explorados visando à transformação de algodão, incluindo, o uso do *Agrobacterium*, utilizando células meristemáticas (GOULD et al., 1991), cotilédones (FIROOZABADY et al., 1987), hipocótilo (UMBECK et al., 1987), calos embriogênicos (LEELAVATHI et al., 2004), o uso de biobalística (RAJASEKARAN et al., 2000) e o uso de transformação via tubo polínico (ZHOU et al., 1983). Embora todos esses protocolos tenham sido relatados, a regeneração e a transformação do algodão são genótipos dependentes, sendo extremamente difíceis de atingir o sucesso na transformação, devido à presença de vários componentes orgânicos no algodão, particularmente, a presença de polifenóis, que dificultam o processo de regeneração. Com base nisso e no fato de que alguns métodos de regeneração/transformação apresentarem-se genótipo específicos, as pesquisas nesta área ainda continuam, a fim de obter uma metodologia que não se mostre genótipo específica e

que aumente o recuperação de transformantes de algodão.

A embriogênese somática é considerada uma das estratégias mais eficazes de regeneração e transformação do algodoeiro, apesar de seu caráter genótipo-dependente. A transformação de células embriogênicas, capazes de regenerar uma planta inteira, garante a transferência dos genes exógenos à sua progênie e diminui as chances de ocorrência de plantas quiméricas (WILKINS et al., 2000).

A fim de viabilizar a transformação de qualquer variedade de algodão por embriogênese somática, os protocolos de regeneração existentes têm sido aperfeiçoados através da manipulação das condições de cultura (microambiente) e dos fatores hormonais e nutricionais do meio de cultivo e, emprego de explantes distintos dos que até então vem sendo utilizados, como explantes de hipocótilo,

<sup>1</sup>Bióloga, DSc. em Genética, Embrapa Algodão, CP 174, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

<sup>2</sup>Eng. Agr., DSc. em Recursos Fitogenéticos, Embrapa Algodão. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

<sup>3</sup>Eng. Agr., MSc. em Estatística, Embrapa Algodão. E-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

<sup>4</sup>Estagiária da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58109-753, Campina Grande, PB.

<sup>5</sup>Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da UFCG.

por exemplo. Além disso, a identificação mais precisa dos diferentes tipos de calos possibilita a seleção apenas dos calos com potencial embriogênico, os quais poderão ser utilizados com sucesso na transformação de algodão via *Agrobacterium*, aumentando, assim, a frequência de transformação.

De maneira geral, para a obtenção de embriões somáticos de algodão, segmentos de hipocótilo e cotilédone são cultivados em meio MS básico (MURASHIGE e SKOOG, 1962), contendo concentrações adequadas de auxina e citocinina (principalmente 2,4-D e cinetina, respectivamente). A etapa inicial consiste na indução da calogênese, na qual uma massa de calos friáveis dará origem a regiões embriogênicas. Nessa fase, porém, não se utiliza nenhum regulador de crescimento. A fim de aumentar a eficiência de regeneração de plantas, diversos fatores e condições de estresse têm sido introduzidos durante a produção e amadurecimento de embriões globulares. A adição de altas doses de  $KNO_3$ , por exemplo, e o enriquecimento dos meios de embriogênese com os aminoácidos glutamina e asparagina foram associados à alta eficiência de produção de embriões somáticos em alguns protocolos descritos na literatura (MISHRA et al., 2003; IKRAM-UL-RAQ et al., 2004; WU et al., 2004). Além disso, a dessecação tem sido utilizada para promover a maturação e a germinação de embriões no estádio cotiledonar (KUMRIA et al., 2003; CHAUDHARY et al., 2003).

Nos últimos anos, portanto, o sistema de embriogênese somática tem tido grandes avanços, os quais permitiram a regeneração de algumas espécies selvagens do gênero *Gossypium* (SUN et al., 2003), de variedades chinesas de *G. hirsutum* (ZHANG et al., 2001; WU et al., 2004), além das cultivares tradicionais da linhagem Coker (KUMRIA et al., 2003; CHAUDHARY et al., 2003; IKRAM-UL-HAQ E ZAFAR, 2004).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos das cultivares de algodão CNPA ITA-90II e BRS-CEDRO para posterior emprego na transformação genética via agrobactéria.

