

Efeito de diferentes concentrações hormonais e antioxidantes sobre a indução de calos em algodão (*G. hirsutum* L.).

SILVA, Kleptura de Oliveira e¹; CÂMARA, Marianne de Melo Arruda²; 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 Desenvolvimento e Meio Ambiente PRODEMA - Subprograma/UFRN. Centro de Biociências/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN. Campus Universitário, Lagoa Nova; Sem N°. CEP: 59072-970, Natal/RN. EMAIL: mariannebio@hotmail.com; 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

A sustentabilidade da agricultura como uma das questões chave na problemática do meio ambiente revela, antes de tudo, a crescente insatisfação com a agricultura moderna; indicando a necessidade social de práticas que, simultaneamente, conservem os recursos naturais e forneçam produtos mais saudáveis. Embora a cultura algodoeira possua imensa aplicabilidade agrônômica, esta é uma cultura muito suscetível ao aparecimento de patogenias que causam reduções significativas na produtividade e na qualidade da fibra do algodão. As perspectivas do uso das técnicas de cultura *in vitro* podem ser integradas como parte da resolução da problemática na produção de algodão, objetivando uma produção mais estável. A viabilização de plantas resistentes a doenças vem obtendo um importante papel, sob o ponto de vista agrônômico. Um sistema eficiente de regeneração de planta *in vitro* caracteriza-se pela rápida e contínua produção de embriões somáticos (Zhang et al, 2000). Segundo Litz et al. (1998), a indução de culturas embriogênicas depende do genótipo, tipo de explante, estágio de desenvolvimento do explante e da composição do meio de cultivo *in vitro*. Um dos entraves na cultura de tecidos *in vitro* é a oxidação fenólica, que é ocasionada pela resposta aos ferimentos no explante, e se manifesta como um escurecimento do tecido vegetal, muitas vezes dificultando o cultivo.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de dois meios de cultura, MS (1962) e Nitch (1974), sob influência dos reguladores de crescimento 2,4-D e 2IP, bem como o emprego dos antioxidantes ácido ascórbico e carvão ativado sobre a indução de calos em três variedades de algodão.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Foram utilizadas sementes dos cultivares de algodoeiro herbáceo, CNPA FACOAL, CNPA BRS 201 e CNPA ITA 96 obtidas da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Algodão(CNPA), no Município de Campina Grande, PB. As sementes passaram por processos de desinfestação em lavagens com etanol 70%, por cinco minutos, e hipoclorito de sódio 2%, por 20 minutos, e quatro lavagens em água destilada e autoclavada, cada enxágüe com duração de cinco minutos. Posteriormente, a fim de germinarem, foram colocadas em frascos contendo água destilada e esterilizada em papel filtro. Após dois dias de sua germinação *in vitro*, porções de hipocótilos de 1 cm de tamanho foram introduzidas em meio de cultura sólido, Murashige & Skoog (1962) e Nitch

(1974), e suplementadas com três concentrações hormonais: C₁ (glicose + 0,1mg/L de 2,4D e 1,0mg/L de 2IP); C₂ (glicose + 0,1mg/L de 2,4D e 1,0mg/L de 2IP e 150mg de ácido ascórbico) e C₃ (glicose + 0,1mg/L de 2,4D e 1,0mg/L de 2IP e 10mg de carvão ativo). Cada tratamento recebeu as três variedades (CNPA FACOAL, CNPA ITA 96 e CNPA BRS 201) com o objetivo de induzir calos. 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. Estas culturas foram analisadas durante 30 dias para a indução de calos. Após quatro semanas, os calos obtidos foram transferidos para meios frescos de mesma composição e suplementação hormonal durante três subcultivos sucessivos visando à manutenção dos calos e observação da oxidação nos tratamentos testados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 unidades experimentais e 3 repetições para todos os tratamentos de indução de calos e diferenciação de brotos, cada uma composta por 1 explante. Os dados analisados são referentes à indução de calos embriogênicos e à taxa de oxidação polifenólica, diferenciados, mediante a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos calos embriogênicos em todos os tratamentos utilizados, para as três variedades testadas, o que possivelmente pode ser atribuído aos genótipos da espécie estudada, associado aos tipos de reguladores de crescimento. Resultados semelhantes foram descritos por Carvalho et al. (2001) quando obtiveram a indução de calos embriogênicos e não-embriogênicos utilizando suplementações de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2-isopenteniladenina (2IP) em meio básico MS. Pesquisas sobre embriogênese somática apontam o uso de 2,4-D para a cultura de tecidos em *Gossypium hirsutum*, como fizeram Trolinder e Goodin (1987), que observaram embriões somáticos em suspensões celulares de oito cultivares de *G. hirsutum* cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 2,4-D e cinetina.

