

DEIVID ALMEIDA DA COSTA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ALGODÃO (*Gossypium
hirsutum* L. cv. BRS – 187 - 8H)**

Recife

2007

DEIVID ALMEIDA DA COSTA

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ALGODÃO (*Gossypium*
hirsutum L. cv. BRS – 187 - 8H)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. TEREZINHA RANGEL CAMARA.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. CLÁUDIA ULISSES

Recife

Pernambuco – Brasil
Fevereiro - 2007

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ALGODÃO

(Gossypium hirsutum L. cv. BRS – 187 - 8H)

DEIVID ALMEIDA DA COSTA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: ____/____/____.

ORIENTADOR:

Prof^ª. Dr^ª. Terezinha Rangel Camara – UFRPE

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Luiza Suely – UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Lilia Willadino – UFRPE

Dr. Júlio Zoé de Brito – IPA

Recife
Pernambuco – Brasil
Fevereiro - 2007

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

C837e Costa, Deivid Almeida da
Embriogênese somática em algodão *Gossypium hirsutum* L. cv. BRS – 187 – 8H) / Deivid Almeida da Costa. --
2007.
88 f. : il.

Orientadora: Terezinha Rangel Camara
Dissertação (Mestrado em Agronomia – Melhoramento
Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 631.53

1. Algodão
2. Embriogênese somática
3. Regulador de crescimento
4. Calos embriogênicos
5. Estruturas pré-embriogênicas
6. Estresse
7. Isoenzimas
8. Sistema antioxidativo
- I. Camara, Terezinha Rangel
- II. Título

DEDICO

Aos meus amados pais, Janilza e Pádua

Aos meus irmãos Bruno, Mariana e Adriano. E a Monik

Pelo amor que nos une e pela força na conquista dos meus sonhos.

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva o homem a se curvar diante da divindade”. (Voltaire)

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Grande Arquiteto do Universo, por minha existência.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos por 2 anos.

À Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Rangel Câmara, pela confiança, apoio, incentivo, amizade e orientação.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Melhoramento Genético de Plantas que, de maneira muito especial, contribuíram em minha formação.

Aos colegas de turma: Clébia, Jackeline, Liliane, Mário, Roberto, Silvokléio, Lidinalva e Marcelo, pelas lutas e vitórias conquistadas, pela amizade e momentos de alegria.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos vegetais (UFRPE); Flávia, Jéferson, Gemima, Aurenivia, Vitor, Luiza, Marta, Nise, Patrícia C., Patrícia P., Gilberto, Amanda, Wellington, em especial a Emmanuel Cabral pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho, Valeu pessoal!

À Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos e a EMBRAPA-CNPA, pela gentileza em ceder as sementes de algodão utilizadas no trabalho e ainda pelo apoio financeiro recebido, concedidos pelas fundações FIALGO (Goiás), Fundeagro (Bahia) e pelo Banco do Nordeste do Brasil que ampara suas pesquisas.

À Dr^a Luiza Suely pela grande ajuda na realização deste trabalho.

À colega Jackeline Gadé, pela ajuda nas análises isoenzimáticas.

À Dr^a Cláudia Ulisses pela orientação e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a Lilia Willadino pelo apoio, incentivo e ajuda na realização deste trabalho,
obrigado!

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para elaboração deste trabalho,
meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO II – RESPOSTA MORFOGÊNICA DO ALGODÃO A VÁRIOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

Páginas

Figura 1. (A-B) Explantes de hipocótilo aos 30 dias de cultivo em meio CIM (2,0 mg L⁻¹ de ANA, 1,0 mg L⁻¹ de cinetina e 30 g L⁻¹ glicose - SAKHANOKHO *et al*, 2001). Em (B) é possível observar formação de raízes. (C-D) Explantes de cotilédone após 30 dias de cultivo no meio CIM. Observa-se uma maior formação de raiz e menor formação de calo nos explantes de cotilédone, quando comparados com os de hipocótilo. [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 2: Aspecto dos explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H após 40 dias de cultivo em meio de indução de calo embriogênico, constituído pelo meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L⁻¹). Nas linhas, de cima para baixo, níveis crescentes de cinetina (K0; K0,1; K0,3; K0,5 e K1,0 mg L⁻¹) combinados com as mesmas doses de 2,4-D crescente da esquerda para direita (D0; D0,1; D0,3; D0,5; D1,0). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura3: Aspecto do explante aos 28 dias de cultivo em meio MSB com 0,1 mg L⁻¹ de 2iP e 0,1 mg L⁻¹ de 2,4D, apresentando formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 4: Aspecto do explante de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H aos 28 dias de cultivo em meio MSB com 0,3 mg L⁻¹ Cinetina e 0,1 mg L⁻¹ de Picloran, apresentando formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 5. Ocorrência de rizogênese durante a indução de embriões. Estágios de desenvolvimento da raiz (A-D) no meio MSB + 0,05 mg.L⁻¹ de Zeatina (MIE-1). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 6. Aspecto dos calos embriogênicos, após 30 dias, nos meios MSB (A); MIE-1 (B); MIE-4 (C) e MIE-5 (D). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 7. Estruturas globulares, após 40 dias em meio MIE-4. Foto geral do calo mostrando 4 estruturas globulares (A); Detalhe da estrutura globular no calo embriogênico (B e C); Estrutura globular isolada e cultivada em meio MIE-4 (D). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 8. Estruturas pré-embriogênicas após 51 dias no meio MIE-4 (B, C, D). Setas vermelhas mostrando a Presença de 5 estruturas globulares nos calos cultivados em MIE-4 após 51 dias (A). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 1. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, verde-amarelados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L^{-1}). [..Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 2. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram oxidação após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L^{-1}). [.....Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 3. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, amarelo-esverdeados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e 2iP (mg L^{-1}). [.Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 4. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, verde-amarelados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de Cinetina e Picloran (mg L^{-1}). [...Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 5. Média em gramas, por explante, do peso dos calos amarelo-esverdeado friáveis obtidos nos meios $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4D; 3 mg L^{-1} Cinetina e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Picloran; MSB1; MCIM (MISHRA *et al.*, 2003) e CIM (SAKHANOKHO *et al.*, 2001). [..Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 6. Gráfico de similaridade entre os meios de cultivo, com relação a produção de calos embriogênicos em termos de matéria fresca. [.....Erro: Origem da referência não encontrada](#)

CAPÍTULO III – INFLUÊNCIA DO ESTRESSE NA CALOGÊNESE DO ALGODÃO E A EXPRESSÃO DE ISOENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Figura 1. Aspecto dos explantes aos 28 dias de cultivo, nos diferentes meios e condições de cultivo. (A) Explante após 6 dias no MSB + FeEDTA(5X) e 22 dias no meio MSB; observa-se a ausência de calos e oxidação do explante. (B) Explante no meio MSB, sem formação de calos. (C) Explantes nos meios MSB1-Escuro: houve formação de calos friáveis, mas estes eram translúcidos e compactos (seta azul) ou brancos duros (seta verde). (D, E, F) Calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha) produzidos nos meios MSB1 (com explantes vindos do meio MSB1 FeEDTA 5X), MSB1(3,4 Klx) e MSB1(6,0 Klx). Nesses explantes ocorreu também produção de calos branco duros (seta verde). Barra = 1,0 mm. [...Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 2. Gel eletroforético de isoformas da catalase em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H. As amostras foram extraídas de explantes de cada tratamento e estão numeradas: (1) Meio MSB + FeEDTA(5X); (2) MSB1 + FeEDTA(5X), (3) MSB1(3,4 Klx); (4) MSB1(6,0 Klx); (5) MSB1(Escuro); (6) MSB normal. [.....Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 3. Zimograma das variações enzimáticas de Catalases (CAT) em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H, nos explantes submetidos a diferentes meios e condições de cultivo: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB + FeEDTA (5X), MSB1+FeEDTA (5X), MSB1 Escuro e MSB, durante 28 dias de cultivo. [.....Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 4. Gel eletroforético de isoformas da Peroxidase (Po) em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H, mostrando 2 padrões de bandas (Perx. 1 e Perx. 2). As amostras foram extraídas de explantes de cada tratamento e estão numeradas: (1) Meio MSB + FeEDTA 5X, (2) MSB1 + FeEDTA 5X, (3) MSB1 (3,4 Klx), (4) MSB1 (6,0 Klx), (5) MSB1 Escuro, (6) MSB normal. [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Figura 5. Zimograma das variações enzimáticas de Peroxidase (PO) em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H, nos explantes submetidos a diferentes meios e condições de cultivo: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB + FeEDTA (5X), MSB1+FeEDTA (5X), MSB1 Escuro e MSB, durante 28 dias de cultivo. [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 1. Porcentagem de explantes, na cultivar de algodão BRS-187-8H, que produziram calos embriogênicos nos meios MSB, MSB+FeEDTA(5X), MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB1(Escuro) e MSB1 FeEDTA (5X) utilizados para indução de calos embriogênicos. [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

Gráfico 2. Peso médio da matéria fresca dos calos após 28 dias de cultivo dos segmentos de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H nos meios de indução de calos: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB1+FeEDTA(5X) e MSB1 (Escuro). [Erro: Origem da referência não encontrada](#)

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II – RESPOSTA MORFOGÊNICA DO ALGODÃO A VÁRIOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS

	Páginas
Tabela 1. Tratamentos para indução de calos embriogênicos constituídos a partir de combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento cinetina (K) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (D).....	41
Tabela 2. Tratamentos para indução de calos embriogênicos constituídos a partir de combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2-isopenteniladenina (2-iP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	42
Tabela 3. Tratamentos para indução de calos embriogênicos constituídos a partir de combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento cinetina e picloran	42
Figura 1. (A-B) Explantes de hipocótilo aos 30 dias de cultivo em meio CIM (2,0 mg L-1 de ANA, 1,0 mg L-1 de cinetina e 30 g L-1 glicose - SAKHANOKHO et al, 2001). Em (B) é possível observar formação de raízes. (C-D) Explantes de cotilédone após 30 dias de cultivo no meio CIM. Observa-se uma maior formação de raiz e menor formação de calo nos explantes de cotilédone, quando comparados com os de hipocótilo.....	43
Figura 2: Aspecto dos explantes de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H após 40 dias de cultivo em meio de indução de calo embriogênico, constituído pelo meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L-1). Nas linhas, de cima para baixo, níveis crescentes de cinetina (K0; K0,1; K0,3; K0,5 e K1,0 mg L-1) combinados com as mesmas doses de 2,4-D crescente da esquerda para direita (D0; D0,1; D0,3; D0,5; D1,0).	44
Gráfico 1. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, verde-amarelados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L-1).....	45
Gráfico 2. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H que apresentaram oxidação após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L-1).....	46
Gráfico 3. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, amarelo-esverdeados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e 2iP (mg L-1).....	47
Figura3: Aspecto do explante aos 28 dias de cultivo em meio MSB com 0,1 mg L-1 de 2iP e 0,1 mg L-1 de 2,4D, apresentando formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha).....	47

Gráfico 4. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, verde-amarelados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de Cinetina e Picloran (mg L ⁻¹).....	48
Figura 4: Aspecto do explante de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H aos 28 dias de cultivo em meio MSB com 0,3 mg L ⁻¹ Cinetina e 0,1 mg L ⁻¹ de Picloran, apresentando formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha).....	49
Figura 5. Ocorrência de rizogênese durante a indução de embriões. Estágios de desenvolvimento da raiz (A-D) no meio MSB + 0,05 mg.L ⁻¹ de Zeatina (MIE-1).....	50
Gráfico 5. Média em gramas, por explante, do peso dos calos amarelo-esverdeado friáveis obtidos nos meios 0,1 mg L ⁻¹ 2iP e 0,1 mg L ⁻¹ de 2,4D; 3 mg L ⁻¹ Cinetina e 0,1 mg L ⁻¹ de Picloran; MSB1; MCIM (MISHRA et al., 2003) e CIM (SAKHANOKHO et al., 2001).....	51
Gráfico 6. Gráfico de similaridade entre os meios de cultivo, com relação a produção de calos embriogênicos em termos de matéria fresca.....	52
Figura 6. Aspecto dos calos embriogênicos, após 30 dias, nos meios MSB (A); MIE-1 (B); MIE-4 (C) e MIE-5 (D).....	52
Figura 7. Estruturas globulares, após 40 dias em meio MIE-4. Foto geral do calo mostrando 4 estruturas globulares (A); Detalhe da estrutura globular no calo embriogênico (B e C); Estrutura globular isolada e cultivada em meio MIE-4 (D).....	54
Figura 8. Estruturas pré-embriogênicas após 51 dias no meio MIE-4 (B, C, D). Setas vermelhas mostrando a Presença de 5 estruturas globulares nos calos cultivados em MIE-4 após 51 dias (A).....	55
Figura 1. Aspecto dos explantes aos 28 dias de cultivo, nos diferentes meios e condições de cultivo. (A) Explante após 6 dias no MSB + FeEDTA(5X) e 22 dias no meio MSB; observa-se a ausência de calos e oxidação do explante. (B) Explante no meio MSB, sem formação de calos. (C) Explantes nos meios MSB1-Escuro: houve formação de calos friáveis, mas estes eram translúcidos e compactos (seta azul) ou brancos duros (seta verde). (D, E, F) Calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha) produzidos nos meios MSB1 (com explantes vindos do meio MSB1 FeEDTA 5X), MSB1(3,4 Klx) e MSB1(6,0 Klx). Nesses explantes ocorreu também produção de calos branco duros (seta verde). Barra = 1,0 mm.....	68
Gráfico 1. Porcentagem de explantes, na cultivar de algodão BRS-187-8H, que produziram calos embriogênicos nos meios MSB, MSB+FeEDTA(5X), MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB1(Escuro) e MSB1 FeEDTA (5X) utilizados para indução de calos embriogênicos.....	69
Gráfico 2. Peso médio da matéria fresca dos calos após 28 dias de cultivo dos segmentos de hipocótilo de algodão <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H nos meios de indução de calos: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB1+FeEDTA(5X) e MSB1 (Escuro).....	70
Figura 2. Gel eletroforético de isoformas da catalase em <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H. As amostras foram extraídas de explantes de cada tratamento e estão numeradas: (1) Meio MSB + FeEDTA(5X); (2) MSB1 + FeEDTA(5X), (3) MSB1(3,4 Klx); (4) MSB1(6,0 Klx); (5) MSB1(Escuro); (6) MSB normal.....	72
Figura 3. Zimograma das variações enzimáticas de Catalases (CAT) em <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H, nos explantes submetidos a diferentes meios e condições de cultivo: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB + FeEDTA (5X), MSB1+FeEDTA (5X), MSB1 Escuro e MSB, durante 28 dias de cultivo.....	72
Figura 4. Gel eletroforético de isoformas da Peroxidase (Po) em <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H, mostrando 2 padrões de bandas (Perx. 1 e Perx. 2). As amostras foram extraídas de explantes de cada tratamento e estão numeradas: (1) Meio MSB + FeEDTA 5X, (2) MSB1 + FeEDTA 5X, (3) MSB1 (3,4 Klx), (4) MSB1 (6,0 Klx), (5) MSB1 Escuro, (6) MSB normal.....	73
Figura 5. Zimograma das variações enzimáticas de Peroxidase (PO) em <i>Gossypium hirsutum</i> cv BRS – 187 – 8H, nos explantes submetidos a diferentes meios e condições de cultivo:	

MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB + FeEDTA (5X), MSB1+FeEDTA (5X), MSB1 Escuro e MSB, durante 28dias de cultivo.....	74
---	----

SUMÁRIO

	Paginas
<u>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</u>	<u>vii</u>
<u>LISTA DE TABELAS.....</u>	<u>x</u>
<u>SUMÁRIO.....</u>	<u>xii</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>xiii</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>xv</u>
<u>CAPÍTULO I.....</u>	<u>16</u>
<u>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</u>	<u>17</u>
<u>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</u>	<u>20</u>
<u>2.1 A cultura do algodão.....</u>	<u>20</u>
<u>2.2 Embriogênese somática em algodão.....</u>	<u>24</u>
<u>2.3 O estresse e a morfogênese.....</u>	<u>27</u>
<u>2.4 As enzimas antioxidativas e sua relação com a morfogênese in vitro.....</u>	<u>28</u>
<u>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>31</u>
<u>CAPÍTULO II.....</u>	<u>35</u>

<u>Resposta morfogênica do algodão a vários reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos.....</u>	<u>36</u>
<u>Morphogenic response of the cotton to several growth regulators in the induction of embryogenic callus.....</u>	<u>37</u>
<u>Introdução.....</u>	<u>38</u>
<u>Material e Métodos.....</u>	<u>40</u>
<u>Resultados e discussão.....</u>	<u>42</u>
<u>Resposta do tipo de explante à indução de calos.....</u>	<u>42</u>
<u>Efeito da cinetina e do 2,4-D na indução de calos embriogênicos.....</u>	<u>43</u>
<u>Efeito do 2iP e do 2,4-D na indução de calos embriogênicos.....</u>	<u>46</u>
<u>Efeito da Cinetina e Picloran na indução de calos embriogênicos.....</u>	<u>48</u>
<u>Rizogênese versus calogênese.....</u>	<u>49</u>
<u>Matéria fresca dos calos embriogênicos nos meios de indução.....</u>	<u>50</u>
<u>Meio de indução de embriões (MIE).....</u>	<u>52</u>
<u>Referências.....</u>	<u>56</u>
<u>CAPÍTULO III.....</u>	<u>59</u>
<u>Influência do estresse na calogênese do algodão e a expressão de isoenzimas do sistema antioxidativo.....</u>	<u>60</u>
<u>Influence of the stress in cotton callus formation and isozymic antioxidant system expression.....</u>	<u>61</u>
<u>Introdução.....</u>	<u>62</u>
<u>Material e Métodos.....</u>	<u>64</u>
<u>Resultados e Discussão.....</u>	<u>67</u>
<u>Indução de calos embriogênicos.....</u>	<u>67</u>
<u>Eletroforese de isoenzimas antioxidativas.....</u>	<u>70</u>
<u>Conclusões.....</u>	<u>74</u>
<u>Referências.....</u>	<u>75</u>
<u>ANEXOS.....</u>	<u>78</u>

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM ALGODÃO

(*Gossypium hirsutum* L. cv. BRS – 187 - 8H)

RESUMO

A embriogênese somática é uma técnica de cultura de tecidos vegetais com diversos potenciais de aplicação, como na propagação clonal de plantas, na regeneração de células transformadas geneticamente e nos estudos básicos dos eventos moleculares e bioquímicos e

morfológicos que ocorrem durante a embriogênese. Apesar dos diversos trabalhos relatando embriogênese somática em algodão, vários problemas ainda persistem na regeneração via embriogênese e a maioria dos trabalhos é com a linha cocker, devido a recalcitrância do algodão a embriogênese somática. Deste modo, o presente estudo foi concebido com o intuito de analisar a resposta morfogênica do algodão a vários reguladores de crescimento e agentes estressantes durante a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos, correlacionando a calogênese com a expressão de isoformas do sistema antioxidativo. Para indução dos calos embriogênicos utilizou-se sementes desinfestadas da cultivar de algodão BRS – 187 – 8H. Os meios de indução de calos embriogênicos (MICE) utilizados consistiram no meio MSB acrescido de varias combinações e concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D; Cinetina, Picloram e 2-iP. Já para conversão dos calos embriogênicos em embriões, utilizou-se o meio de indução de embriões (MIE) que consiste no meio MSB e MSB acrescido de zeatina, ou diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 , ou acrescido de L-glutamina; asparagina; espermina; espermidina. Os dados obtidos mostram que entre os MICE testados, o meio contendo $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina (meio MSB1) e o meio MCIM mostraram as maiores médias na produção de calos embriogênicos por explante. Entre os MIE, o MIE-1 apresentou melhor proliferação dos calos embriogênicos. Contudo, a formação de estruturas globulares e embriogênicas só foi visualizada nos calos embriogênicos formados em meio MSB1 e transferidos para meio MSB e subcultivados em meio MIE-4. Concluiu-se então que diferentes reguladores podem induzir a formação de calos embriogênicos na cultivar BRS – 187 – 8H, e a supressão dos reguladores de crescimento favorece o surgimento de estruturas globulares e pré-embriogênicas. Nos experimentos da influência do estresse na calogênese e a expressão de isoenzimas do sistema antioxidativo, utilizou-se para a indução de calos embriogênicos a combinação do meio MSB e MSB1 com duas concentrações de FeEDTA: a concentração padrão do meio MS; e uma concentração cinco vezes maior. E foi

estabelecido três regimes de intensidade luminosa: escuro; 3,4 Klx e 6,0 Klx. Calos embriogênicos foram obtidos nos meios MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx) e MSB1+FeEDTA(5X). Análises de eletroforese de isoenzimas da catalase e peroxidase mostraram variação na intensidade das bandas. Os resultados obtidos permitiram concluir que formação de calos embriogênicos é dependente da ação de reguladores de crescimento e da presença de luz, e que as isoformas de catalase e peroxidase apresentam padrão similar e estão relacionadas com o aspecto embriogênico dos calos.