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido no

laboratório de Cultura de Tecidos parte integrante do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão – CNPA, localizada na cidade de Campina Grande, PB. Maçãs com 20 dias de desenvolvimento coletadas de plantas da cultivar de algodão CNPA ITA-90II mantidas em casa-de-vegetação foram selecionadas e levadas ao laboratório, onde foram lavadas e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e, em seguida, enxaguadas três vezes com água deionizada estéril. Destas maçãs foram extraídos os explantes, que foram então, cultivados em frascos de cultura contendo meio para a indução de calos, que consistia do meio MS básico suplementado com as combinações dos hormônios isopentenil-adenina (2iP) e 2,4-D diclorofenoxiacetato de sódio (2,4D), nas seguintes concentrações respectivamente, 0,1 mg.L<sup>-1</sup> e, 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, 3% de glicose e 0,2% de fitagel, pH 5,8. Como tratamento testemunha foi empregado o meio MS sem hormônios (MIE0). Foram utilizados 18 frascos com cinco embriões zigóticos para cada meio testado. Os frascos foram mantidos por 60 dias num fotoperíodo de 16h de luz/ 8h de escuro, para desenvolvimento dos calos. Após este período, foram avaliados: o número de explantes que desenvolveram calos, bem como, o número de explantes que desenvolveram plântulas e que necrosaram. Os dados foram analisados mediante o procedimento “General Linear Model (GLM)” do SAS.

Os resultados da indução de calos em meio MS suplementado com quatro concentrações de 2iP e uma concentração de 2,4-D, formado a partir de embriões zigóticos imaturos com 20 dias de desenvolvimento, estão apresentados na Tabela 1, onde não foi observada diferença nas variáveis analisadas entre as cultivares estudadas.

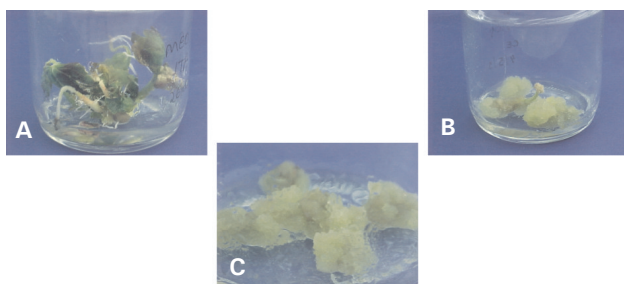
Foi observado que dos quatro tratamentos testados, o tratamento que produziu o maior número de explantes calejados foi o MIE1 (MS + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP), com cerca de 2,51 explantes com calos (Figura 1). Foi observado um elevado número de explantes necrosados para todos os tratamentos; no entanto, foi observada diferença significativa entre o meio MIE1 e os demais, onde foi possível observar um menor número de explantes necrosados, cerca de 6,78 explantes necrosados.

**Tabela 1.** Valores médios para os fatores cultivar e meios, referentes as variáveis explantes calejados, explantes com desenvolvimento de plântula, explantes calejados e com desenvolvimento de plântulas e, explantes necrosados.

| Fatores         | Variáveis <sup>1</sup> |        |                |         |
|-----------------|------------------------|--------|----------------|---------|
|                 | Calos                  | Desen. | Calos + Desen. | Necro.  |
| <b>Cultivar</b> |                        |        |                |         |
| CNPA ITA-90II   | 1,93 a                 | 1,90 a | 1,73 a         | 7,54 a  |
| BRS-CEDRO       | 1,60 a                 | 2,00 a | 1,52 a         | 8,04 a  |
| <b>Meio</b>     |                        |        |                |         |
| MIE0            | 1,00 c                 | 5,27 a | 1,25 b         | 5,52 c  |
| MIE1            | 2,51 a                 | 1,25 b | 2,51 a         | 6,78 c  |
| MIE2            | 2,25 ab                | 1,24 b | 1,54 ab        | 8,29 ab |
| MIE3            | 1,75 abc               | 1,00 b | 1,26 b         | 9,04 a  |
| MIE4            | 1,32 bc                | 1,00 b | 1,57 ab        | 9,29 a  |

Médias seguidas pelas mesmas letras dentro de cada fator nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de LSD a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $y = \sqrt{x+1}$



**Fig. 1.** Indução de calos a partir de embriões zigóticos. Meio MIE0, Desenvolvimento de plântulas; (B) Meio MIE2, Calos + Plântulas e, (C) Meio MIE1, Calos.