Para a indução de calos em todas as variedades estudadas, as suplementações C₁ e C₂ adicionadas ao meio básico MS não determinaram respostas muito diferentes entre si; mas a suplementação C₃ determinou baixo percentual de calogênese na variedade CNPA FACUAL (Figura 1). A observação de diferentes respostas por parte dos genótipos utilizados em nosso estudo, as quais surgiram 60 dias após a inoculação, vai ao encontro das sugestões de John e McStewart (1992) e Bajaj e Gill (1992) que afirmam que genótipos diversos respondem de forma diferenciada à organogênese *in vitro*. Para Carvalho et al. (2001), a presença dessas estruturas pode indicar a fase inicial de embrióides. Os calos obtidos nos meios MS e Nitch, com as suplementações C₂ e C₃, apresentaram taxas de oxidação maiores que as observadas nos calos cultivados com a suplementação C₁, sem adição dos antioxidantes (Figura 2). Possivelmente, os antioxidantes, absorvem os reguladores de crescimento e outras substâncias importantes no desenvolvimento dos calos. Para Kohlenbach e Wernicke (1978), o carvão ativado exerce função fundamental no meio de cultura, impedindo a incidência de luz na base do explante, reduzindo a oxidação e absorvendo os compostos tóxicos presentes no ágar.

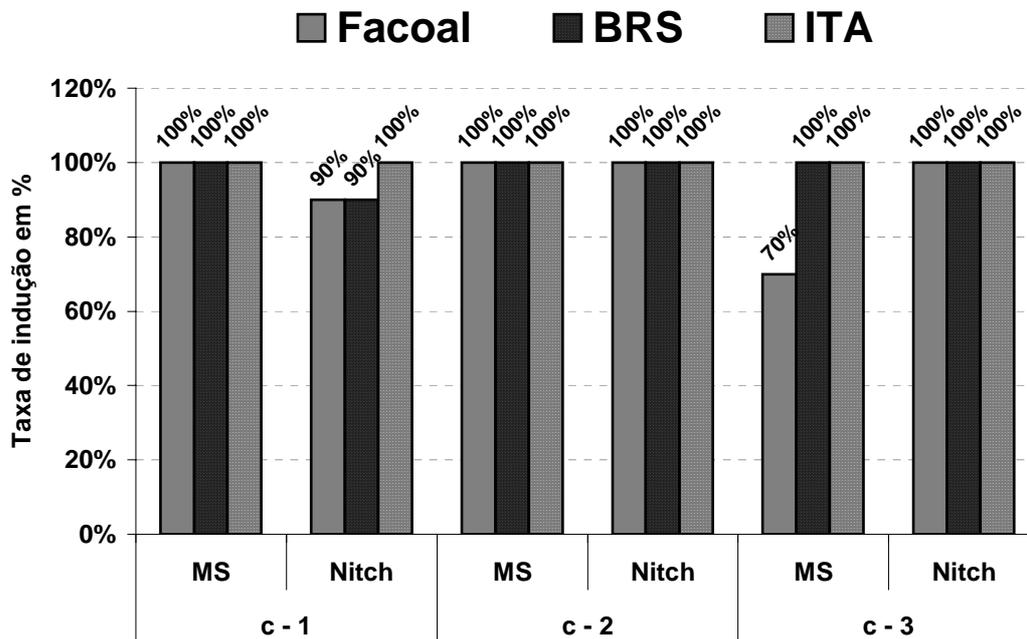


Figura 1 – Percentagem de indução de calos de algodão após 90 dias de avaliação, sob o efeito de três suplementações, nas variedades CNPA ITA 96, CNPA BRS 201 e CNPA FACUAL.

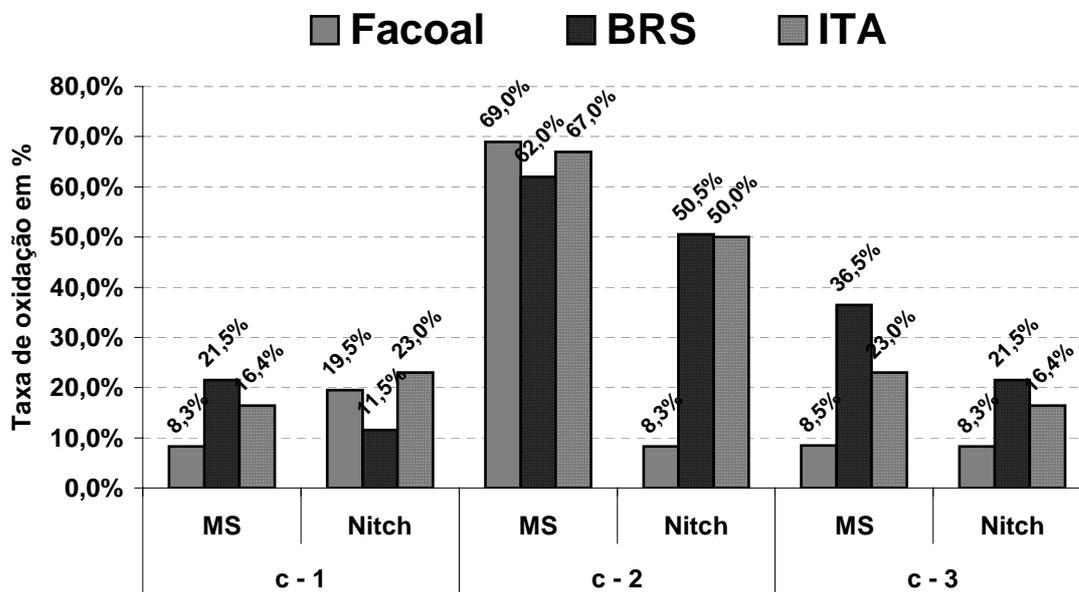


Figura 2 – Percentagem da taxa de oxidação na formação de calos de algodão, nas variedades CNPA FACUAL, CNPA ITA 96 e CNPA BRS 201, em três concentrações hormonais nos meios de cultura.

CONCLUSÕES

De forma geral, a aplicação das suplementações hormonais combinadas aos meios Nitch e MS propiciou percentuais satisfatórios na indução de calos em *G. hirsutum*. Entretanto, a adição do carvão ativado não reduziu de forma satisfatória as taxas de oxidação. A implicação resultante da oxidação nos leva a recomendar o uso de outros tipos de antioxidantes na indução de calos desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAJAJ, Y. P. S.; GILL, M. S. Micropropagation of cotton (*Gossypium species*). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation III**. [S. I.]: Berlin Heidelberg-Springer-Verlag, v. 19, p. 484-504, 1992.

CARVALHO, J. M. F. C.; BENITO, E. G.; PEREZ, C. Análise histológica de calogênese e embriogênese das cultivares de algodão CNPA Precoce 2 e Coker 312. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 5, n.1, p. 235-239, jan./abr. 2001.

JOHN, M. E.; McSTEWART, J. Genes for jeans: biotechnological advance in cotton. **Tibtech**, OECD DEVELOPMENT CENTRE, v. 10, p. 165-170, 1992.

KOGLNBACH, H. W.; WERNICKE, W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in the function of active carbon in anther culture. **Zetschirift fuer Pflansenphysiologie**, v. 86, p. 463-472, 1978.

LITZ, R. E., CHAVEZ, V. C.; MOON, P.A. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. In: MANTELL, S. H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C. et al. **Recent advances in biotechnology for conservation and management**. Stockholm: International Foundation for Science, p. 232-243, 1998.

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:

Gossypium hirsutum, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 2IP (2-isopenteniladenina).