Palavras-chave: Algodão, embriogênese somática, reguladores de crescimento, calos embriogênicos, estruturas pré-embriogênicas, estresse, isoenzimas, sistema antioxidativo.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COTTON

(*Gossypium hirsutum* L. cv. BRS – 187 - 8H)

ABSTRACT

The somatic embryogenesis is a technique of plant tissue culture with several application potentials, as in the clonal propagation of plants, in the regeneration of transformed cells and in the basic studies of the molecular, biochemical and morphologic events that happen during

the embryogenesis. In spite of the several works reporting somatic embryogenesis in cotton, several problems still persist in the regeneration through embryogenesis. The most of the works is with the line cocker, due to the fact of the cotton to be recalcitrant for the somatic embryogenesis. This way, the present study was conceived with the intention of analyzing the morphogenic response of the cotton to several growth regulators and stressful agents during the induction of embryogenic callus and somatic embryos, correlating the callus production with the antioxidant enzymes expression. For induction of the embryogenic callus, hypocotyl of germinated cotton (BRS – 187 – 8H) surface-sterilized seeds was used. The embryogenic callus induction medium (MICE) consisted of the MSB medium with different combinations and concentrations of 2,4-D, Kinetin, 2iP and Picloram. For conversion of embryogenic callus, it was used the embryo induction medium (MIE) that consists of MSB medium and MSB supplemented with zeatin; L-glutamine, asparagine; espermine, espermidine or different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 . The results show that among the MICE tested, the medium with $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D and $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ Kinetin (MSB1 medium) and the MCIM medium showed the largest average in the production of embryogenic callus by explant. Explants in the MIE-1 presented the best proliferation of the embryogenic callus. However, the formation of globular and embryogenic structures was only visualized in the embryogenic callus formed in MSB1 medium, which were transferred for MSB medium and subcultivated in MIE-4 medium. It was concluded that different growth regulators can induce the formation of embryogenic callus in cotton cultivar BRS – 187 – 8H and the suppression of the growth regulators favors the appearance of globular and pre-embryogenic structures. In the experiments of the influence of the stress in cotton callus formation and the isozymic antioxidant system expression, it was used for induction of embryogenic callus, the combination of MSB and MSB1 medium with two concentrations of FeEDTA: the concentration standard of the MS medium; and a concentration five times larger. It was

established three regimes of luminous intensity: darkness; 3,4 Klx and 6,0 Klx. Embryogenic callus were obtained on the MSB1 (3,4 Klx), MSB1 (6,0 Klx) and MSB1+FeEDTA (5X) medium. The electrophoretic system of the catalase and peroxidase showed variation in the intensity of the bands. The results show that the embryogenic callus formation dependent of the action of growth regulators and of the light presence, and the isozymic standards of catalase and peroxidase present similar pattern and they are related with the embryogenic aspect of the calluses.

Key words: Cotton, somatic embryogenesis, growth regulators, embryogenic callus, pre-embryogenic structures, stress, .isozymic antioxidant system.



CAPÍTULO I

Introdução geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

O algodão é a mais importante fibra têxtil do mundo e é, também, a segunda maior fonte de óleo vegetal (MORESCO, 2003). No Semi-árido nordestino o algodão herbáceo (*G. hirsutum* L. raça latifolium Hutch.) foi, e ainda é, a principal cultura cultivada, especialmente, por pequenos e médios produtores. Como no Nordeste brasileiro o cultivo do algodão utiliza a mão-de-obra familiar, a cultura é de grande importância social e econômica, pois muito contribui para a geração de ocupação e fixação de mão de obra no meio rural e para a distribuição de renda na região. Apesar disso, diversas doenças vem causando prejuízo a cotonicultura nordestina como a murcha de fusarium; a ramulose, mancha de alternaria, falso oídio, míldio areolado ou mancha de ramularia (ARAÚJO, *et al.*, 2003). Com relação às pragas, o bicudo-do-algodoeiro é de grande importância em todo o Brasil, causando prejuízos por reduzir a produtividade da cultura (DEGRANDE *et al.*, 2002).

Uma das alternativas para resolver os problemas das doenças e pragas é o melhoramento genético. Contudo, os programas de melhoramento tradicionais utilizam o retrocruzamento para incorporar genes selvagens em um genótipo desejável, esta estratégia não tem expandido a diversidade genética (COTTON CROP GERMPLASM COMMITTEE, 1997). Devido a necessidade de ampliar essa diversidade genética e o *pool* de genes, os programas de melhoramento genético do algodão estão, cada vez mais, voltando-se para a aplicação de metodologias de biologia molecular para a criação e a conservação de germoplasmas (MISHRA *et al.*, 2003).

Um sistema de cultura de tecidos bem estabelecido é fundamental para regenerar as células transformadas geneticamente (SAKHANOKHO *et al.*, 2001). As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* e apresenta-se como uma ferramenta importante na seleção e na multiplicação de genótipos. Entre as técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, a embriogênese somática aparece como um importante método para propagação de plantas elite *in vitro*, em

larga escala, sendo também uma estratégia para estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião, bem como para produção de plantas transgênicas e sementes sintéticas (GUERRA *et al.*, 1998; SAKHANOKHO *et al.*, 2001).

A regeneração de embriões somáticos de algodão já foi relatada em diversos trabalhos (ZHANG *et al.*, 1996; GONZÁLEZ-BENITO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2001; SAKHANOKHO *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2004; GANESAN & JAYABALAN, 2004; HUSSAIN *et al.*, 2005; IKRAM-UL-HAQ, 2005). Ainda assim, mesmo com a capacidade de regeneração melhorada, permanecem dificuldades na obtenção de embriões em algodão (ZHANG *et al.*, 2000; IKRAM-UL-HAQ, 2005).

A embriogênese somática do algodão é altamente genótipo-dependente (ZHANG *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2003; GANESAN & JAYABALAN, 2004; RAUF & HAFEEZ-UR-RAHMAN, 2005). Apenas um limitado número de variedades possui protocolos para regenerar plantas por essa via, e a recalcitrância do algodão para a cultura de tecidos tem atrasado o desenvolvimento de algodão transgênico e estreitado sua base genética. A identificação de cultivares de algodão regeneráveis é portanto, muito importante para acelerar o desenvolvimento de algodões transgênicos comerciáveis (SAKHANOKHO *et al.*, 2001).

Feher *et al.* (2003) sugerem que a ativação simultânea por meio de auxinas e de respostas ao estresse pode ser um evento chave na adaptação celular, causando reprogramação metabólica e fisiológica, que resulta na competência embriogênica de células. Vários trabalhos relatam uma ligação entre a atividade de enzimas do sistema antioxidativo com a capacidade embriogênica de calos e tecidos vegetais (LIBIK *et al.*, 2005; GANESAN e JAYABALAN, 2004).

Frente ao exposto, esta pesquisa teve por objetivo reunir informações sobre a resposta embriogênica à ação de reguladores de crescimento, poliaminas e indutores de estresse oxidativo em algodão. Para tanto, foram feitas avaliações quantitativas do processo de

calogênese e embriogênese somática (formação e regeneração de embriões somáticos em plantas), correlacionando com a atividade do sistema antioxidativo, mediante análises da atividade e da presença de isoformas de enzimas antioxidativas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cultura do algodão

O algodoeiro é uma dicotiledônea da família Malvaceae, gênero *Gossypium*, com cerca de 50 espécies, das quais, quatro são cultivadas, sendo duas tetraplóides (*G. hirsutum* L. e *G. barbadense* L., $2n = 4x = 52$) e duas diplóides (*G. arboretum* L. e *G. herbaceum* L., $2n = 2x = 26$). As espécies alotetraplóides correspondem a cerca de 95% da produção mundial de algodão, sobretudo as espécies cultivadas *G. hirsutum* (90%) e *G. barbadense* (5%).

No Brasil podem ser encontradas três espécies: *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L. e *G. mustelinum* Miers ex Watt. (BARROSO *et al.*, 2005). O *G. hirsutum* é representado por duas raças exóticas, a *G. hirsutum* r. *latifolium* Hutch., conhecida como algodão herbáceo ou anual, que é nativa do México e amplamente cultivada no Brasil, estando presente praticamente apenas na forma de cultivares; e a *G. hirsutum* r. *marie galante* (Watt) Hutch., conhecida como algodoeiro mocó, arbóreo ou perene, originária das Antilhas e introduzida durante o período colonial (MOREIRA e SANTOS, 1994).

A espécie *G. barbadense* tem como centro de domesticação o norte do Peru e sul do Equador e foi introduzida por povos pré-colombianos (MOREIRA e SANTOS, 1994). O seu uso como planta têxtil difundiu-se entre os colonizadores, mas entrou em decadência com a disseminação das duas raças de *G. hirsutum*.

O *G. mustelinum* é a única espécie nativa do Brasil e sua distribuição é restrita ao semi-árido nordestino, onde existem três pequenas populações, duas no Estado da Bahia e uma no Rio Grande do Norte (FREIRE, 2000).

O cultivo dos algodoeiros arbóreo (*G. hirsutum* L.r. *marie galante* Hutch.), herbáceo, (*G. hirsutum* L.r. *latifolium* Hutch.) e dos derivados do cruzamento dessas espécies de algodoeiros, apresenta-se como uma das principais alternativas agrícolas para o Nordeste brasileiro, da mesma forma que o cultivo do algodão herbáceo é uma das culturas mais rentáveis nas demais regiões do país (AMARAL, *et al.*, 2004).

O algodão figura como a mais importante fibra têxtil do mundo e é, também, a segunda maior fonte de óleo vegetal (MORESCO, 2003). Além de fibrosa e oleaginosa, é uma planta produtora de proteína de qualidade, que pode ser utilizada como suplemento protéico para animais e para o homem. O principal subproduto do algodão é o óleo comestível que, após ser processado, gera os subprodutos primários, que são o línter, a casca e a amêndoa; os secundários que são representados pela farinha integral, o óleo bruto, a torta e o farelo; e os terciários que são constituídos pelo óleo refinado, a borra e a farinha desengordurada (ARAÚJO, *et al.*, 2003).

No Brasil o algodão é cultivado em 16 Estados, numa área estimada de mais de 960.000 ha. Estima-se um aumento de área entre 12,5% (107,1 mil hectares) e 18,4% (157,8 mil hectares) e um ganho de produção entre 16,2% (270,1 mil toneladas) e 22,6% (377,9 mil toneladas), na safra de 2006/2007 (CONAB, 2006).

No Semi-árido nordestino (que corresponde a mais de 70% do total do Nordeste) o algodão herbáceo (*G. hirsutum* L. raça *latifolium* Hutch.) foi, e ainda é, a principal cultura de pequenos e médios produtores que utilizam a mão-de-obra familiar, sendo então de grande importância social e econômica, pois muito contribui para a geração de ocupação e fixação de mão de obra no meio rural e para a distribuição de renda na região (ARAÚJO *et al.*, 2003).

O algodão produzido no Nordeste, em termos de qualidade intrínseca, é um dos melhores do mundo, com grau de reflectância dos mais elevados, além de fibra de elevada uniformidade de comprimento. As condições climáticas de alta temperatura e baixa umidade

relativa encontradas nas áreas zoneadas para o cultivo do algodoeiro no Nordeste, restringem o desenvolvimento da maioria de fungos e bactérias. Contudo, algumas doenças merecem atenção, por terem potencial de causar maiores prejuízos em condições climáticas excepcionais, como por exemplo: a murcha de fusarium; a ramulose, mancha de alternaria, falso oídio, míldio areolado ou mancha de ramularia (ARAÚJO, *et al.*, 2003).

No que se refere a pragas, o bicudo-do-algodoeiro é o principal problema em praticamente todas as regiões cotonicultoras do Brasil, devido aos sérios prejuízos que causa ao algodoeiro, como a queda dos botões florais, flores e maçãs, reduzindo a produtividade da cultura (DEGRANDE *et al.*, 2002). A busca por cultivares de algodoeiro resistentes às pragas começou no início do século XX, com as primeiras descobertas de características morfológicas mutantes (VIDAL, *et al.*, 2005).

O algodoeiro possui um sistema misto de reprodução, contudo é tratado como planta autógama na condução de programas de melhoramento (JIANG, 2004).

O programa de melhoramento do algodoeiro na Embrapa teve início em 1975 no Centro Nacional de Pesquisa de Algodão/CNPA com a primeira cultivar sendo lançada em 1978 (BR 1). Desde então, cerca de 29 cultivares já foram lançadas, tanto de hábito arbóreo quanto herbáceo, adaptadas às regiões Nordeste e Centro-Oeste (EMBRAPA ALGODÃO, 2001). Entretanto, os programas de melhoramento utiliza o retrocruzamento para incorporar genes selvagens em um genótipo desejável, uma estratégia que não tem expandido a diversidade genética (COTTON CROP GERMPLASM COMMITTEE, 1997). À luz da necessidade de ampliar essa diversidade genética e o *pool* de genes, os programas de melhoramento genético do algodão estão, cada vez mais, voltando-se para a aplicação de metodologias de biologia molecular para a criação e a conservação de germoplasmas (MISHRA *et al.*, 2003). Já se comercializa algodão transgênico, modificado para um ou mais

caracteres que aumentam o desempenho agrônomo da cultura pela tolerância a fatores bióticos e abióticos (WILLMITZER, 1999).

O parque têxtil nacional tem uma demanda de cerca de um milhão de toneladas de plumas. Dentro dessa demanda, 15% estão sendo supridos com importação. O aumento na produção do algodão no Brasil é importante no sentido de equilibrar a balança comercial e atender ao parque têxtil nacional. Novas tecnologias que permitam o aumento na produtividade das lavouras são, portanto, de grande importância (AMARAL, *et al.*, 2004).

Avanços nos estudos de genética molecular e desenvolvimento celular, combinados com o melhoramento tradicional, podem aumentar a eficiência do melhoramento de características agrônomicas importantes para a maioria das culturas (CARNEIRO, 1999).

A transferência de genes para uma planta depende de um sistema de cultura de tecidos bem estabelecido para regenerar plantas a partir de uma simples célula transformada. Mediante a técnica de *Agrobacterium* ou da biobalística, o sucesso da produção de plantas transgênicas depende da geração de um grande número de indivíduos transformados para avaliação e seleção (SAKHANOKHO *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de técnicas eficazes de multiplicação vegetativa *in vitro* constitui-se numa ferramenta importantíssima na seleção e na multiplicação de genótipos, como meio mais eficiente de levar rapidamente a campo os ganhos genéticos de interesse agrônomo, selecionados principalmente para alta produtividade e para resistência às principais pragas e doenças. Entre as técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, a embriogênese somática aparece como um importante método para propagação de plantas elite *in vitro*, em larga escala, sendo também uma estratégia para estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião, bem como para produção de plantas transgênicas e sementes sintéticas (GUERRA *et al.*, 1998; SAKHANOKHO *et al.*, 2001).

2.2 Embriogênese somática em algodão

Embriogênese somática é o termo usualmente empregado para designar o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem ocorrer a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). O desenvolvimento da embriogênese somática pode ser dividido em duas fases: na primeira, denominada de fase de indução, as células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica e se multiplicam como células embriogênicas, enquanto na segunda, denominada fase de expressão, as células embriogênicas exibem a sua competência embriogênica, diferenciando-se em embriões somáticos (JIMÉNEZ, 2001).

Embriões somáticos apresentam características similares aos estágios de desenvolvimento embriogênico de embriões zigóticos, como: estrutura bipolar apresentando meristema do ápice caulinar e radicular, com sistema vascular sem conexão com tecido materno. E ainda, ambos (embriões somáticos e zigóticos) passam por estádios embriogênicos semelhantes: globular, codiforme, torpedo e cotiledonar. (GUERRA *et al.* 1998; GAJ, 2004).

Na embriogênese somática *in vitro* ocorre dois padrões de origem dos embriões. Um padrão é o modelo direto, no qual os embriões somáticos são formados diretamente do tecido-matriz sem a formação de estágios intermediários de calos. O outro padrão, chamado de indireto, ocorre quando o embrião formado é originado de calos oriundos do tecido-matriz (GUERRA *et al.* 1998).

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende de diversos fatores, como o genótipo, tipo de explante, estágio de desenvolvimento e idade, estágio fisiológico da planta matriz, e condições ambientais externas que incluem composição do meio de cultura, luz e temperatura (GAJ, 2004).

Os primeiros pesquisadores a obterem embriogênese somática em algodão foram Price e Smith (1979) sem, contudo, conseguir regenerar os embriões obtidos. Davidonis e Hamilton (1983) foram os pioneiros na regeneração de embriões somáticos a partir de calos com dois anos de idade, da linha Cocker 310. Contudo, o grande tempo de cultura necessário, e a recalcitrância de outras cultivares, estimularam outras pesquisas para desenvolver protocolos de embriogênese somática para o algodão. Diversos trabalhos relatam a regeneração de embriões somáticos a partir de hipocótilos, cotilédones, anteras e embriões zigóticos imaturos (ZHANG *et al.*, 1996; GONZÁLEZ-BENITO *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2001; SAKHANOKHO *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2004 GANESAN & JAYABALAN, 2004 ;HUSSAIN *et al.*, 2005; IKRAM-UL-HAQ, 2005).

Apesar da capacidade de regeneração via embriogênese somática no algodão ter sido melhorada, algumas dificuldades ainda permanecem, como a baixa taxa de formação e de conversão de embriões somáticos em plantas, alta frequência de desenvolvimento de embriões anormais e longo tempo de cultura (ZHANG *et al.*, 2000; IKRAM-UL-HAQ, 2005). Tem-se relatado também a exsudação de metabólitos no meio, pelos explantes, acarretando oxidação dos calos após um curto período de cultura, (GANESAN & JAYBALAN, 2004).

A embriogênese somática do algodão é altamente genótipo-dependente (ZHANG *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2003; GANESAN & JAYABALAN, 2004; RAUF & HAFEEZ-UR-RAHMAN, 2005). Apenas um limitado número de variedades possui protocolos para regenerar plantas por essa via. A maioria das publicações sobre regeneração de algodão envolve a linha Coker 310. Embora facilmente regenerável, a Coker 310 é agronomicamente sem importância. Ela é, entretanto, a base da geração atual de algodões transgênicos comerciais, os quais são obtidos por retrocruzamento da planta Coker 310 transgênica com uma cultivar elite.

Durante a embriogênese somática indireta do algodão ocorre a formação de calos pré-embriogênicos, os quais se constituem como a primeira etapa na indução de embriões. Calos pré-embriogênicos já foram descritos como sendo calos verdes tumorosos, aquosos amarronzados, com crescimento proliferado sendo frouxos com células alongadas e com crescimento proliferado frouxo com pequenas células e citoplasma muito denso (SAKHANOKHO *et al.*, 2001). Contudo, a morfologia dos calos de algodão varia dependendo da combinação dos reguladores de crescimento (TROLINDER e GOODIN, 1988).

Firoozabady e DeBoer (1993), estudando algodão, descrevem os calos embriogênicos obtidos como sendo friáveis de cor creme, granular, meio friáveis, e verde amarelados com estruturas pro-embrióides. Já Zhang *et al.* (2001) classifica, em seu trabalho, calo embriogênico o que possui crescimento rápido, é frouxo e tem cor amarelo claro. Devido a grande variedade na morfologia e coloração dos calos obtidos durante a embriogênese somática do algodão, a correta seleção dos calos pré-embriogênicos constitui-se um dos processos chave na indução de embriões somáticos.

A identificação de cultivares de algodão regeneráveis é muito importante para acelerar o desenvolvimento de algodões transgênicos comerciáveis (SAKHANOKHO *et al.*, 2001). Raufi & Hafeez-ur-Rahman (2005) concluíram que o aumento da capacidade embriogênica e regenerativa, a partir da hibridização de cultivares de algodão regeneráveis e não-regeneráveis, pode ser útil na identificação de cultivares com potencial regenerativo e na incorporação, a longo prazo, da capacidade de regeneração *in vitro* em genótipos agronomicamente importantes e bem adaptados às condições ambientais locais. Entretanto, a recalcitrância do algodão para a cultura de tecidos tem atrasado o desenvolvimento de algodão transgênico e estreitado sua base genética (SAKHANOKHO *et al.*, 2001).

2.3 O estresse e a morfogênese

Embora alguns marcadores genéticos já tenham sido associados com a competência embriogênica, ainda não se sabe como, nem por que, células somáticas podem assumir uma via embriogênica. As fases iniciais dessa via morfogênica são caracterizadas pela indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que a embriogênese somática é uma resposta extrema ao estresse, de células de plantas cultivadas *in vitro* (PASTERNAK *et al.*, 2002).

Ikeda-Iwai *et al.* (2003) obtiveram embriões somático de *Arabidopsis thaliana* a partir de um tratamento de estresse osmótico, que consistia de 6 a 9h de cultura em meio com 0,7 M de mannitol em explantes de meristema apical. A indução de embriogênese somática também já foi obtida a partir de estresse com macrosais em *Panax ginseng* (CHOI *et al.*, 1998). Já Libik *et al.* (2005), Ganesan *et al.* (2004) e Cui *et al.* (1999) correlacionam, em seus trabalhos, o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas estaria relacionado ao estresse oxidativo e esse estresse estaria contribuindo para a aceleração na embriogênese somática.

Outros tipos de estresses já foram relatados como indutores de embriogênese somática em diversas espécies de plantas. Este fato indica que o tratamento estressante induz uma reação comum, onde haveria a indução da expressão de fatores que controlam o início da embriogênese somática (IKEDA-IWAI *et al.*, 2003).

2.4 As enzimas antioxidativas e sua relação com a morfogênese in vitro

A produção pelas plantas de quantidades excessivas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical hidroxiperoxil (HO_2^\cdot), o radical superóxido (O_2^\cdot) e o radical hidróxido (HO^\cdot) são resultantes de algum estresse oxidativo (LIBIK *et al.*, 2005).

O H_2O_2 é um possível intermediário entre o estresse oxidativo e a regeneração de plantas na cultura de tecidos. Essa molécula é um produto de vias metabólicas normais que ocorre no cloroplasto, mitocôndria, peroxisomos e citoplasma (LIBIK *et al.*, 2005; VRANOVÁ *et al.*, 2002). Tem sido proposto que o H_2O_2 atua como um mensageiro secundário envolvido na transdução de sinal e com influência na expressão de mais de 100 genes em plantas (DESIKAN *et al.*, 2001).

As células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível de ROS. As concentrações de ROS podem sofrer alteração, entre outros motivos, pela ação de várias enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (MITTLER, 2002).

Entre as enzimas do sistema antioxidativo destacam-se: as superóxidos dismutases (SOD), as catalases (CAT) e as peroxidases (PO). O produto da atividade da SOD é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é tóxico e precisa ser reduzido à H_2O em reações subseqüentes. Nas plantas, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados, principalmente, pela peroxidase do ascorbato, catalases, e outras peroxidases. Essas últimas são enzimas envolvidas em ligações de polissacarídeos e lignificação da parede celular e na redução da peroxidação dos lipídios de membrana (SREENIVASULU *et al.*, 1999; ÖZTÜRK & DEMIR, 2003; LIBIK *et al.*, 2005).

A embriogênese somática, como outros processos do desenvolvimento vegetal, compreende diversas fases fisiológicas com diferentes requerimentos (KEVERS *et al.*, 2002).

A ativação simultânea, por meio de auxinas e de respostas ao estresse, pode ser um evento chave na adaptação celular, causando reprogramação metabólica e fisiológica, que resulta na competência embriogênica de células somáticas (FEHÉR *et al.*, 2003).

Os marcadores genéticos bioquímicos são produtos da expressão de genes (proteínas ou compostos secundários como os terpenóis). Esses marcadores bioquímicos surgiram entre a década de 60 e 70 e tiveram grande aceitação por permitirem resolver muitas das dificuldades encontradas nos marcadores morfológicos (ALFENAS, 1998).

As isoenzimas se constituem como sendo diferentes formas moleculares de uma enzima catalizando a mesma reação na célula. As isoenzimas são chamadas de aloenzimas quando são controladas por alelos de um único loco, estas são resultado de um evento bioquímico de deleção, adição ou substituição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo, afetando a sua carga elétrica e, conseqüentemente, a sua mobilidade durante a eletroforese (ALFENAS, 1998).

Após a separação das isoenzimas por eletroforese, ocorre então a identificação por meio de reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Nessas reações químicas ocorre a reação *in vitro* da enzima com os substratos e cofatores necessários, formando assim, produtos coloridos e insolúveis que permitem identificar exatamente a sua posição no gel (ALFENAS, 1998).

O polimorfismo gerado pela variabilidade dos padrões enzimáticos de uma população é atribuída à segregação genética, e constitui uma importante fonte de marcadores genéticos apresentando as seguintes vantagens: permitem a análise de vários loci simultaneamente; os alelos de cada locus são codominantes, permitindo a identificação de heterozigotos; e medem a variabilidade em nível mais próximo do DNA do que outras características fenotípicas, pois constituem um produto direto da ação gênica (ALFENAS, 1998).

Libik et al. (2005) relatam a determinação da atividade de superóxido desmutase e catalase através da eletroforese em calos embriogênicos e embriões somáticos de *Mesembryanthemum crystallinum*. Ganesan e Jayabalan (2004) detectaram um aumento na atividade de superóxido desmutase e peroxidase nos calos de algodão tratados com erythrogen, os quais produziram maior quantidade de embriões somáticos.

O baixo custo relativo da técnica de eletroforese de isoenzimas aliado a ampla informação genética fornecida, faz com que essa técnica continue sendo muito útil ainda hoje, mesmo com técnicas moleculares mais modernas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.

AMARAL, J. A. B. do; BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, M. T. Zoneamento Agrícola do Algodão no Nordeste Brasileiro. Safra 2004/2005. Estado de Pernambuco. **Comunicado técnico 277**, Embrapa Algodão, p.1-7, dezembro 2004.

ARAÚJO, A. E. de; SILVA, C. A. D. da; FREIRE, E. C.; COSTA, J. N.; AMARAL, J. A. B. do; MEDEIROS, J. da C.; SILVA, K. L. da; BARROS, M. A. L.; BELTRÃO, N. E. de M.; SUASSUNA, N. D.; FIRMINO, P. de T.; FERREIRA, P. F.; ALMEIDA, R. P. de; SANTOS, R. F. dos; FREIRE, R. M. M.; PEREIRA, S. R. de P. Cultura do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar. **Embrapa Algodão**, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/index.htm>. Acessado em: 20 de Setembro de 2006.

BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B. do; SILVA, M. T. Zonas de Exclusão de Algodoeiros Transgênicos para Preservação de Espécies de *Gossypium* Nativas ou Naturalizadas. **Comunicado técnico 242**, Embrapa algodão, p. 1-7, Campina Grande, Agosto 2005.

CARNEIRO, M. F. Advances in coffee biotechnology. **AgNiotechNet**, v.1, p. 1-7, 1999.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Avaliação da Safra Agrícola 2006/2007 – Primeiro Levantamento – Outubro/2006**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1safragraos2006_07.pdf>. Acesso em: 16 de outubro, 2006.

COTTON CROP GERMOPLASM COMMITTEE. 1997. disponível em:<http://www.ars-grin.gov/npgs/cgc_reports/cotton97.htm>. Acesso em: 20 de outubro de 2006.

CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, n. 146, p. 9-16, 1999.

DAVIDONIS, G. H.; HAMILTON, R.H.; Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. **Plant Sci. Lett.** N. 32, p.89-93, 1983.

DEGRANDE, P. E.; SOUZA, L. C. F.; OLIVEIRA, M. A.; BARROS, R.; FERNANDES, M. G. Suscetibilidade de genótipos de algodoeiro ao bicudo. **Arquivos do Instituto Biológico**, V.69, N.4, p.83-86, 2002.

DESIKAN, R.; MACKERNESS, S. A-H; HANCOCK, T. J.; NEILL, S. J. regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, N. 127, p. 159-172, 2001.

EMBRAPA ALGODÃO. Melhoramento do algodoeiro na Embrapa Algodão. 2001. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/algodao/melhora2001.html>. Acessado em: 20 de Setembro de 2006.

FEHER, A.; PASTERNAK, T.P.; DUTIS, D. Transition of somatic cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.74, p. 201–228, 2003.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1995. 220p.

FIROOZABADY, E.; DEBOER, D. L. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **In vitro. Cell Dev. Biol.** v.229, p.166-173, 1993.

FREIRE, E.C. **Distribuição, coleta uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Rep**, N. 23, p. 181-187, 2004.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; FROTA-CHAGAS CARVALHO, J.M. & PÉRES, C. Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. **Pesq. agropec. bras.**, v.32, n.5, p.485-488, 1997.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embrigênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.2, 1998, p.533-568.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Somatic embryo germination and plant development from immature zygotic embryos in cotton. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, p.1946-1949, 2004.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Recurrent somatic embryogenesis and twin embryo production in cotton. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, p.141-145, 2005.

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.37, p.107-114, 2003.

IKRAM-UL-HAQ. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, V. 4, p. 206-209, 2005.

JIANG, B. **Optization of agrobacterium mediated cotton transformation using shoot apices explants and quantitative trait loci analysis of yield and yield component traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2004. 106f. Tese (PhD - Department of Agronomy and Environmental Management) Louisiana State University, Louisiana, 2004.

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

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng* in vitro. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 70, p. 181–188, 2002.

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESÁK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Rep.**, v. 23, p. 834-841, 2005.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, n.7, p.405-410, 2002.

MOREIRA, J.A.N. & SANTOS, R.F. **Origem, crescimento e progresso da cotonicultura do Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA/Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 169p.

MORESCO, E. R. **Progresso no melhoramento do algodoeiro no estado de Mato Grosso**. 2003. 79f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

ÖZTÜRK, L. & DEMİR, Y. Effects of Putrescine and Ethephon on Some Oxidative Stress Enzyme Activities and Proline Content in Salt Stressed Spinach Leaves. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.89-95, 2003.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, P.; MISKOLCZI, P.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfafa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

PRICE, H. J.; SMITH, R. H. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschiaanum* Anderss. **Planta**, N.145, p.305-307, 1979.

RAUF, S. & HAFEEZ-UR-RAHMAN. A study of *in vitro* regeneration in relation to doses of growth regulators in hybrids of upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.83, p.209–215, 2005.

SAKHANOKHO, H. F.; ZIPF, A.; RAJASEKARAN, K.; SAHA, S.; SHARMA, G. C. Induction of Highly Embryogenic Calli and Plant Regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) Cottons. **Crop Science**, n.41, 1235-1240, 2001.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

TROLINDER, N.; GOODIN, J. R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*): II. Requirements for embryo development and plant regeneration. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** v.12, p.43-53, 1988.

VIDAL N. F. C.; SILVA, F. P. da, BLEICHER, E; MELO, F. I. O. Mutantes morfológicos de algodoeiro herbáceo como fonte de resistência ao bicudo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.2, p.123-128, 2005.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. V. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, V. 53, N. 372, p. 1227-1236, 2002.

WILLIAM, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis: Factor influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.

WILLMITZER, L. Plant biotechnology: output traits – the second generation of plant biotechnology products is gaining momentum. **Current Opinium of Biotechnology**, v.10, p.161-162, 1999.

ZHANG, B.H; FENG, R.; LI, X.L.; LI, F.L. Anther culture and plant regeneration of cotton (*Gossypium klotzschiamum anderss*). **Chinese Sci. Bull.** v.41, p.145-148, 1996.

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

ZHANG, B-H.; FENG, R.; LIU, F.; WANG, Q. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. **Botanical Bulletin Academic Sinica**, N.42, p. 9-16, 2001.

CAPÍTULO II

Resposta morfogênica do algodão a vários reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos

Resposta morfogênica do algodão a vários reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos

Deivid Almeida da Costa⁽¹⁾; Terezinha Rangel Camara⁽¹⁾ e Cláudia Ulisses⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Química, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, rua dom Manoel de Medeiros s/n°, Dois irmãos, 52171900, Recife, PE. E-mail: costa.deivid@gmail.com, tkrcamara@bol.com.br ⁽²⁾UFRPE, Conselho Universitário, Unidade Acadêmica de Garanhuns, rua Ernesto Dourado, 82 Heliópolis, CEP 55296-190, Garanhuns, PE. E-mail: claudia@nlink.com.br

Resumo - Este trabalho teve como objetivo comparar os efeitos dos reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos no algodão. Sementes desinfestadas foram germinadas em meio MSB. Segmentos de 5mm do hipocótilo foram isolados e cultivados em meio de indução de calos embriogênicos (MICE), composto por meio MSB com diferentes combinações e concentrações de 2,4-D, cinetina, 2iP e Picloran. Calos embriogênicos friáveis amarelo-esverdeados foram selecionados e cultivados em meio de indução de embriões (MIE) que consistia no meio MSB e MSB acrescido de zeatina, ou diferentes concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 , ou acrescido de L-glutamina; asparagina; espermina; espermidina. Os melhores resultados obtidos no MICE correspondem aos meios D01iP01; K03P01 e MSB1. Os meios MCIM e MSB1 produziram as maiores quantidades de calos embriogênicos. Os calos embriogênicos obtidos nos MICE foram transferidos para os diferentes MIE. O meio MIE-1 mostrou-se ser o que melhor manteve a proliferação dos calos. Estruturas globulares e embriogênicas foram observadas em calos do meio MSB1 transferidos para meio MSB e subcultivados em meio MIE-4. Diferentes combinações de reguladores de crescimento podem

produzir calos com características embriogênicas na cultivar de algodão BRS – 187 – 8H. A supressão dos reguladores de crescimento favorece o surgimento de estruturas globulares e pré-embriogênicas.

Termos para indexação: *Gossypium hirsutum* L., calos friáveis, estruturas globulares, estruturas pré-embriogênicas.

Morphogenic response of the cotton to several growth regulators in the induction of embryogenic callus

Abstract - This work had as objective compares the effects of the growth regulators in the induction of embryogenic callus in cotton. The surface-sterilized seeds were germinated in MSB medium. Segments of 5mm of the hypocotyl were isolated and cultivated in embriogenic callus induction medium (MICE), composed for MSB medium with different combinations and concentrations of 2,4-D, Kinetin, 2iP and Picloram. Embryogenic callus that were yellow-greenish and friable were selected and cultivated in Embryo induction medium (MIE) that consisted of MSB medium and MSB supplemented with zeatin; L-glutamine, asparagine; espermine, espermidine or different concentrations of NH₄NO₃ and KNO₃. The best results obtained in MICE correspond to the D01iP01; K03P01 and MSB1 medium. The MCIM and MSB1 medium produced the largest amounts of embryogenic callus. The embryogenic callus obtained in MICE were transferred to the MIEs medium. Globular and pre-embryogenic structures were observed in callus of MSB1 medium transferred for MSB medium and subcultivated in MIE-4 medium. Different combinations of growth regulators can produce callus with embryogenic characteristics in cotton cultivar BRS

– 187 – 8H. The suppression of the growth regulators favors the appearance of globular and pre-embryogenic structures.

Index terms: *Gossypium hirsutum* L., friable callus, Globular structures, pré-embryogenic structures.

Introdução

O algodoeiro, uma malvácea do gênero *Gossypium* no qual existem cerca de 50 espécies, figura como a mais importante produtora de fibra têxtil do mundo e é, também, a segunda maior fonte de óleo vegetal (Moresco, 2003). É uma planta produtora de proteína que pode ser utilizada como suplemento protéico para animais e para o homem (Araujo, et al., 2003). O cultivo dos algodoeiros arbóreo (*G. hirsutum* L. r. *marie galante* Hutch.), herbáceo (*G. hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch.) e dos derivados do cruzamento dessas duas espécies apresentam-se como uma das principais alternativas agrícolas para o Nordeste brasileiro (Amaral, et al., 2004).

O desenvolvimento de técnicas eficazes de multiplicação vegetativa *in vitro* constitui-se uma ferramenta importantíssima na seleção e na multiplicação de genótipos, como meio mais eficiente de levar rapidamente a campo os ganhos genéticos de interesse agrônomo, selecionados, principalmente, para alta produtividade e para resistência às principais pragas e doenças.

A embriogênese somática destaca-se entre as técnicas de propagação *in vitro* de plantas elite em larga escala, bem como para produção de plantas transgênicas e sementes sintéticas. Presta-se também como estratégia para estudos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (Guerra et al., 1998; Sakhanokho et al., 2001). O termo

embriogênese somática é usualmente empregado para designar o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem ocorrer fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986). A embriogênese somática indireta é aquela em que o embrião somático origina-se de calos oriundos do tecido-matriz (Guerra et al. 1998). O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende de diversos fatores, como o genótipo, tipo de explante, estágio de desenvolvimento e idade, estágio fisiológico da planta matriz e condições ambientais externas que incluem composição do meio de cultura, luz e temperatura (Gaj, 2004).

A embriogênese somática do algodão é altamente genótipo-dependente (Zhang et al., 2001; Mishra et al., 2003; Ganesan & Jayabalan, 2004; Rauf & Hafeez-Ur-Rahman, 2005). Apenas um limitado número de variedades possui protocolos para regenerar plantas por essa via. A maioria das publicações sobre regeneração de algodão envolve a linha Coker 310 ou 312. Embora facilmente regenerável, a Coker 310 é agronomicamente sem importância. Ela é, entretanto, a base da geração atual de algodões transgênicos comerciais, os quais são obtidos por retrocruzamento da planta Coker 310 transgênica com uma cultivar elite. Durante a embriogênese somática indireta do algodão ocorre a formação de calos pré-embriogênicos, os quais constituem a primeira etapa na indução de embriões. Calos pré-embriogênicos já foram descritos como sendo calos friáveis granular e friáveis verde-amarelado; ou verdes tumorosos; ou aquosos amarronzados; podendo possuir crescimento rápido e células alongadas ou crescimento rápido com pequenas células e citoplasma muito denso (Sakhanokho et al., 2001). Essa variedade de coloração e textura dos calos de algodão depende da combinação dos reguladores de crescimento (Trolinder & Goodin, 1988).

A cinetina e o 2,4-D são reguladores de crescimento muito utilizados para indução de calos em algodão. Na fase de indução de embriões somáticos e conversão desses embriões em plantas, a composição e as doses dos reguladores de crescimento são alteradas, podendo-se

lançar mão também de modificações na concentração de sais e na adição de compostos orgânicos nitrogenados, como alguns aminoácidos ou poliaminas (Gonzales-Benito et al., 1997; Sakhanokho et al., 2001; Kumria et al., 2003; Mishra, et al., 2003; Aydin et al., 2004; Ganesan & Jayabalan, 2004; Hussain et al., 2005; Ikram-UI-Haq, 2005;).

Este trabalho teve como objetivo descrever e comparar os efeitos de vários reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos no algodão *Gossipium hirsutum* L. cv. BRS – 187 – 8H.

Material e Métodos

Sementes de algodão (BRS – 187 – 8H) foram desinfestadas com álcool 70% durante 50 segundos e, em seguida, foram submersas em solução de hipoclorito de cálcio (1,0% de cloro ativo) durante 12 minutos, sob agitação. Logo após, as sementes foram submetidas a quatro lavagens com água destilada estéril, por quatro minutos cada lavagem. O procedimento de desinfestação deu-se em câmara de fluxo laminar estéril, em condições assépticas.

As sementes desinfestadas foram colocadas em frascos de vidro lacrados com filme de PVC, contendo meio de germinação MSB composto por sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 0,75 g.L⁻¹ de MgCl₂, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 g.L⁻¹ de mio-inositol e gelificado com 2,2 g.L⁻¹ de phytigel. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos. Os frascos com as sementes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de 47,6 μmol m⁻² s⁻¹.

Explantes de hipocótilo, com aproximadamente 5,0 mm, e de cotilédone (6 a 7 partes por cotilédone) foram isolados de plântulas, sete dias após a germinação, e inoculados nos meios de indução de calos embriogênicos.

Para indução de calos embriogênicos, o meio básico (MSB) foi acrescido de diferentes combinações dos seguintes reguladores de crescimento (Tabelas 1, 2 e 3): ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (Kin), 2-isopenteniladenina (2iP) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridenacarboxílico (Picloran). Foram também utilizados os meios CIM e MCIM adaptados de Sakhanokho *et al.* (2001) e Mishra *et al.* (2003), respectivamente. O meio CIM consistiu-se dos sais de MS acrescido de 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 2,0 mg L⁻¹ de ANA, 1,0 mg L⁻¹ de cinetina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de glucose e 0,75 g L⁻¹ de MgCl₂ (Sakhanokho *et al.*, 2001). O meio MCIM era constituído dos sais MS e vitaminas B5 (10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl; 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 1 mg L⁻¹ de piridoxina), acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,75 g L⁻¹ de MgCl₂, 30 g L⁻¹ de glucose, 10,7 µM (0,2 mg L⁻¹) de ANA e 0,2 µM 2,4-D (0,26 mg L⁻¹) (Mishra *et al.* 2003).

O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos. Após inoculados, os explantes permaneceram na sala de crescimento a uma temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de 47,6 µmol m⁻² s⁻¹. Cada unidade experimental foi constituída de um frasco com 5 explantes e todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e contaram com 12 repetições por tratamento. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados pelo programa Statistica (2001).

Tabela 1. Tratamentos para indução de calos embriogênicos constituídos a partir de combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento cinetina (K) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (D)

Níveis de Cinetina (mg L ⁻¹)	Níveis de 2,4-D (mg L ⁻¹)				
	0	0,1	0,3	0,5	1,0
0	K0D0	K0D0,1	K0D0,3	K0D0,5	K0D1
0,1	K0,1D0	K0,1D0,1	K0,1D0,3	K0,1D0,5	K0,1D1
0,3	K0,3D0	K0,3D0,1	K0,3D0,3	K0,3D0,5	K0,3D1
0,5	K0,5D0	K0,5D0,1	K0,5D0,3	K0,5D0,5	K0,5D1
1,0	K1D0	K1D0,1	K1D0,3	K1D0,5	K1D1

Tabela 2. Tratamentos para indução de calos embriogênicos constituídos a partir de combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2-isopenteniladenina (2-iP) e ácido 2,4-diclorofenoxyiacético (2,4-D)

Níveis de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Níveis de 2iP (mg L ⁻¹)		
	0,1	0,3	0,5
0	D0iP0,1	D0iP0,3	D0iP0,5
0,1	D01iP0,1	D01iP0,3	D0,1iP0,5

Tabela 3. Tratamentos para indução de calos embriogênicos constituídos a partir de combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento cinetina e picloran

Níveis de Picloran (mg L ⁻¹)	Níveis de Cinetina (mg L ⁻¹)		
	0	0,1	0,3
0,1	K0P0,1	K01P0,1	K0,3P0,1
0,3	K0P0,3	K01P0,3	K0,3P0,3
0,5	K0P0,5	K01P0,5	K0,3P0,5

Os calos embriogênicos formados nos meios de indução de calos embriogênicos (MICE) foram isolados dos explantes e inoculados em seis diferentes meios de indução de embriões, constituídos a partir do meio MSB. Foram estabelecidos os seguintes tratamentos: meio MSB sem modificações (tratamento controle); MSB + 0,05 mg.L⁻¹ de Zeatina (MIE-1); MSB + 1,9 g.L⁻¹ de NH₄NO₃ (MIE-2); MSB + 1,9 g.L⁻¹ de KNO₃ (MIE-3); MSB + 0,5 g.L⁻¹ de asparagina + 1,0 g.L⁻¹ de L-glutamina (MIE-4); MSB sem NH₄NO₃ e com o dobro de KNO₃ (MIE-5); MSB + 0,5 mg.L⁻¹ de espermina e 0,5 mg.L⁻¹ espermidina (MIE-6).

Resultados e discussão

Resposta do tipo de explante à indução de calos

Ao cabo de 28 dias de cultivo constatou-se que os segmentos de hipocótilo produziram mais calos que os explantes provenientes de cotilédones, como também foi relatado por Sakhanokho *et al.* (2001) e Zhang *et al.* (2001). A formação de calos nas secções de cotilédones ocorreu quase que exclusivamente nas bordas do explante. Já no hipocótilo, os

calos iniciavam nas bordas, mas proliferavam por todo o explante, em função do regulador e da concentração deste. Houve formação de raízes em ambos os tipos de explantes utilizados, mas elas foram mais pronunciadas nos segmentos cotiledonares (Figura 1). A quantidade de raízes variou com o tipo de regulador, mas observou-se que os explantes que formavam mais raízes produziam menos calos quando comparados aos que não formaram raízes. Embora Trolinder e Goodin (1987) afirmem que a formação de raízes não parece deter a embriogênese somática, ela reduz a quantidade de calos embriogênicos disponível, fato também constatado por Sakhanokho *et al.* (2001).

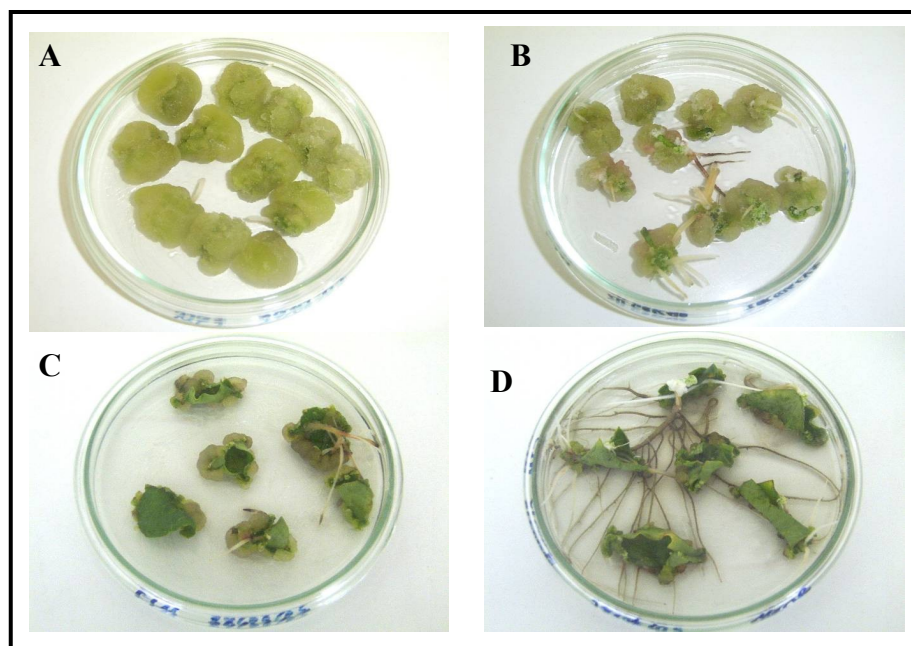


Figura 1. (A-B) Explantes de hipocótilo aos 30 dias de cultivo em meio CIM (2,0 mg L⁻¹ de ANA, 1,0 mg L⁻¹ de cinetina e 30 g L⁻¹ glicose - SAKHANOKHO *et al.*, 2001). Em (B) é possível observar formação de raízes. (C-D) Explantes de cotilédone após 30 dias de cultivo no meio CIM. Observa-se uma maior formação de raiz e menor formação de calo nos explantes de cotilédone, quando comparados com os de hipocótilo.

Efeito da cinetina e do 2,4-D na indução de calos embriogênicos

O início da formação de calos ocorreu uma semana após a incubação dos segmentos de hipocótilo. Nos tratamentos sem 2,4-D a formação de calos, quando ocorreu, limitou-se à

extremidade dos explantes, sugerindo que a indução deveu-se mais à injúria provocada pelo corte dos explantes do que pela ação dos reguladores de crescimento (Figura 2). De fato, em ausência de 2,4-D, só houve formação de calos friáveis nos explantes tratados sem cinetina (Gráfico 1). Estudos têm mostrado a existência de uma correlação direta entre fatores de estresse *in vitro* e o teor de AIA (ácido indol acético) endógeno, favorecendo a embriogênese somática em cenoura (Nishiwaki et al., 2000) e em alfafa (Pasternack et al., 2002).

Após a quarta semana de cultivo, verificou-se o crescimento de calos friáveis amarelo-verdeado (Figura 2) com características embriogênicas, conforme aqueles descritos por Mishra *et al.* (2003) e Ikram-ul-Haq (2005).

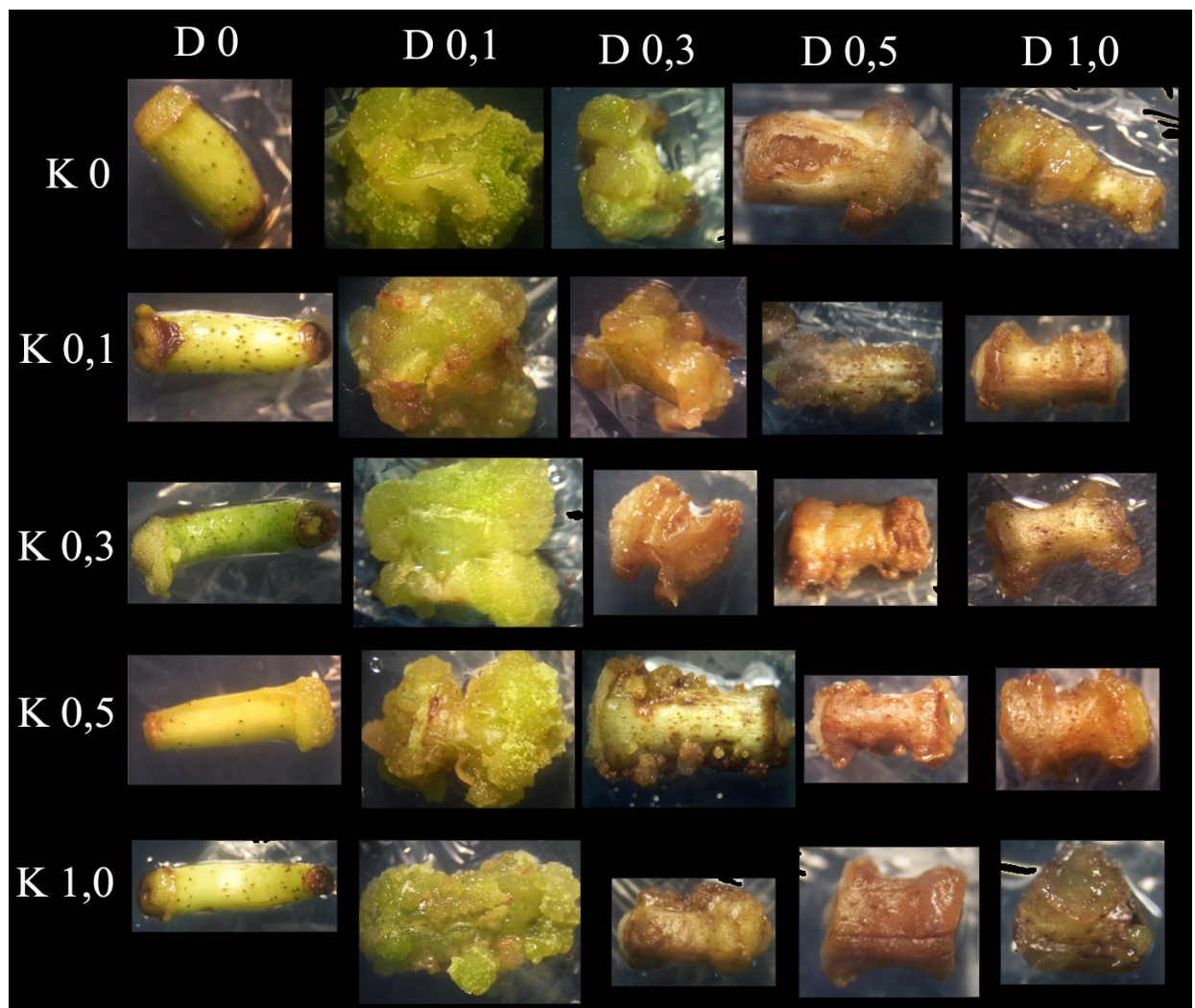


Figura 2: Aspecto dos explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H após 40 dias de cultivo em meio de indução de calo embriogênico, constituído pelo meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L^{-1}). Nas linhas, de cima para baixo, níveis crescentes de cinetina (K0; K0,1; K0,3; K0,5 e K1,0 mg L^{-1}) combinados com as mesmas doses de 2,4-D crescente da esquerda para direita (D0; D0,1; D0,3; D0,5; D1,0).

Esses calos formaram-se a partir de explantes submetidos aos tratamentos com 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D, independente da dose de cinetina. Esses resultados atestam a superioridade do 2,4-D como indutor de embriogênese somática, seja como um fator de estresse capaz de alterar o padrão morfogênico das células cultivadas *in vitro*, seja por sua ação como herbicida auxínico sintético atuando como um análogo de auxinas exógenas (Fehér et al., 2003). Na concentração de 2,4-D (0,1 mg L⁻¹) a porcentagem de formação de calos friáveis chegou a 100% dos explantes tratados sem cinetina ou com 0,3 mg L⁻¹ dessa citocinina. A dose de 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D também foi indicada como mais adequada na indução de calos embriogênicos das cultivares de algodão Coker 310 e 312, mas em combinação com 0,5 mg L⁻¹ de cinetina (Kumria et al., 2003; Ikram-ul-Haq, 2005; Hussain et al., 2005). Neste experimento a cultivar BRS – 187 – 8H respondeu melhor ao meio MSB suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,3 mg L⁻¹ de cinetina, no qual os explantes formaram maior quantidade de calos friáveis verde-amarelados. Esse meio foi então denominado MSB1. Nas concentrações maiores que 0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D, os calos tenderam a desenvolver uma textura aquosa.

Nos tratamentos que receberam 0,3 mg L⁻¹ de 2,4-D, apenas em ausência de cinetina a formação de calos friáveis amarelo-esverdeado alcançou 100% dos explantes (Gráfico 1).

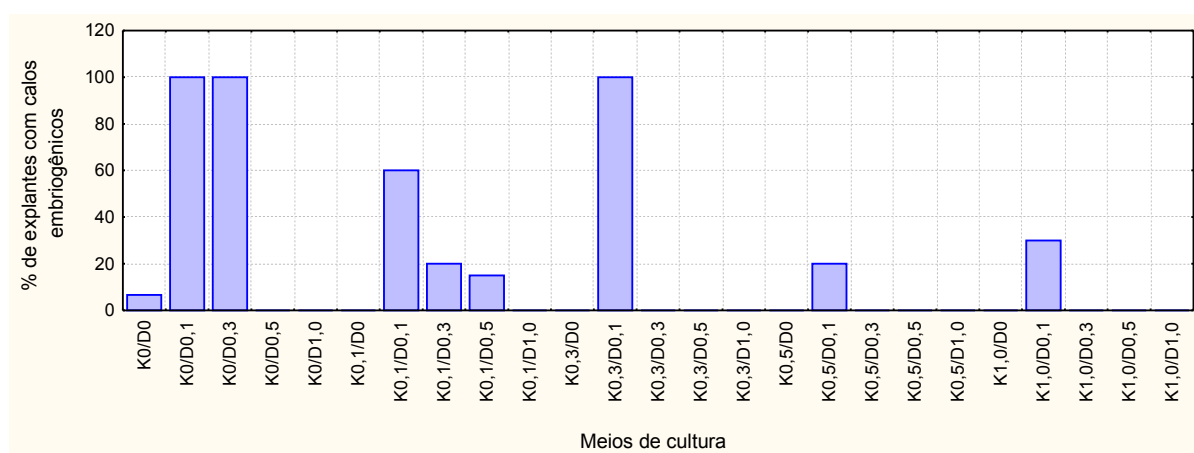


Gráfico 1. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, verde-amarelados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L⁻¹).

A permanência por mais de quatro semanas nos meios de cultura contribuiu para uma oxidação gradativa dos explantes, bem como para a diminuição do crescimento dos calos. A presença dos reguladores de crescimento favoreceu a oxidação dos explantes (Gráfico 2). A adição de cinetina ao meio de cultura aumentou a oxidação dos explantes submetidos a concentrações de 0,1 e 0,3 mg L⁻¹ de 2,4-D. Nos meios com 0,3 mg L⁻¹ de 2,4-D a percentagem de oxidação dos explantes foi superior a 60% em todos os tratamentos com cinetina. À medida que aumentou a concentração de 2,4-D verificou-se um incremento na oxidação dos explantes que alcançou os 100% em praticamente todos os tratamentos que receberam 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ dessa auxina (Figura 2, Gráfico 2). O escurecimento dos tecidos vegetais é uma consequência de reações enzimáticas nas quais o ácido clorogênico (Cheng & Crisosto, 1995) ou outros compostos fenólicos são oxidados (Block & Lankes, 1995).

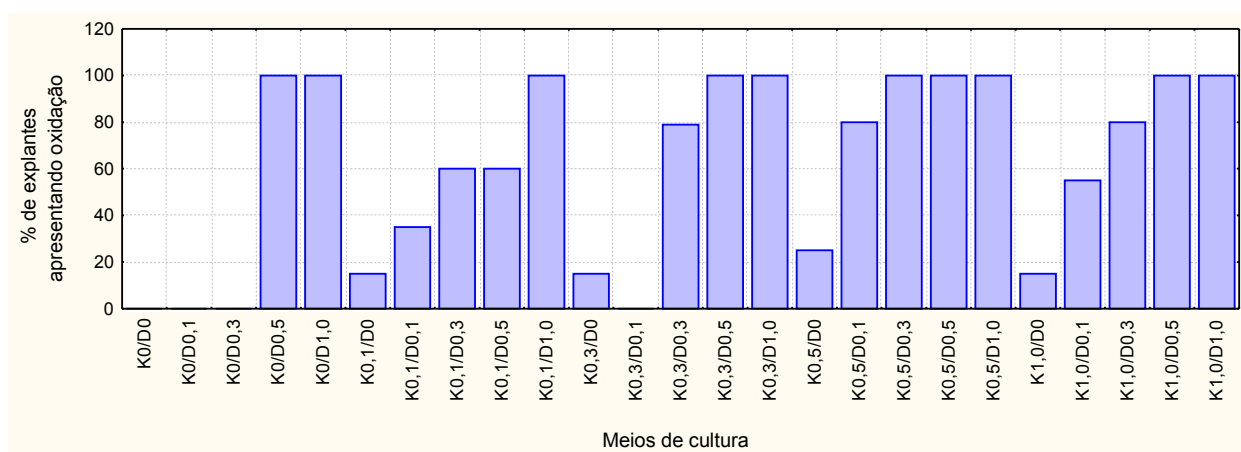


Gráfico 2. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram oxidação após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e cinetina (mg L⁻¹).

Efeito do 2iP e do 2,4-D na indução de calos embriogênicos

A formação de calos friáveis amarelo-esverdeado ocorreu apenas no meio com a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de 2iP e 0,1 mg L⁻¹ de 2,4D, alcançando um percentual de 32,25%

dos explantes (Gráfico 3 e Figura 3). Nos demais meios com 2,4-D a maioria dos calos formados era verde e duro.

O aumento da concentração de 2iP não favoreceu a produção de calos embriogênicos. A concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2iP no meio MSB coincidiu com a formação de calos verdes duros e calos aquosos translúcidos, em 8% dos explantes cultivados nesse meio. Por outro lado, Gonzales-Benito *et al.* (1997) relataram a obtenção de calos marrom claro, granular e parcialmente friáveis na cultivar de algodão CNPA Precoce 2 com a adição de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2iP. Os autores registraram 72 embriões em 60% desses calos.

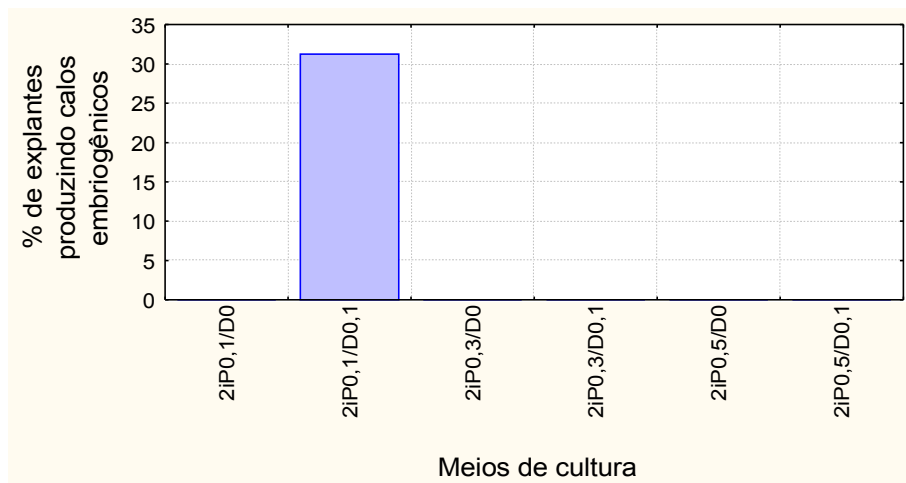


Gráfico 3. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, amarelo-esverdeados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de 2,4-D e 2iP (mg L^{-1}).

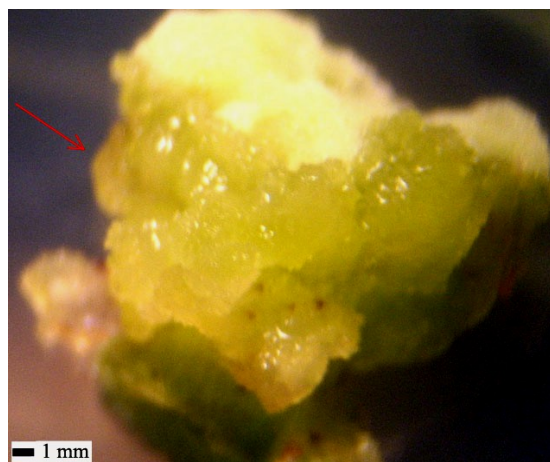


Figura3: Aspecto do explante aos 28 dias de cultivo em meio MSB com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2iP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4D, apresentando formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha).

Efeito da Cinetina e Picloran na indução de calos embriogênicos

De uma maneira geral, nos tratamentos com combinações de cinetina e picloran os explantes apresentavam um elevado índice de oxidação, após 28 dias de incubação, mas ainda assim houve formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (Figura 4). No meio K0,3/P,01 a percentagem de oxidação foi menor que 50% (dados não apresentados). Os maiores percentuais de formação de calos friáveis foram obtidos nos explantes cultivados nos meios K0/P0,1; K0/P0,3 e K0,3/P0,1 (Gráfico 4). O meio K0,3/P0,1 além de ter a melhor resposta na indução de calos (41,66%), ainda produziu mais calos por explante.

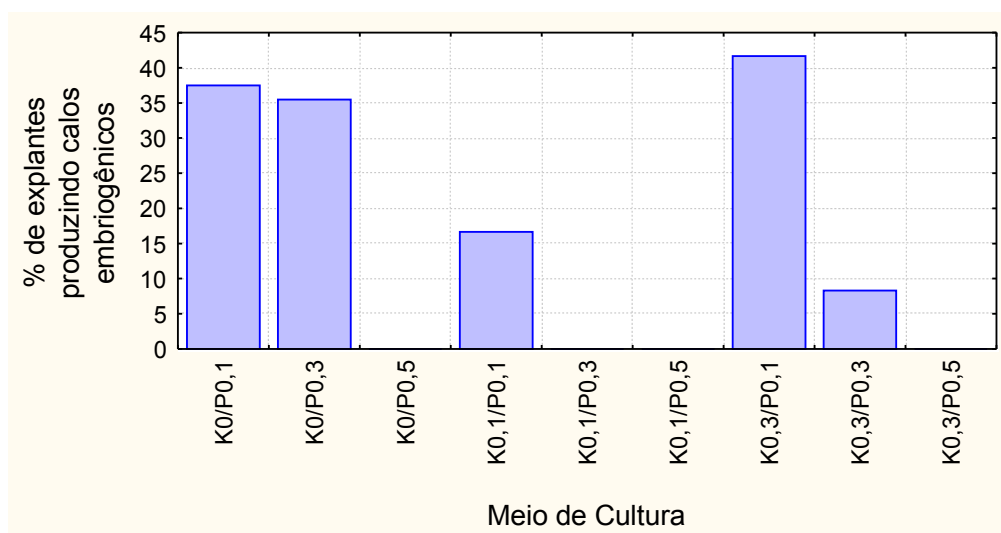


Gráfico 4. Porcentagem de explantes de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H que apresentaram calos friáveis, verde-amarelados após 28 dias de cultivo em meio MS com diferentes combinações de Cinetina e Picloran (mg L^{-1}).

Experimentos de indução de calos embriogênicos com algodão usando picloran e cinetina foram realizados por Ganesan e Jayabalan (2004), os quais obtiveram a melhor resposta à indução na linha SVPR 2 com o meio que continha $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de picloran. Neste trabalho, com a cultivar BRS – 187 – 8H, essa combinação (K0,1/P0,3) não induziu calos embriogênicos e os explantes nesse meio oxidaram.

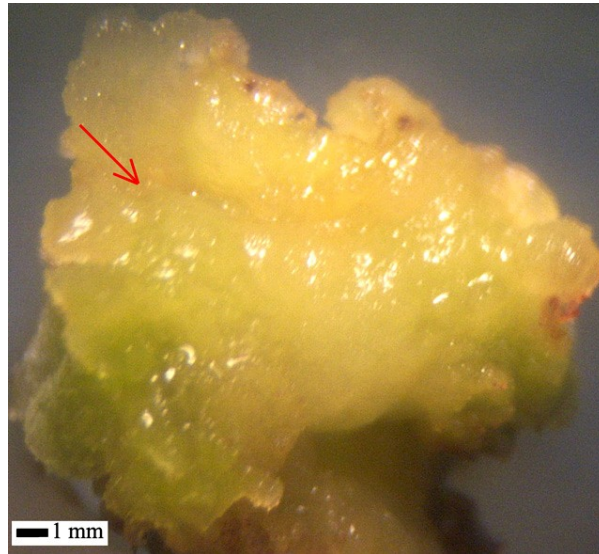


Figura 4: Aspecto do explante de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H aos 28 dias de cultivo em meio MSB com $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ Cinetina e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Picloran, apresentando formação de calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha).

Rizogênese versus calogênese

Durante o cultivo em meio de indução de calos embriogênicos, foi observada a formação de raízes em alguns explantes de hipocótilo no meio sem regulador de crescimento (MSB) e nos meios de indução de calos embriogênico com: 1 mg L^{-1} de 2iP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4D; $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina; MCIM (MISHRA *et al.*, 2003); CIM (SAKHANOKHO *et al.*, 2001). Observou-se uma maior formação de raízes nos meios CIM (Figura 1B) e MSB. Sakhanokho *et al.* (2001) também relataram a formação de raízes durante a indução de calos embriogênicos em cultivares comerciais de algodão quando submetidas ao meio CIM. A concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (Ácido Naftaleno Acético) pode ter sido o indutor da diferenciação de raízes, haja vista ser esse o regulador de crescimento mais amplamente utilizado em meios de enraizamento.

A rizogênese ocorreu tanto durante o cultivo nos meios MICE, quanto após a passagem dos calos para meios de indução de embriões (MIE) (Figura 5). Nessa etapa, os calos embriogênicos incubados nos meios MIE-1 (com $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Zeatina) e MSB (sem reguladores de crescimento) apresentaram uma freqüência maior de formação de raízes que nos demais tratamentos. A rizogênese, contudo, ocorreu ainda com maior freqüência quando os calos permaneceram em contato com o explante que os originou. As raízes geralmente se formavam a partir de calos verdes duros ou brancos duros.

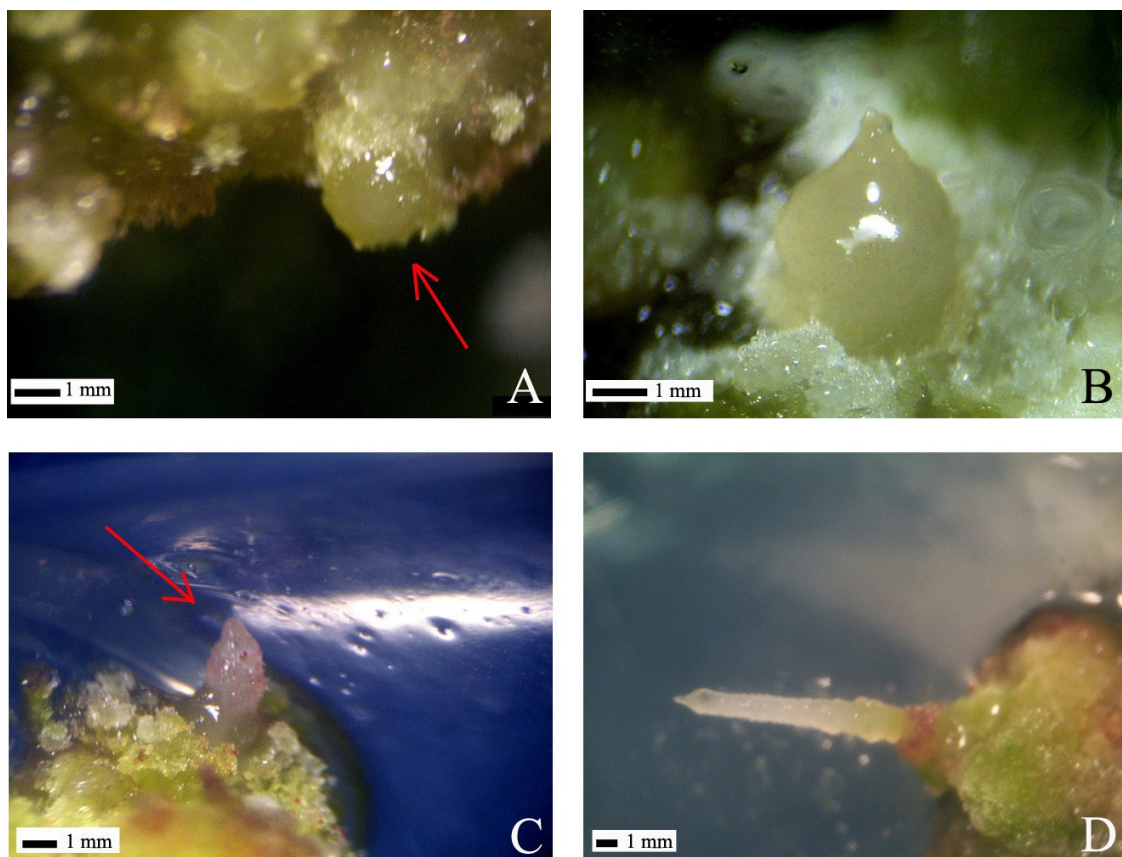


Figura 5. Ocorrência de rizogênese durante a indução de embriões. Estágios de desenvolvimento da raiz (A-D) no meio MSB + $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Zeatina (MIE-1).

Matéria fresca dos calos embriogênicos nos meios de indução

A partir dos resultados obtidos, a produção de calos após 28 dias de cultivo foi avaliada em termos da produção de matéria fresca dos calos, nos meios em que a percentagem de calos

friáveis foi mais elevada. Foram comparados nessa etapa os meios: 2iP0,1/D0,1; K0,3P0,1; MSB1 (0,1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,3 mg L⁻¹ de Cinetina); MCIM (0,2 mg L⁻¹ de ANA e 0,26 mg L⁻¹ de 2,4-D); CIM (2,0 mg L⁻¹ de ANA, 1,0 mg L⁻¹ de cinetina). O peso da matéria fresca dos calos variou entre 0,046 g 0,093 g. A maior produção de biomassa fresca (0,0934 e 0,0935 g) foi observada nos explantes incubados nos meios MSB1 e MCIM (Gráfico 5).

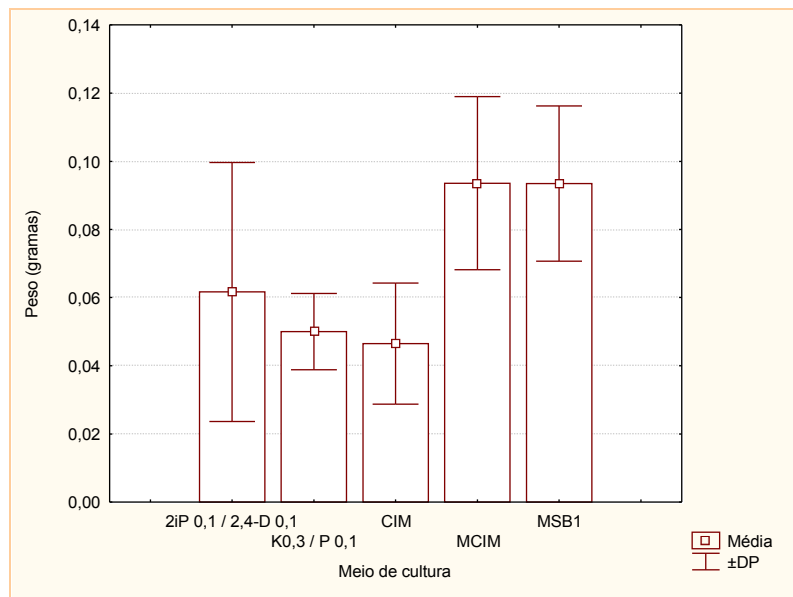


Gráfico 5. Média em gramas, por explante, do peso dos calos amarelo-esverdeado friáveis obtidos nos meios 0,1 mg L⁻¹ 2iP e 0,1 mg L⁻¹ de 2,4D; 3 mg L⁻¹ Cinetina e 0,1 mg L⁻¹ de Picloran; MSB1; MCIM (MISHRA *et al.*, 2003) e CIM (SAKHANOKHO *et al.*, 2001).

A similaridade entre os tratamentos foi calculada em termos da produção de massa de calos embriogênicos e permitiu separar os tratamentos em dois grupos distintos, com os meios MSB1 e MCIM em um grupo de maior similaridade (Gráfico 6).

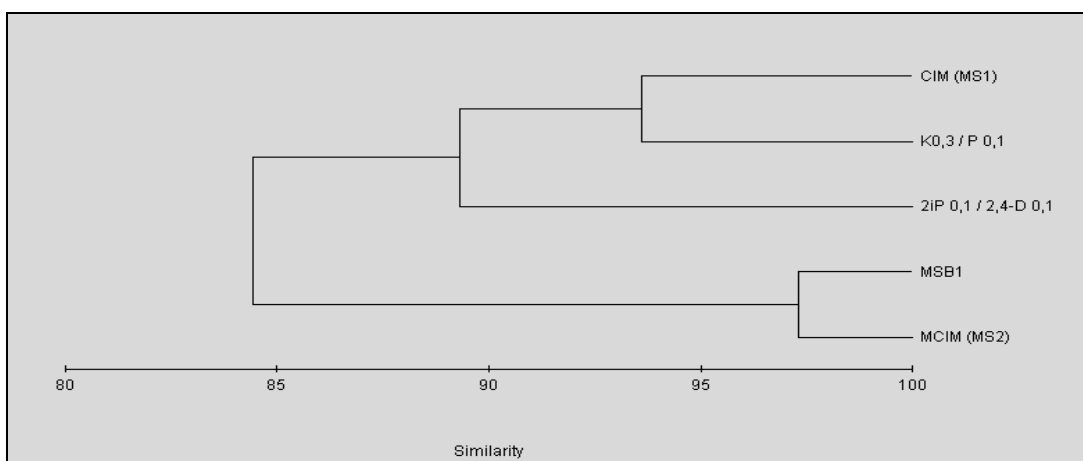


Gráfico 6. Gráfico de similaridade entre os meios de cultivo, com relação a produção de calos embriogênicos em termos de matéria fresca.

Meio de indução de embriões (MIE)

Entre os calos embriogênicos produzidos nos MICEs, os calos obtidos nos meios 2iP0,1/D0,1; K0,3/P0,1; MSB1; MCIM e CIM foram selecionados e transferidos para os meios de indução de embriões (MIE) conforme descrito na metodologia.

Após um mês de cultivo no meio de indução de embriões, os calos apresentavam diversas colorações e texturas que variavam entre creme, amarelo, verde, marrom e vermelho (Figura 6).

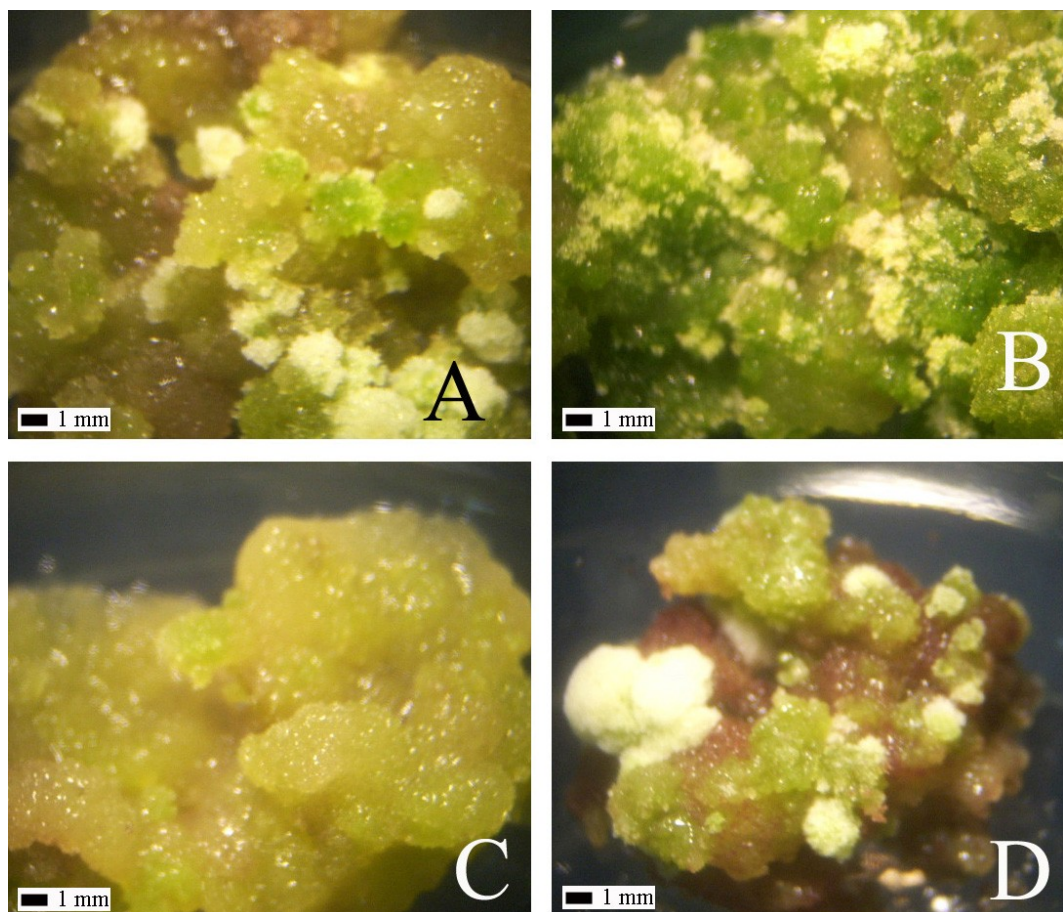


Figura 6. Aspecto dos calos embriogênicos, após 30 dias, nos meios MSB (A); MIE-1 (B); MIE-4 (C) e MIE-5 (D).

Os calos do meio MSB possuíam uma cor bege e verde com oxidação na base do explante em contato com o meio de cultura. A maior proliferação de calos ocorreu no meio MIE-1, onde os calos estavam com o dobro do tamanho dos outros meios, possuindo coloração bege e verde. No meio MIE-2 ocorreu cerca de 50% de oxidação ou escurecimento e os calos possuíam uma textura mais compacta. No meio MIE-3 os calos apresentaram coloração variando de bege a marron-claro. Já no meio MIE-4 os calos possuíam coloração bege levemente esverdeada. Os calos formados no meio MIE-5 apresentaram o menor crescimento e mais pigmentos antociânicos, enquanto que os calos do meio MIE-6 eram marrom-claro. Apesar da variedade na coloração dos calos, dois meios de cultura se destacaram: o meio MIE-1, no qual se formou grande quantidade de calo bege e verde friáveis, e o meio MIE-4 no qual surgiram calos de coloração bege mais uniforme e pouca oxidação.

Parte dos calos cultivados por 30 dias em meio MSB que foi transferida para meio MIE-4, após 40 dias nesse meio, foi possível observar a formação de estruturas globulares (Figura 7) com crescimento de calo secundário em sua superfície. Passados 51 dias, observou-se algumas estruturas pré-embriogênicas (Figura 8) que apresentavam crescimento de calo secundário em sua superfície. Essas estruturas não se desenvolveram, oxidando uma semana após serem isoladas e cultivadas em meio MIE-4.

O meio basal sem reguladores de crescimento já foi utilizado para conversão de calos embriogênicos em embriões somáticos (AYDIN *et al.*, 2004). De forma similar, com a cv BRS – 187 – 8H fez-se necessária a passagem dos calos pelo meio MSB (sem hormônios) para que houvesse a formação de estruturas globulares e pré-embriogênicas.

A presença de glutamina e/ou aspargina foi importante para obtenção de estruturas globulares e pré-embriogênicas em meio basal MSB, como também foi observado por

González-Benito *et al.* (1997) na indução de embriões somáticos. Ambos os aminoácidos estão presentes no meio MIE-4.

A adição de $1,9\text{ g L}^{-1}$ de KNO_3 ou NH_4NO_3 ao meio MS para induzir a formação e maturação de embriões na Coker-312 foi relatada por Kumria *et al.* (2003), Mishra *et al.* (2003) e Ikram-ul-Haq & Zafar (2004), e os quais obtiveram melhores resultados com a adição de KNO_3 ao meio. Para a cultivar BRS – 187 – 8H a adição de $1,9\text{ g L}^{-1}$ de KNO_3 ou NH_4NO_3 no meio de indução de embriões não promoveu grande crescimento. Para proliferação e manutenção dos calos o melhor meio mostrou ser o meio MIE-1.

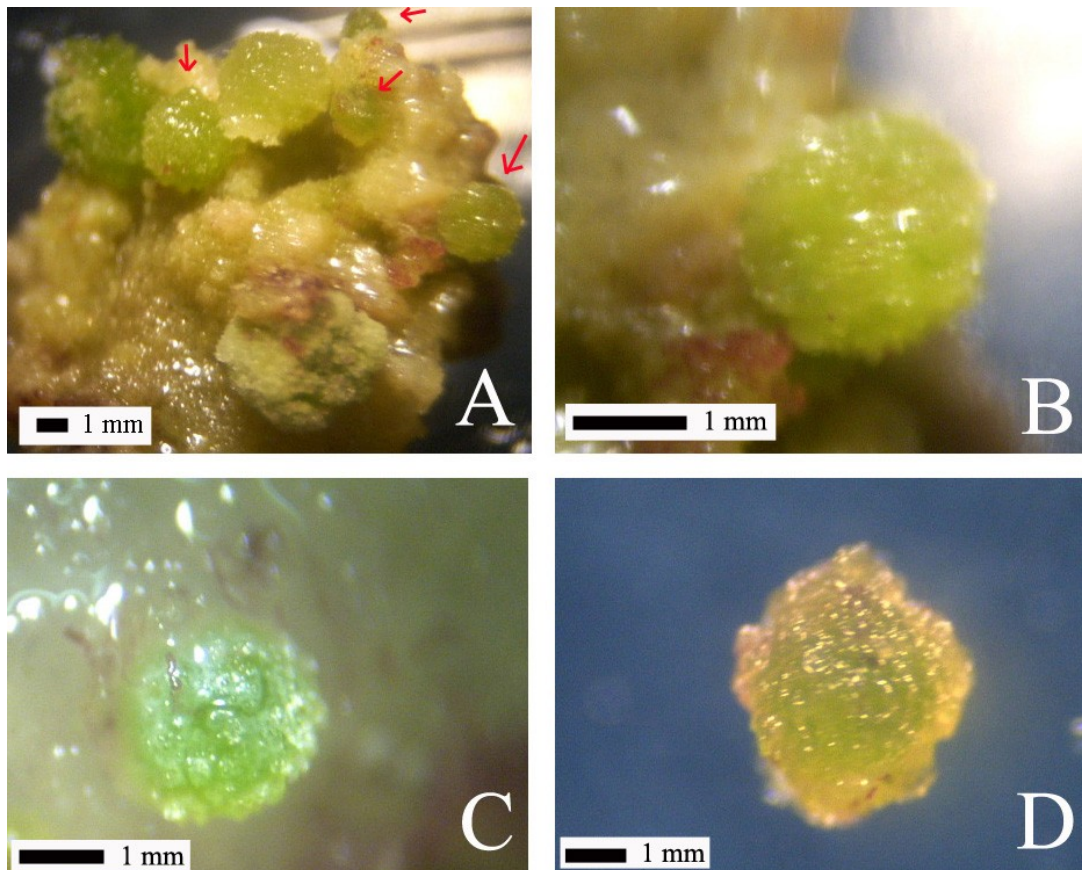


Figura 7. Estruturas globulares, após 40 dias em meio MIE-4. Foto geral do calo mostrando 4 estruturas globulares (A); Detalhe da estrutura globular no calo embriogênico (B e C); Estrutura globular isolada e cultivada em meio MIE-4 (D).

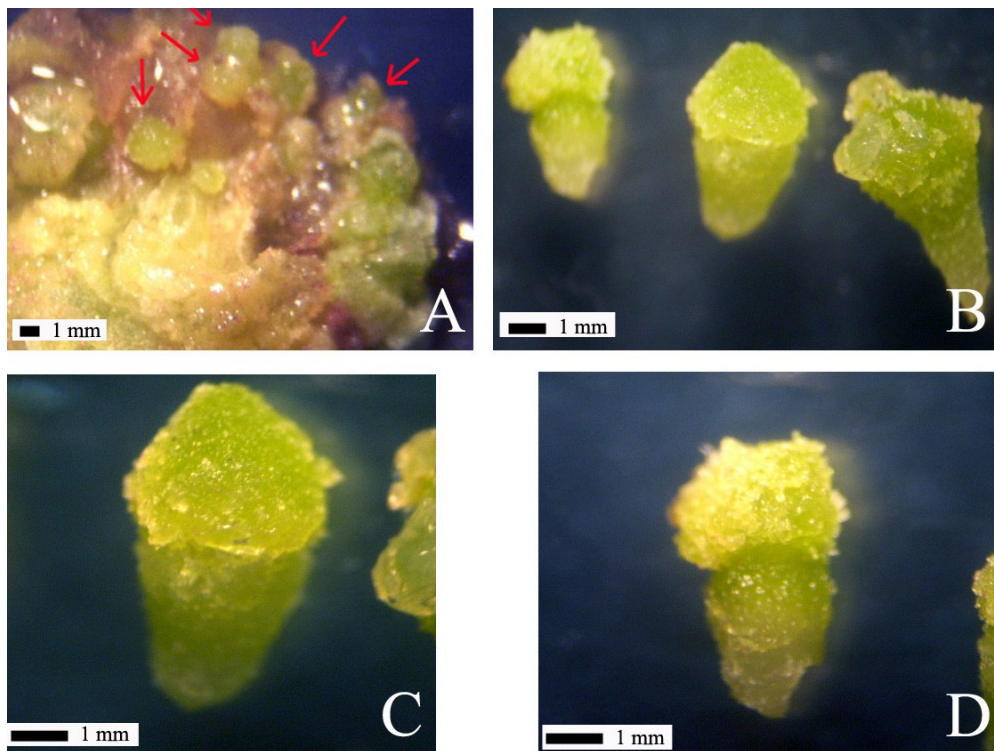


Figura 8. Estruturas pré-embriogênicas após 51 dias no meio MIE-4 (B, C, D). Setas vermelhas mostrando a Presença de 5 estruturas globulares nos calos cultivados em MIE-4 após 51 dias (A).

Conclusões

1- Segmentos de hipocótilo são mais adequados do que cotilédones para à indução de calos embriogênicos na cultivar de algodão BRS – 187 – 8H.

2- Calos embriogênicos são induzidos na cultivar de algodão BRS – 187 – 8H por meio de distintas combinações de reguladores de crescimento, contudo, o meio MS basal acrescido de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de Cinetina (MSB1) mostrou o melhor conjunto de resultados com relação a oxidação e porcentagem de explantes com calos. Demonstrando também as maiores produções de biomassa fresca.juntamente com o meio MCIM (MISHRA *et al.*, 2003).

3- A supressão dos reguladores de crescimento favorece o surgimento de estruturas globulares pré-embriogênicas.

Referências

AMARAL, J. A. B. do; BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, M. T. Zoneamento Agrícola do Algodão no Nordeste Brasileiro. Safra 2004/2005. Estado de Pernambuco. **Comunicado técnico 277**, Embrapa Algodão, p.1-7, 2004.

ARAÚJO, A. E. de; SILVA, C. A. D. da; FREIRE, E. C.; COSTA, J. N.; AMARAL, J. A. B. do; MEDEIROS, J. da C.; SILVA, K. L. da; BARROS, M. A. L.; BELTRÃO, N. E. de M.; SUASSUNA, N. D.; FIRMINO, P. de T.; FERREIRA, P. F.; ALMEIDA, R. P. de; SANTOS, R. F. dos; FREIRE, R. M. M.; PEREIRA, S. R. de P. Cultura do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar. **Embrapa Algodão**, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/index.htm>. Acessado em: 20 de Setembro de 2006.

AYADIN, Y.; IPEKCI, Z.; TALAS-OGRA, T. ZEHIR, A.; BAJROVIC, K.; GOZUKIRMIZI, N. High frequency somatic embryogenesis in cotton. **Biologia Plantarum**, v.48, n.4, p.491-495, 2004.

BLOCK, R.; & LANKES, C. Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment. **Gartenbauwissenschaft**, V.60: 276-279, 1995

CHENG, G.W., CRISOSTO, C.H. Browning potential phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 5, p. 835-838, 1995.

FEHER, A.; PASTERNAK, T.P.; DUTIS, D. Transition of somatic cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.74, p. 201–228, 2003.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, N. 50, p. 151-158, 1968.

GANESAN, M. & JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Rep**, v. 23, p. 181-187, 2004.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; FROTA-CHAGAS CARVALHO, J.M. & PÉRES, C. Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. **Pesq. agropec. bras.**, v.32, n.5, p.485-488, 1997.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embrigênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.2, 1998, p.533-568.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Recurrent somatic embryogenesis and twin embryo production in cotton. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, p.141-145, 2005.

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

IKRAM-UL-HAQ. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 206-209, 2005.

KUMRIA, R.; SUNNICHAN, V. G.; DAS, D. K.; GUPTA, S. K.; REDDY, V. S.; BHATNAGAR, R. K.; 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.

MISHRA, R.; WANG, H-Y.; YADAV, N. R.; WILKINS, T. A. Development of a highly 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.

MORESCO, E. R. **Progresso no melhoramento do algodoeiro no estado de Mato Grosso**. 2003. 79f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta** v. 211, p.756-759. 2000.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, P.; MISKOLCZI, P.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfafa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

RAUF, S. & HAFEEZ-UR-RAHMAN. A study of *in vitro* regeneration in relation to doses of growth regulators in hybrids of upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p.209–215, 2005.

SAKHANOKHO, H. F.; ZIPF, A.; RAJASEKARAN, K.; SAHA, S.; SHARMA, G. C. Induction of Highly Embryogenic Calli and Plant Regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) Cottons. **Crop Science**, v.41, 1235-1240, 2001.

STATISTICA (data analysis software system), version 6. **StatSoft Inc.**, 2001.

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

TROLINDER, N. & GOODIN, J. R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*): II. Requirements for embryo development and plant regeneration. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, v.12, p.43-53, 1988.

WILLIAM, E. G. & MAHESWARAN, G. Somatic Embryogenesis: Factor influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v.57, p.443-462, 1986.

ZHANG, B-H.; FENG, R.; LIU, F.; WANG, Q. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. **Botanical Bulletin Academic Sinica**, v.42, p. 9-16, 2001.

CAPÍTULO III

**Influência do estresse na calogênese do algodão e a expressão de isoenzimas do sistema
antioxidativo**

Influência do estresse na calogênese do algodão e a expressão de isoenzimas do sistema antioxidativo.

Deivid Almeida da Costa⁽¹⁾; Terezinha Rangel Camara⁽¹⁾ e Cláudia Ulisses⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Química, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, rua dom Manoel de Medeiros s/nº, Dois irmãos, 52171900, Recife, PE. E-mail: costa.deivid@gmail.com, tkrcamara@bol.com.br ⁽²⁾UFRPE, Conselho Universitário, Unidade Acadêmica de Garanhuns, rua Ernesto Dourado, 82 Heliópolis, CEP 55296-190, Garanhuns, PE. E-mail: claudia@nlink.com.br

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de calos embriogênicos na cultivar de algodão BRS – 187 – 8H por meio de estresse oxidativo induzido por luz e ferro, correlacionando a calogênese com a expressão de isoformas do sistema antioxidativo. Para indução de calos embriogênicos utilizou-se a combinação do meio MSB e MSB1 com duas concentrações de FeEDTA: a concentração padrão do meio MS; e uma concentração cinco vezes maior. Foram utilizados três regimes de intensidade luminosa: escuro; 3,4 Klx e 6,0 Klx. No sistema eletroforético da catalase (CAT) as amostras dos explantes do meio MSB+FeEDTA(5X) e MSB, que não formaram calos, apresentaram bandas de maior intensidade. Nas amostras de calos embriogênicos dos meios MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx) e MSB1+FeEDTA(5X) as bandas eram de intensidade média. Nos calos dos explantes do

meio MSB1, cultivados no escuro, a banda correspondente à CAT revelaram-se fracamente. No sistema peroxidase as bandas da região catódica apresentaram intensidade fraca, enquanto que nas bandas anódicas, o padrão foi semelhante àquele observado para a CAT. A formação de calos embriogênicos em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H é dependente da ação de reguladores de crescimento e da presença de luz. As isoformas de catalase e peroxidase apresentam padrão similar e estão relacionadas com o aspecto embriogênico dos calos.

Termos para indexação: *Gossypium hirsutum* L., sistema antioxidativo, catalase, peroxidase, calos embriogênicos.

Influence of the stress in cotton callus formation and isozymic antioxidant system expression

Abstract – The objective of this work was to evaluate the production of embryogenic callus on cotton cultivar BRS – 187 – 8H by oxidative stress induced by light and iron, correlating the embryogenic callus with the antioxidant enzymes expression. For induction of embryogenic callus it was used the combination of MSB and MSB1 medium with two concentrations of FeEDTA: the concentration standard of the MS medium; and a concentration five times larger. It was used three regimes of luminous intensity: darkness; 3,4 Klx and 6,0 Klx. In catalase electrophoretic system, the samples of the explants of MSB medium +FeEDTA (5X) and MSB, which didn't form callus, they presented bands of larger intensity. In the samples of embryogenic callus of the MSB1 (3,4 Klx), MSB1 (6,0 Klx) and MSB1+FeEDTA (5X) medium, the bands presented medium intensity. In the callus of the explants of MSB1 medium cultivated in the darkness, the band corresponding to CAT appears with little intensity. In the isozymic standards of peroxidase, the bands of the cathode

pole presented weak intensity, while in the anode pole the pattern of the bands was similar to that observed for CAT. The embryogenic callus formation in *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H is dependent of the action of growth regulators and of the light presence. The isozymic standards of catalase and peroxidase present similar pattern and they are related to the embryogenic aspect of the calluses.

Index terms: *Gossypium hirsutum* L., antioxidant enzymes, catalase, peroxidase, embryogenic callus.

Introdução

A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que haja fusão de gametas (Guerra et al., 1998).

Desde a primeira regeneração de embriões somáticos em algodão por Davidonis e Hamilton (1983), diversos trabalhos sobre embriogênese somática têm sido relatados em algodão (Zhang et al., 1996; Gonzáles-Benito et al., 1997; Zhang et al., 2001; Sakhanokho et al., 2001; Mishra et al., 2003; Hussain et al., 2004; Ganesan & Jayabalan, 2004 ; Hussain et al., 2005; Ikram-Ul-Haq, 2005). Contudo, diversas dificuldades ainda permanecem (Zhang et al., 2000; Ikram-Ul-Haq, 2005).

Embora alguns marcadores genéticos já tenham sido associados com a competência embriogênica, ainda não se sabe como, nem por que, células somáticas podem assumir uma via embriogênica. As fases iniciais dessa via morfogênica são caracterizadas pela indução de muitos genes relacionados ao estresse, o que leva à hipótese de que a embriogênese somática é uma resposta extrema ao estresse de células de plantas cultivadas *in vitro* (Pasternak et al., 2002).

Ikegami et al. (2003) obtiveram embriões somáticos de *A. thaliana* a partir de um tratamento de estresse osmótico que consistia em manter, por um período de 6 a 9 horas, explantes de meristema apical em meio com 0,7 M de manitol. A indução de embriogênese somática também já foi obtida em *Panax ginseng* a partir de estresse com macrossais (Choi et al., 1998). Outros tipos de agentes de estressores já foram relatados como indutores de embriogênese somática em diversas espécies de plantas. Ao que parece, o tratamento estressante induz uma resposta comum a partir da qual se dá a indução da expressão de fatores que controlam o início da embriogênese somática (Ikegami et al., 2003).

Diversos fatores podem induzir estresse de natureza oxidativa o que leva as plantas a produzirem quantidades excessivas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) como o radical hidroxiperoxil (HO_2^\cdot), o radical superóxido (O_2^\cdot) e o radical hidróxido (HO^\cdot) (Libik et al., 2005). Em contrapartida existe um sistema antioxidativo enzimático no qual se destacam as superóxidos dismutases (SOD), as catalases (CAT) e as peroxidases (PO). O produto da atividade da SOD é o H_2O_2 , que é tóxico e precisa ser reduzido à H_2O em reações subsequentes. Nas plantas, os níveis intracelulares de H_2O_2 são regulados, principalmente, pela peroxidase do ascorbato, catalases e peroxidases. Essas últimas são enzimas envolvidas em ligações de polissacarídeos e lignificação da parede celular e na redução da peroxidação dos lipídios de membrana (Libik et al., 2005; Sreenivasulu et al., 1999; Öztürk & Demir, 2003).

Alguns autores correlacionam o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica dos tecidos somáticos, sugerindo que o aumento da atividade dessas enzimas estaria relacionado ao estresse oxidativo e que esse estresse contribuiria para acelerar o processo de embriogênese somática (Libik et al., 2005; Ganesan et al., 2004; Cui et al., 1999).

Ganesan e Jayabalan (2004) detectaram um aumento na atividade de superóxido dismutase e peroxidase associado a uma maior eficiência no processo de embriogênese somática em calos de algodão tratados com hemoglobina bovina comercial (Erythrogen). Os autores concluíram que esse estímulo foi decorrente do aumento nos níveis de oxigênio disponível e do estresse induzido ao tecido em crescimento pela adição de hemoglobina. Por outro lado, doses muito alta (500 a 600 mg L⁻¹) inibiram a embriogênese pelo aumento excessivo na intensidade do estresse imposto.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a formação de calos embriogênicos na cultivar de algodão BRS – 187 – 8H por meio de estresse oxidativo induzido por luz e excesso de ferro, correlacionando a calogênese com a expressão de isoformas de enzimas do sistema antioxidativo.

Material e Métodos

Sementes de algodão BRS – 187 – 8H foram desinfestadas com álcool 70% durante 50 segundos e em seguida foram submersas em solução de hipoclorito de cálcio (1,0% de cloro ativo) por 12 minutos, sob agitação. Logo após, as sementes foram submetidas a quatro lavagens com água destilada estéril, por quatro minutos cada lavagem. O procedimento de desinfestação se deu em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas.

Após a assepsia as sementes foram postas para germinar em frascos de vidro (8 sementes por frasco) lacrados com filme de PVC, contendo meio de germinação MSB composto por sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), 0,75 g.L⁻¹ de MgCl₂, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 g.L⁻¹ de mio-inositol, e gelificados com 2,2 g.L⁻¹ de phytigel. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20

minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16h e intensidade lumínica de $47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Segmentos de hipocótilo com aproximadamente 5,0 mm foram isolados das plântulas sete dias após germinação. Os explantes foram inoculados nos meios de indução de calos embriogênicos. Foram inoculados 5 explantes por frasco.

Os tratamentos para indução de calos consistiram da combinação do meio MSB e MSB1 (MSB + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina) com duas concentrações de FeEDTA: a concentração padrão do meio MS; e uma concentração cinco vezes maior (5X). Essas combinações resultaram num fatorial 2x2 (reguladores de crescimento \times concentração de ferro), inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados pelo programa STATISTICA (2001). Os explantes permaneceram em sala de crescimento a uma temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade lumínica de $47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Um segundo experimento foi realizado para testar o efeito da luz sobre a formação de calos em explantes incubados em meio MSB1. Foram estabelecidos três regimes de intensidade luminosa: escuro; 3,4 Klx ($47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 6,0 Klx ($84 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cada tratamento contou com 12 repetições, distribuídas inteiramente ao acaso. Cada repetição consistiu de um frasco com 5 explantes, totalizando 60 explantes por tratamento.

O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C, por 30 minutos. Os explantes permaneceram em sala de crescimento a uma temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas ou no escuro, conforme o tratamento.

Os explantes em meio MSB1 + FeEDTA 5X e MSB + FeEDTA 5X permaneceram durante 6 dias nesse meio, e em seguida foram transferidos para meio MSB1 e MSB, respectivamente, onde permaneceram por 22 dias (totalizando 28 dias no meio de indução, dos quais 6 foram sob estresse de ferro). Após 28 dias de cultivo no meio de indução de calos,

foi estimada a produção de calos por meio da matéria fresca a partir do isolamento dos calos com auxílio de lupa de dissecação e pesagem em balança de precisão.

A extração de proteínas para a análise de isoformas de enzimas antioxidativas procedeu-se utilizando 1,0 g de: calos embrigênicos obtidos nos meios MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx) e MSB1+FeEDTA(5X), calos translúcidos friáveis obtidos no meio MSB1 em ausência de luz e explantes mantidos nos meios MSB e MSB+FeEDTA(5X) que não formaram calos, todas as amostras foram coletadas aos 28 dias após inoculação, nos diferentes meios e condições de cultivo.

O tecido vegetal foi macerado em almofariz, em banho de gelo, com 2,5 mL de tampão Scandalios (1969), 300 mg de sacarose e 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Os homogenizados foram centrifugados a 10.000 rpm, durante 1 minuto, a 4 °C, e o sobrenadante foi usado na identificação das isoenzimas. Do sobrenadante foram retirados 10 µL de cada amostra e aplicados nos poços dos géis de poliacrilamida a 7%.

A migração eletroforética foi conduzida a 4 °C, a um potencial de 40V, até que a linha de frente atingisse 6,0 cm em direção ao pólo positivo. Após a corrida eletroforética os géis foram corados em soluções específicas e fotografados.

O gel de acrilamida usado na corrida eletroforética foi preparado com tampão borato de lítio 0,2 M a pH 8,3; tampão Tris-citrato 0,2 M a pH 8,3; acrilamida estoque (acrilamida 95%, bisacrilamida 5% e H₂O destilada); Temed e persulfato de amônia.

Para a resolução dos sistemas enzimáticos, foram adotados os seguintes procedimentos, tomando-se por base a metodologia proposta por Scandalios (1969) e/ou Alfenas et al. (1998), com algumas modificações:

Peroxidase (PO): a coloração ocorreu no escuro, à temperatura ambiente, por duas horas. Foram usados 0,065g de 3-amino-9-etilcarbazole; 5,0mL de dimetilformamida; 2,0 mL de CaCl₂; 4 gotas de H₂O₂ a 30%; 85 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0.

Catalase (CAT): Foram usados 100 mL de água destilada, 2 mL de H₂O₂, iodeto de potássio a 1% e ácido acético (1 mL para 100 mL de iodeto de potássio). O gel foi colocado em uma solução de 100 mL de água + 2 mL de H₂O₂ por 1 minuto e, em seguida, lavado por 1 minuto em água destilada. Então, o gel foi colocado numa solução de iodeto de potássio a 1%, acidificada com ácido acético. Permaneceu corando por 10 minutos.

Nas cubas, para as corridas eletroforéticas, foram usados: tampão borato de lítio 0,2 M, pH 8,3 (18,54 g de ácido bórico; 2,0g de hidróxido de sódio; água destilada para completar 1000 mL). Todos os géis, após a coloração, foram lavados e fixados em solução contendo álcool metílico + ácido acético + água destilada (1:1:1 v/v), por 20 minutos e, em seguida, fotografados e avaliados para a confecção dos zimogramas.

Resultados e Discussão

Indução de calos embriogênicos

Existe uma grande diversidade na descrição morfológica de calos embriogênicos de algodão (Shakanokho *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2003; Kumria *et al.*, 2003; Ikram-Ul-Haq, 2005). A identificação e seleção de calos com potencial embriogênico é um passo crucial na regeneração de plantas de algodão via embriogênese somática indireta. A falha em separar setores embriogênico daqueles não embriogênicos frequentemente resulta em que os calos potencialmente embriogênicos se tornem não embriogênicos (Shakanokho *et al.*, 2001). Neste trabalho foram selecionados como potencialmente embriogênicos os calos amarelo-esverdeados de textura frouxa e friáveis (Figura 1 E), semelhantes aos descritos por Mishra *et al.* (2003) e Ikram-Ul-Haq (2005).

Após quatro semanas de cultivo, os explantes mantidos nos meios MSB e MSB+FeEDTA(5X) não formaram calos (Figuras 1A e 1B). Os explantes do meio MSB1(Escuro) não produziram calos embriogênicos, mas sim calos translúcidos friáveis e brancos duros (Figura 1C). Houve formação de calos embriogênicos em 68,75% dos explantes no meio MSB1(3,4 Klx), 65,5% no meio MSB1(6,0 Klx) e 50% no meio MSB1+FeEDTA (5X) (Gráfico 1).

O crescimento dos calos foi medido em termos de produção de matéria fresca por explante aos 28 dias de cultivo. Nos meios MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx) e MSB1+FeEDTA(5X) o peso médio dos calos foi de 93; 84 e 61 mg, respectivamente. Em ausência de luz os explantes cultivados em meio MSB1(Escuro) formaram calos translúcidos friáveis, sem características morfológicas embriogênicas. O peso médio da matéria fresca desses calos chegou a 63 mg (Gráfico 2).

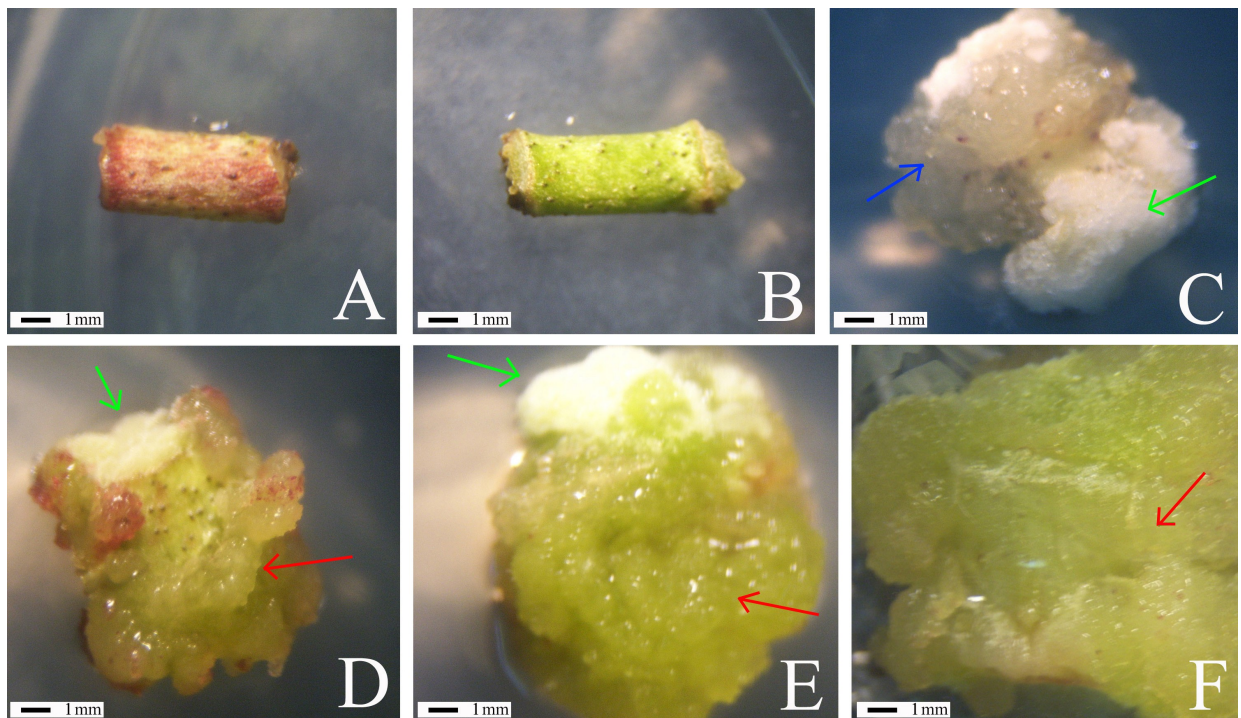


Figura 1. Aspecto dos explantes aos 28 dias de cultivo, nos diferentes meios e condições de cultivo. (A) Explante após 6 dias no MSB + FeEDTA(5X) e 22 dias no meio MSB; observa-se a ausência de calos e oxidação do explante. (B) Explante no meio MSB, sem formação de calos. (C) Explantes nos meios MSB1-Escuro: houve formação de calos friáveis, mas estes eram translúcidos e compactos (seta azul) ou brancos duros (seta verde).

(D, E, F) Calos friáveis amarelo-esverdeados (seta vermelha) produzidos nos meios MSB1 (com explantes vindos do meio MSB1 FeEDTA 5X), MSB1(3,4 Klx) e MSB1(6,0 Klx). Nesses explantes ocorreu também produção de calos branco duros (seta verde). Barra = 1,0 mm.

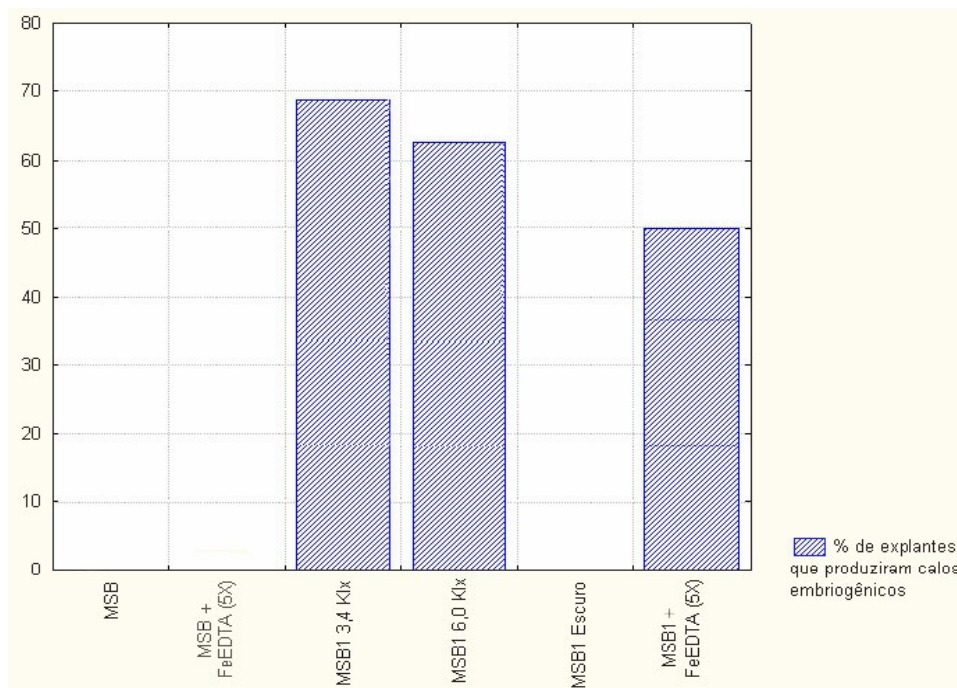


Gráfico 1. Porcentagem de explantes, na cultivar de algodão BRS-187-8H, que produziram calos embriogênicos nos meios MSB, MSB+FeEDTA(5X), MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB1(Escuro) e MSB1 FeEDTA (5X) utilizados para indução de calos embriogênicos.

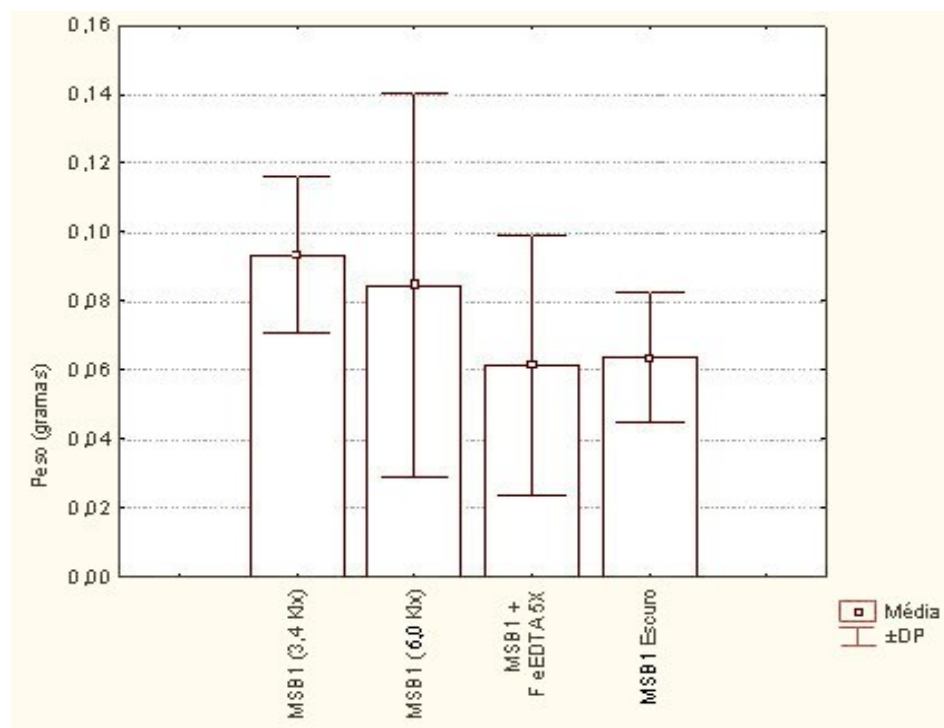


Gráfico 2. Peso médio da matéria fresca dos calos após 28 dias de cultivo dos segmentos de hipocótilo de algodão *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H nos meios de indução de calos: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB1+FeEDTA(5X) e MSB1 (Escuro).

Os explantes mantidos durante seis dias em meio MSB1+FeEDTA(5X) só começaram a produzir calos embriogênicos após a transferência para meio MSB1 sem excesso de ferro. A oxidação dos tecidos deve ter sido causada pelo excesso de ferro, por indução de um estresse oxidativo. Quando o excesso de ferro foi aplicado no meio MSB+FeEDTA(5X), durante 6 dias, observou-se necrose por oxidação após transferi-los e cultiva-los por 22 dias no meio MSB (Figura 1A). Esse resultado aponta para um efeito inibidor da embriogênese somática pelo FeEDTA nessa concentração e destaca a importância dos reguladores de crescimento, haja vista que, suprimindo o excesso de ferro no meio MSB1, os explantes responderam com a formação de calos friáveis embriogênicos.

Os explantes submetidos aos meios MSB1(3,4 Klx) e MSB1(6,0 Klx) não diferiram entre si com relação a oxidação dos tecidos, nem quanto à morfologia dos calos.

Eletroforese de isoenzimas antioxidativas

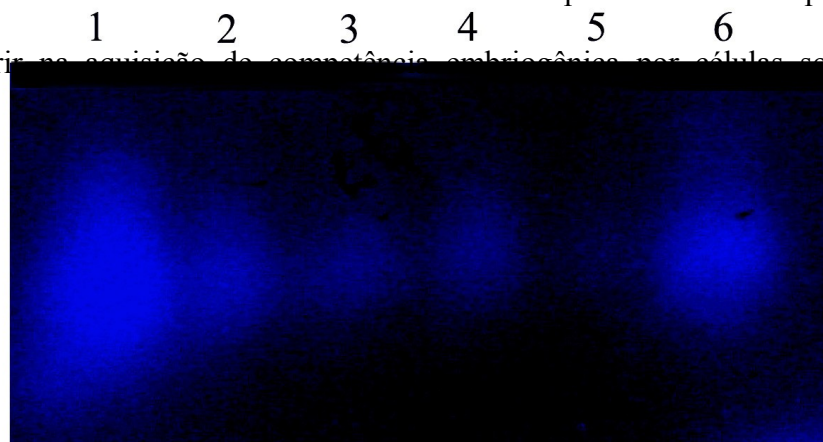
Os dois sistemas isoenzimáticos avaliados apresentaram variação na intensidade das bandas. O sistema catalase mostrou-se monomórfico, com apenas uma região de atividade anódica. Já o sistema peroxidase, também monomórfico, apresentou duas regiões de atividade, uma anódica e outra catódica.

No sistema catalase as amostras 1 e 6 de explantes mantidos em meio MSB+FeEDTA(5X) e MSB que não formaram calos, apresentaram bandas de maior intensidade (Figuras 9 e 10). Por outro lado, nas amostras de calos embriogênicos provenientes dos meios MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx) e MSB1+FeEDTA(5X) as bandas eram de intensidade média, enquanto que nas amostra de calos obtidos no meio MSB1 cultivados no escuro a banda correspondente à CAT aparece muito fracamente, demonstrando a baixa atividade dessa isoenzima nesses calos (Figuras 2 e 3).

Resultados similares foram obtidos num estudo comparando calos provenientes de segmentos de hipocótilo de *Mesembryanthemum crystallinum* com diferente potencial para rizogênese ou embriogênese somática, onde Libik *et al.* (2005) constataram que os calos que não apresentavam capacidade regenerativa exibiam elevada atividade da CAT, enquanto que os calos potencialmente embriogênicos mostravam baixa atividade de CAT e elevado teor de H₂O₂.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes *versus* compostos pré-oxidantes, levando ao aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre elas o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Cassells & Cury, 2001). As catalases destacam-se entre as enzimas do sistema antioxidativo como responsáveis pela conversão do H₂O₂ em H₂O. O H₂O₂, por sua vez, é apontado como um possível intermediário entre o estresse oxidativo e a regeneração de plantas na cultura de tecidos (Libik *et al.*, 2005) e atua como um mensageiro secundário envolvido na transdução de sinal com influência na expressão de mais de 100 genes em plantas (Desikan *et al.*, 2001). Uma atividade muito alta de enzimas do sistema antioxidativo pode reduzir a disponibilidade de H₂O₂ e interferir na aquisição de competência embriogênica por células somáticas (Gaj, 2004).

[-] Cátodo



Cat

[+] Ânodo

Figura 2. Gel eletroforético de isoformas da catalase em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H. As amostras foram extraídas de explantes de cada tratamento e estão numeradas: (1) Meio MSB + FeEDTA(5X); (2) MSB1 + FeEDTA(5X), (3) MSB1(3,4 Klx); (4) MSB1(6,0 Klx); (5) MSB1(Escuro); (6) MSB normal.

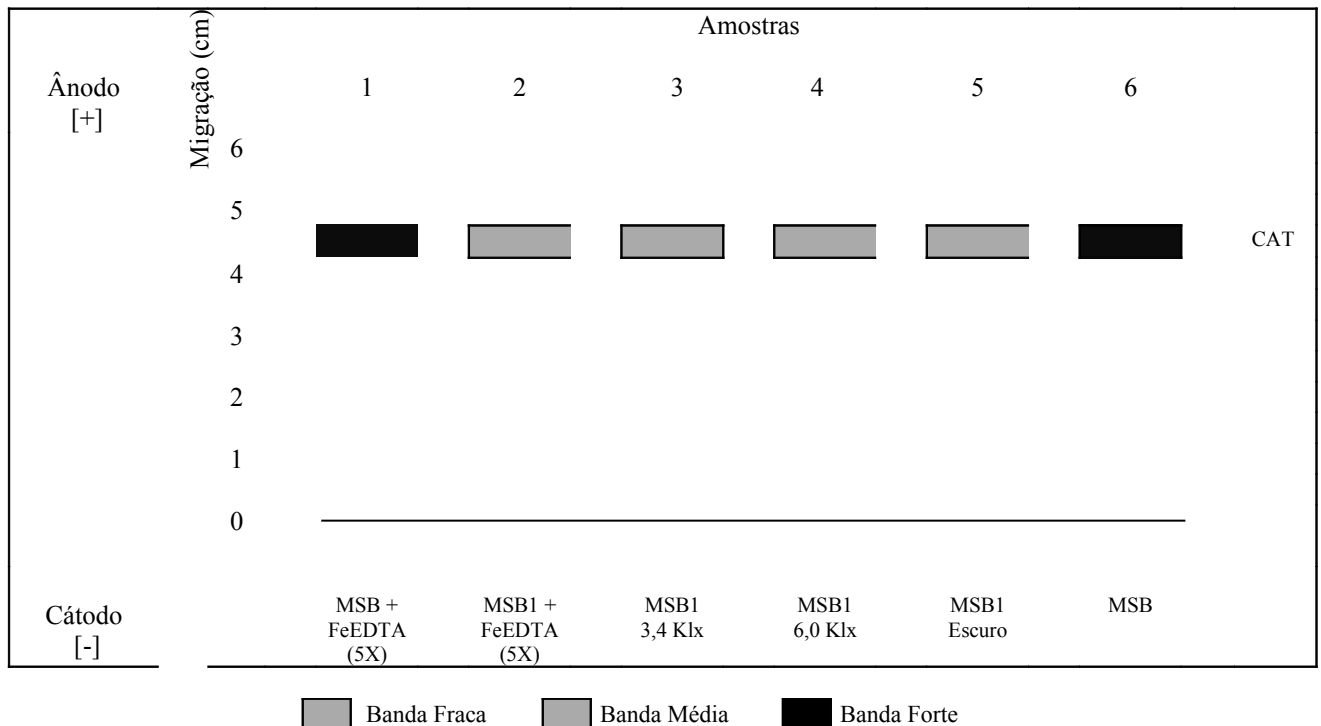


Figura 3. Zimograma das variações enzimáticas de Catalases (CAT) em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H, nos explantes submetidos a diferentes meios e condições de cultivo: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB + FeEDTA (5X), MSB1+FeEDTA (5X), MSB1 Escuro e MSB, durante 28 dias de cultivo.

Quanto ao sistema peroxidase (Figuras 4 e 5), as bandas que migraram para o pólo negativo (PO-2) apresentaram intensidade média a fraca, enquanto que na outra região de atividade, das bandas (PO-1) anódicas, o padrão de intensidade foi semelhante àquele observado para a CAT. Observou-se uma banda anódica de menor intensidade correspondente à amostra 5, a qual é proveniente dos calos translúcidos friáveis formados a partir de explantes cultivados no escuro no meio MSB1. As bandas mais intensas da PO-1

corresponderam às amostras dos tecidos do hipocótilo que não formaram calos. Essa similaridade de padrão de isoformas de CAT e PO já foi constatada em um estudo sobre o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a embriogênese somática de *Lycium barbarum* (Kairong et al., 1999). O incremento da atividade de peroxidases é fundamental no controle da ação de ROS responsáveis por danos oxidativos (Sreenivasulu et al., 1999).

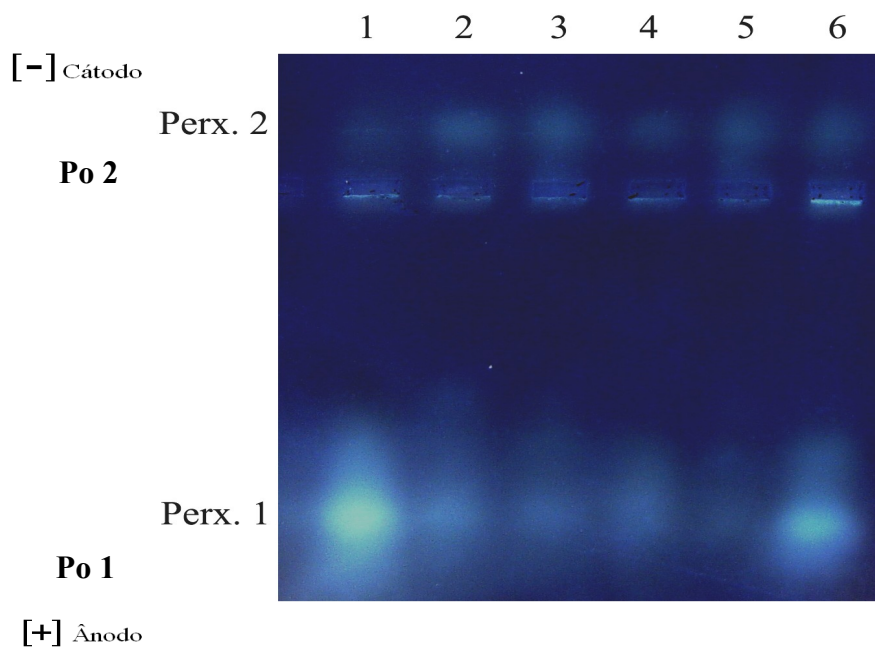
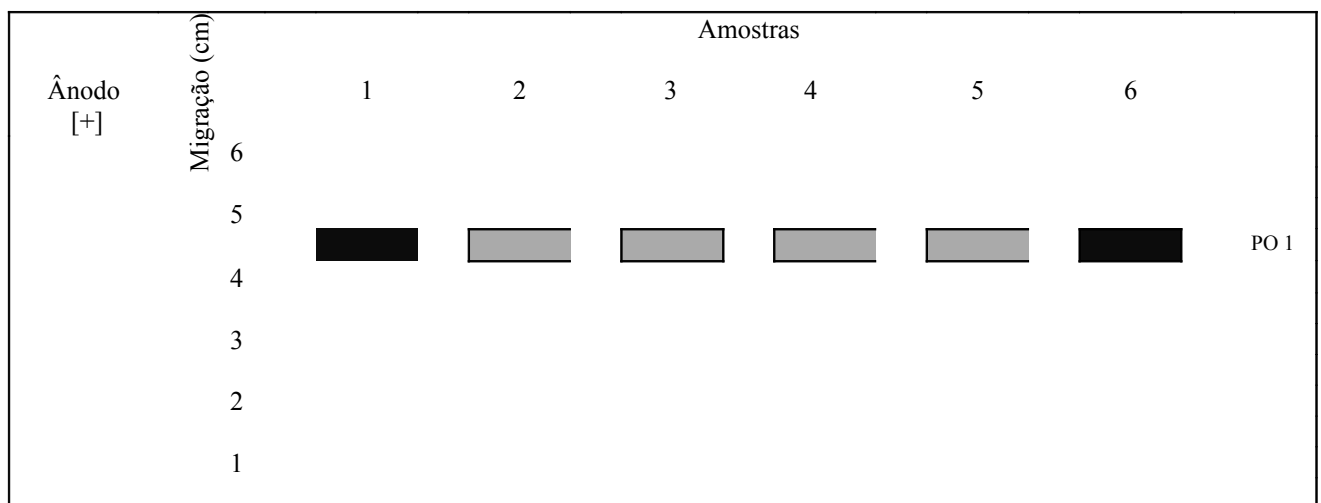


Figura 4. Gel eletroforético de isoformas da Peroxidase (Po) em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H, mostrando 2 padrões de bandas (Perx. 1 e Perx. 2). As amostras foram extraídas de explantes de cada tratamento e estão numeradas: (1) Meio MSB + FeEDTA 5X, (2) MSB1 + FeEDTA 5X, (3) MSB1 (3,4 Klx), (4) MSB1 (6,0 Klx), (5) MSB1 Escuro, (6) MSB normal.



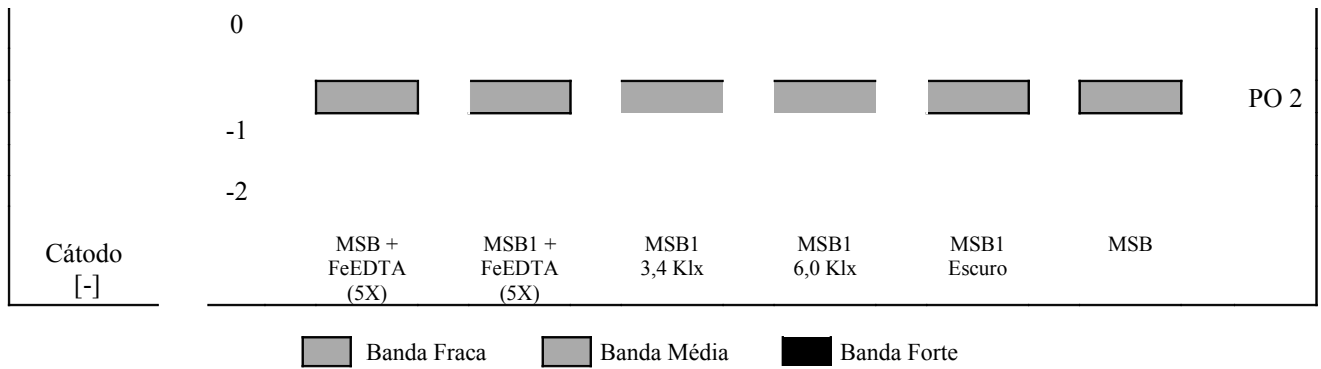


Figura 5. Zimograma das variações enzimáticas de Peroxidase (PO) em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H, nos explantes submetidos a diferentes meios e condições de cultivo: MSB1(3,4 Klx), MSB1(6,0 Klx), MSB + FeEDTA (5X), MSB1+FeEDTA (5X), MSB1 Escuro e MSB, durante 28dias de cultivo.

A presença das isoformas enzimáticas da peroxidase e catalase em calos embriogênicos e sua ausência em calos não embriogênicos, mostra uma possível correlação entre a capacidade embriogênica e eventos oxidativos na morfogênese de calos em algodão. Libik et al. (2005) sugeriu essa possível ligação entre diferenças no metabolismo antioxidante e o potencial morfogênético estudando esmbriogênese somática em *Mesembryanthemum crystallinum*.

Conclusões

- 1- Somente o excesso de FeEDTA não é capaz de induzir a formação de calos embriogênicos por estresse oxidativo.
- 2- A formação de calos embriogênicos em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H é dependente da ação de reguladores de crescimento e da presença de luz.
- 3- As isoformas das isoenzimas catalase e peroxidase estão relacionadas com os calos embriogênicos em *Gossypium hirsutum* cv BRS – 187 – 8H.

Referências

- ALFENAS, A. C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.
- CASSELLS A.C.; CURY R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.145-157, 2001
- CHOI, Y. E.; YANG, D. C.; CHOI, K. T. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, p.177-181, 1998.
- CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, n. 146, p. 9-16, 1999.
- DAVIDONIS, G. H.; HAMILTON, R.H.; Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. **Plant Sci. Lett.** N. 32, p.89-93, 1983.
- DESIKAN, R.; MACKERNES, S. A-H; HANCOCK, T. J.; NEILL, S. J. regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, N. 127, p. 159-172, 2001.
- GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; FROTA-CHAGAS CARVALHO, J.M. & PÉRES, C. Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. **Pesq. agropec. bras.**, v.32, n.5, p.485-488, 1997.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, N. 50, p. 151-158, 1968.
- GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Rep**, N. 23, p. 181-187, 2004.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embrigênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.2, 1998, p.533-568.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Somatic embryo germination and plant development from immature zygotic embryos in cotton. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, p.1946-1949, 2004.

HUSSAIN, S. S.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. Recurrent somatic embryogenesis and twin embryo production in cotton. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, p.141-145, 2005.

IKEDA-IWAI, M.; UMEHARA, M.; SATOH, S.; KAMADA, H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, v.37, p.107-114, 2003.

IKRAM-UL-HAQ. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, V. 4, p. 206-209, 2005.

KAIRONG, C.; GENGSHEG, X.; XINMIN, L.; GENGMEI, X.; YAFU, W. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Sci**, v. 146, p. 9-16, 1999.

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Rep**, v. 23, p. 834-841, 2005.

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

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

ÖZTÜRK, L. & DEMIR, Y. Effects of Putrescine and Ethepon on Some Oxidative Stress Enzyme Activities and Proline Content in Salt Stressed Spinach Leaves. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.89-95, 2003.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, P.; MISKOLCZI, P.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfafa. **Plant Physiology**, v.129, p.1807-1819, 2002.

SAKHANOKHO, H. F.; ZIPF, A.; RAJASEKARAN, K.; SAHA, S.; SHARMA, G. C. Induction of Highly Embryogenic Calli and Plant Regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) Cottons. **Crop Science**, n.41, 1235-1240, 2001.

SREENIVASULU, N; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and

peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

STATISTICA (data analysis software system), version 6. **StatSoft Inc.**, 2001.

SCANDALIOS, J. G., Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Biochemical Genetics**, New York, v.3, p. 37-79, 1969.

SREENIVASULU, N; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H.S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet differential salt tolerance. **Plant Science**, v.141, p.1-9, 1999.

ZHANG, B.H; FENG, R.; LI, X.L.; LI, F.L. Anther culture and plant regeneration of cotton (*Gossypium klotzschianum anderss*). **Chinese Sci. Bull.** v.41, p.145-148, 1996.

ZHANG, B-H.; FENG, R.; LIU, F.; WANG, Q. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. **Botanical Bulletin Academic Sinica**, N.42, p. 9-16, 2001.

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

ANEXOS

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PAB

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico para publicação. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassar a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

Os trabalhos devem ser encaminhados por via eletrônica para: pab@sct.embrapa.br

A mensagem que encaminha o trabalho para publicação deve conter:

- 1 Título do trabalho.
- 2 Nome completo do(s) autor(es).
- 3 Formação acadêmica e grau acadêmico do(s) autor(es).
- 4 Endereço institucional completo e endereço eletrônico do(s) autor(es).
- 5 Indicação do autor correspondente.
- 6 Acima de quatro autores, informar a contribuição de cada um no trabalho.
- 7 Destaque sobre o aspecto inédito do trabalho.
- 8 Indicação da área técnica do trabalho.
- 9 Declaração da não-submissão do trabalho à publicação em outro periódico.

Cada autor deve enviar uma mensagem eletrônica, expressando sua concordância com a submissão do trabalho.

O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título

* Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

* Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.

* Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

* Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

* As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura. * Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Nomes dos autores

1 Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

2

3 O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

* São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

* Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

1 Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

* O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

* Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

* Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.

1 O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.

2 Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

3

* O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

* A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.

* Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

* Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

.1 Não devem conter palavras que componham o título.

.2 Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução

* A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

* Deve ocupar, no máximo, duas páginas.

* Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

* O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

* A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.

* Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

* Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

.1 Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

.2 Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

.3

* Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

.4 Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.

* Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

* Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

* Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão

* A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

1 Deve ocupar quatro páginas, no máximo.

2 Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

3 As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.

4

* Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.

* Dados não apresentados não podem ser discutidos.

* Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

* As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.

* Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.

* As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

* O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

* Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.

- 1 Não podem consistir no resumo dos resultados.
- 2 Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- 3 Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

1 A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

2 Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).

* Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

* A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

* Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.

* Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.

* Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

- .1 Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- .2 Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- .3 Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- .4 Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- .5 Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BASTISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

Teses e dissertações

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 -Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: <<http://www.cpa0.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>>. Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

* Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

* A autocitação deve ser evitada.

Redação das citações dentro de parênteses

1 Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

2 Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

3 Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

4 Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

5 Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

6 Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

7 Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

* Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

1 Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.

2 No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

* Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

Tabelas

* As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.

* Devem ser auto-explicativas.

* Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

* Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

* O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

* No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

1 Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

2 Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo; a coluna indicadora é alinhada esquerda.

* Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

* Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em notade-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

1 Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.

2 Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

3

* As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

* Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

1 Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

2 Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ^{ns}(não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

* São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

* Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

* O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

* Devem ser auto-explicativas.

* A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

* Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

* Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

* O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.

* As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

* Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

* Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

* As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

* Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

* Devem ser gravadas no programa Word ou Excel, para possibilitar a edição em possíveis correções.

* Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

* No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

* Não usar negrito nas figuras.

* As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

* Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

NOTAS CIENTÍFICAS

* Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

APRESENTAÇÃO DE NOTAS CIENTÍFICAS

* A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- 1 Resumo com 100 palavras, no máximo.
- 2 Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- 3 deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

NOVAS CULTIVARES

* Novas Cultivares são breves comunicações de cultivares que, depois de testadas e avaliadas pelo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), foram superiores às já utilizadas e serão incluídas na recomendação oficial.

APRESENTAÇÃO DE NOVAS CULTIVARES

Deve conter: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, título em inglês, Abstract, Introdução, Características da Cultivar, Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação de Novas Cultivares são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- 1 Resumo com 100 palavras, no máximo.
- 2 Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- 3 deve apresentar, no máximo, 15 referências e quatro ilustrações (tabelas e figuras).

- 1 A introdução deve apresentar breve histórico do melhoramento da cultura, indicando as instituições envolvidas e as técnicas de cultivo desenvolvidas para superar determinado problema.
- 2 A expressão Características da Cultivar deve ser digitada em negrito, no centro da página.

3 Características da Cultivar deve conter os seguintes dados: características da planta, reação a doenças, produtividade de vagens e sementes, rendimento de grãos, classificação comercial, qualidade nutricional e qualidade industrial, sempre comparado com as cultivares testemunhas.

OUTRAS INFORMAÇÕES

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.
- **Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica, Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB, Caixa Postal 040315, CEP 70770-901 Brasília, DF.**