De posse dos calos, estes foram transferidos para meio MS livre de hormônios para o desenvolvimento dos mesmos, os quais serão avaliados histologicamente quanto a sua potencialidade em gerar embriões somáticos.

Com os resultados gerados neste trabalho pode-se concluir:

- Não houve diferença entre as cultivares para nenhuma das variáveis analisadas
- Verificou-se diferença significativa entre os meios para todas as variáveis em estudo, destacando o meio MIE1 para as variáveis calos e, calos com desenvolvimento de plântula

- Contatou-se que a indução de calos foi mais responsiva quando foi empregado o meio MIE1 (MS suplementado com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP)

## Referências Bibliográficas

CHAUDHARY, R.; KUMAR, S.; PRASAD, K.V.S.K.; OINAM, G.S.; BURNA, P.K. e PENTAL, D. Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). **Plant Cell Rep.**, 21: 955-960, 2003.

DENG-D.W.; GUO-S.D.; YANG-Z.M. Study on the molecular cytological mechanism of cotton transformation by pollen tube pathway. *Scientia Agricultura-Sinica*, v. 32(6), p. 113-114, 1999.

FIROOZABADY, E.; DeBOER, D.L.; MERLO, D.J.; HALK, E.L.; AMERSON, L.N.; RASHKA, K.E.; MURRAY, E.E. Transformation of cotton (*G. hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.10, p.105-116, 1987.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 43, p. 701-726, 1998.

IKRAM-UL-HAQ; ZAFAR, U. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 319-323, 2004.

KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V.G.; DAS, D. K.; GUPTA, S.K.; REDDY, V.S.; BAHTNAGAR, R.R. e LEELAVATHI, S.. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. **Plant Cell Rep.** v.21, p. 635-639, 2003.

LEELAVATHI, SUNNICHAN, V.G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G.P.; BHATNAGAR, R.K. e REDDY, V.S. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Rep.** v. 22, p. 465-470, 2004.

McCABE, D.E.; MARTINELL, B.J. Transformation of

elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. **Biotechnology**, v. 11, p.596-598, 1993.

MISHRA, R.; WANG, H.; YADAV, N.R. e WILKINS, T.A. Development of a high regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype-independent regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 21-35, 2003.

SAKHANOKHO, H.F.; ZIPF, A.; RAJASEKARAN, K.; SAHA, S.; SHARMA, G. e CHEE, P.W. Somatic embryo initiation and germination in diploid cotton (*Gossypium arboreum* L.). **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, v. 40, p.177-181, 2004.

SAS/STAT. User´s guide. In: SAS Institute SAS ONlinedoc: Version 8.2, Cary, 2000. CD-Rom

STELLY, D.M.; ALTMAN, D.W.; KOHEL, R. J.; RANGAN, T.S.; COMMISKEY, E. Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus cultures. **Genome**, v.32, p. 762-770, 1989.

SUN, Y.; ZHANG, X.; JIN, S.; LIANG, S. e NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in

wild cotton (*Gossypium Klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 75: 247-253, 2003.

TROLINDER, N.L.; XHIXIAN, C. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. **Plant Cell Reports**, v.8, p. 133-136, 1989.

UMBECK, P.; JOHNSON, G.; BARTON, K.; SWAIN, W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Biotechnology**, v. 5, p.263-266, 1987.

WILKINS, T.A.; RAJASEKARAN, K. e ANDERSON, D.M. Cotton Biotechnology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n.6, p. 511-550, 2000.

WU, J.; ZHANG, X.; NIE, Y.; JIN, S. e LIANG, S. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.). **In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant**, v. 40, p. 371-375, 2004.

ZHANG, B., FENG, R., LIU, F. e WANG, Q.. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 42, p. 9-16, 2001.

#### Comunicado Técnico, 265

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: Luiz Paulo de Carvalho  
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes  
Membros: Cristina Schetino Bastos  
Fábio Akiyoshi Suinaga  
Francisco das Chagas Vidal Neto  
Gilvan Barbosa Ferreira  
José Américo Bordini do Amaral  
José Wellington dos Santos  
Nair Helena Arriel de Castro  
Nelson Dias Suassuna

**Expedientes:** Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes  
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão  
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho  
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho