

O USO DE HAPLÓIDES DE ALGODOEIRO EM CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS¹

JOEL FALLIERI² e JOHNIE N. JENKINS³

RESUMO - Plantas haplóides ($n = 26$ cromossomos) de algodoeiro oriundas das linhagens semigaméticas de *Gossypium barbadense* L. 73-4003 e 74-4116 com marcador genético "virescent 7" foram empregadas como fêmeas em cruzamentos com variedades diplóides ($2n = 4x = 52$ cromossomos) de algodão Upland (*Gossypium hirsutum* L.). Todos os cruzamentos foram viáveis e produziram capulhos triloculares de tamanho reduzido, com uma semente, a exceção de um, com duas sementes. As sementes tiveram germinação normal sendo que a geração F_2 apresentou plantas vigorosas e bem desenvolvidas. A população F_1 exibiu características de híbridos interespecíficos sendo que a segregação monóibrida observada em três plantas verdes normais para uma "virescent 7" demonstrou que os cruzamentos com haplóides produziram descendência híbrida semelhante a cruzamentos entre plantas diplóides.

Termos para indexação: semigamia, haplóides.

THE USE OF HAPLOIDS OF COTTON IN INTERSPECIFIC CROSSES

ABSTRACT - Haploid cotton plants ($n = 26$ chromosomes) from the semigametic virescent lines 73-4003 and 74-4116 (*Gossypium barbadense* L.) with genetic marker virescent 7 were used as female in crosses with normal ($2n = 4x = 52$ chromosomes) Upland varieties (*Gossypium hirsutum* L.). All crosses were feasible and produced trilocular bolls with one seeded boll but one which produced two seeds. These seeds had normal germination and the F_1 plants exhibit good development. The phenotype of the F_2 generation resembled normal interspecific hybrids and the segregation of three plants normal green to one virescent 7, indicated that crosses involving haploids plants as female with Upland (*Gossypium hirsutum* L.) diploid plants yielded a hybrid progeny like in crosses with diploid x diploid.

Index terms: semigamy, haploid.

INTRODUÇÃO

Na seção de abertura do primeiro Simpósio Internacional de Haplóides em Plantas Superiores, Riley (1974) apresentou diversos conceitos de interesse à caracterização da presente pesquisa. Ele definiu os haplóides de plantas superiores como esporófitos que possuem o número gametófitico de cromossomos. Eles representam assim uma separação na associação normal do número de cromossomos dos diplóides com os esporófitos e do número de cromossomos dos haplóides com os gametófitos. Os haplóides, entretanto, não são usualmente o produto da eliminação de gametófi-

tos distintos morfológica e fisiologicamente do ciclo de vida das plantas, uma vez que eles se originam do funcionamento partenogenético de algum componente do saco embrionário. Somente quando os haplóides originam-se de culturas de grãos de pólen é que serão esporófitos produzidos sem a participação da geração gametófitica completa.

A utilidade dos haplóides como material experimental excelente para estudos citológicos, genéticos e bioquímicos, bem como para trabalhos de melhoramento, tem sido reconhecida há anos por geneticistas e melhoristas de plantas. Harland (1955), por exemplo, enumerou diversas maneiras em que os haplóides podem ser usados em melhoramento genético comercial: na produção de linhagens puras; como base para transferência de caracteres desejáveis; como fontes de recombinantes puros em cruzamentos interespecíficos; como avaliador de fatores de resistência a pragas e doenças; como avaliador de mutações e como base para elucidações de problemas genéticos. Entretanto, a

¹ Aceito para publicação em 9 de junho de 1986.

² Eng. - Agr., M.Sc., Ph.D. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Caixa Postal 351, CEP 38100 Uberaba, MG.

³ Geneticista e Prof., Ph.D., USDA-ARS, Crop Science Research Laboratory, P.O. Box 5367, Mississippi State, MS 39762 USA.

produção de haplóides em número suficiente, tem sido o maior obstáculo para o seu uso. No que concerne ao algodoeiro, esta dificuldade já foi superada através do fenômeno da semigamia, conforme descrito por Turcotte & Feaster (1963, 1967, 1969, 1973 e 1974).

Harland (1936) trabalhou com haplóides de algodão da variedade "Sea Island" (*Gossypium barbadense* L.) e usou-os como fêmeas em cruzamentos. Ele relatou que uma determinada linhagem de "Sea Island", deu origem a haplóides, os quais tornaram-se parcialmente férteis como fêmeas em cruzamentos sem que, entretanto, houvesse a formação de pólen em suas anteras. Harland observou também que um haplóide produzia, praticamente, um capulho, quando polinizado por pólen da variedade "Sea Island" normal, o mesmo sucedendo em cruzamentos com espécies de $n = 13$ cromossomos, a saber: *Gossypium arboreum* L., *Gossypium harknessii* Brandg., *Gossypium armourianum* Kearney, *Gossypium anomalum* Wawra ex Wawra & Peyr., *Gossypium trilobum* (Moc. & Sess. ex DC.) Skov. emend. Kearn. e *Gossypium aridum* (Rose & Standl) Skov.

A discussão de Harland a respeito de sua pesquisa revelou que os cruzamentos realizados produziram frutos, os quais possuíam em geral uma semente, embora em um cruzamento de *Gossypium armourianum* Kearney houve a formação de duas sementes viáveis. Em outros algodões "Sea Island", utilizados por Harland em seus estudos, apresentaram-se menos férteis, sendo que poucos eram estéreis. Ele estudou também alguns haplóides de algodão Upland (*Gossypium hirsutum* L.), os quais revelaram-se completamente estéreis.

Com estas pesquisas, Harland concluiu que não há somente uma base genética controlando a frequência de aparecimento de haplóides em linhagens diferentes, mas o grau de fertilidade dos haplóides é também uma função de sua constituição genética. Webber (1938), encontrou uma semente com embriões gêmeos haplóide-diplóide em *Gossypium barbadense* L. Ele descreveu o haplóide como anão em porte, com folhas e flores pequenas e reduzida fertilidade. Ele conservou esta planta haplóide, a qual em três anos produziu três sementes resultantes de polinização natural e uma proveniente de autofecundação.

Webber (1938) tentou fazer cruzamentos recíprocos entre este haplóide e diversos algodões americanos normais da espécie *Gossypium hirsutum* L. mas não obteve sucesso. Já Barrow (1971), observou a formação de uma semente resultante de polinização aberta de uma das doze plantas haplóides em estufa, onde o cruzamento natural foi estimado em menos de 1%.

O mesmo autor estudou a meiose e o desenvolvimento de pólen em um algodoeiro haplóide originado de sementes de uma linha semigamética "virescent" (*Gossypium barbadense* L.). Ele observou que, quando todos os cromossomos estavam arranjados em linha e próximos, todos se agrupavam na mesma placa. Em cerca de 250 configurações de metáfase, Barrow observou cinco células-mãe de pólen com todos os 26 univalentes na mesma fase de metáfase, depois da dispersão dos univalentes pela espíndula. A divisão dos 26 univalentes em uma única placa produziu dois gametas geneticamente completos.

Com base nos dados de literatura disponíveis foi delineada a presente pesquisa para se determinar a possibilidade de produzir sementes viáveis de algodão, oriundas de plantas haplóides de *Gossypium barbadense* L. como fêmea, em cruzamentos interespecíficos com pais de algodão Upland (*Gossypium hirsutum* L.).

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas haplóides ($n = 26$ cromossomos) utilizadas neste trabalho são oriundas das linhagens de *Gossypium barbadense* L. 73-4003 e 74-4116 ($n = 4x = 52$ cromossomos) cedidas pelo Dr. Turcotte, sendo portadoras do caráter para semigamia e do marcador genético v_7v_7 ("virescent-7"). As referidas linhagens foram utilizadas como fêmeas nos diversos cruzamentos com os seguintes pais diplóides ($2n = 4x = 52$ cromossomos) Upland (*Gossypium hirsutum* L.): F₁ do cruzamento (Carolina Queen $Sm_1 \times ne_1 ne_1 ne_2 ne_2 L^9 L^9$), 'Paymaster 303', 'Coker 420-511' (Glabro), 'ORH' (folhas "okra" e brácteas "frego") e 'MO-HG' (alto gossípol). As linhagens foram plantadas em casa de vegetação e os cruzamentos realizados sem a emasculação das anteras das planta-mãe, uma vez que as mesmas eram completamente estéreis. Todos os cruzamentos foram devidamente identificados em etiquetas próprias. Os capulhos formados foram colhidos e suas sementes postas a germinar individualmente em pequenos vasos de turfa arranjados em bandejas de madeira. Após a germinação das sementes e de certo desenvolvimento dos

"seedlings", estes foram transplantados com os seus respectivos vasos para outros maiores. Um cotilédone de cada plântula foi retirado após a emissão e desenvolvimento da primeira folha definitiva para contagem dos cloroplastos. Dos referidos cotilédones tirou-se três tiras da epiderme inferior para exame microscópico a fim de se determinar o nível de ploidia, de acordo com a técnica desenvolvida por Chaudhari & Barrow (1975). Contou-se quinze células-guarda dos estômatos por faixa de epiderme. As sementes da geração F_2 foram plantadas em vasos e os "seedlings" delas resultantes foram avaliados para determinação de suas origens: materna-"virescent v₇v₇" ou paterna verde normal (V_1V_1). Empregou-se o teste de X^2 para análise dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de capulhos obtidos para todos os cruzamentos foi consideravelmente mais baixo do que em hibridações envolvendo plantas normais como fêmeas. Após as hibridações, os frutos novos que abortaram foram examinados e não se encontrou sementes em formação em nenhum deles.

Apesar do baixo número de capulhos os resultados obtidos foram melhores do que os de Barrow (1971), uma vez que ele observou somente cinco casos em 250 configurações de metáfase, nas quais todos os 26 univalentes estavam agrupados na mesma placa. Os capulhos produzidos eram muito menores do que o normal, possuíam características do *Gossypium barbadense* L. e não se abriam muito bem. Cada capulho era trilobular, com um lóculo bem desenvolvido onde encerrava uma semente, exceto um único capulho do cruzamento da planta haplóide com o MO-HG, a qual produziu duas sementes em um lóculo (Fig. 1). Este resultado confirma o obtido por Harland (1936) quando ele utilizou uma linhagem haplóide de "Sea Island" (*Gossypium barbadense* L.) em cruzamentos com outro algodão "Sea Island" (*G. barbadense* L.) normal e com espécies de 13 cromossomos. Em seu trabalho, somente um cruzamento com a linhagem "Sea Island" haplóide x *Gossypium armourianum* Kearney produziu um capulho com duas sementes. Por outro lado, Harland (1936) não conseguiu sucesso com nenhum haplóide de origem Upland, os quais ele considerou serem completamente estéreis. Ele também usou linhagens de *Gossypium barbadense* L. como fêmeas, cruzadas com espécies de algodão com 13 cromossomos. Também

Webber (1938) não logrou sucesso nos cruzamentos efetuados entre haplóides de *Gossypium barbadense* L. com linhagens Upland utilizadas como machos, ao passo que a presente pesquisa apresentou resultados positivos em cruzamentos semelhantes.



- 1 = F_1
- 2 = planta haplóide
- 3 = Paymaster 303
- 4 = Coker 420 - 511
- 5 = ORH
- 6 = Mo - HG

FIG. 1. Capulhos dos cruzamentos entre plantas haplóides de origem semigamética e pais de algodão "Upland".¹

As sementes produzidas pelos diferentes cruzamentos foram plantadas individualmente em vasos e somente uma não germinou. Para se determinar a ploidia de cada "seedling" foi retirada uma de suas folhas cotiledonares para avaliação do número de cloroplastos de acordo com a técnica desenvolvida por Chaudhari & Barrow (1975). De cada cotilédone foram retiradas, da página inferior, três tiras de epiderme da base, parte média e superior como exemplificados na Fig. 2. Os resultados apresentados na Tabela 1 evidenciaram que em todos os cruzamentos o número de cloroplastos encontrado indicou serem diplóides os "seedlings" em questão. Os "seedlings" tiveram desenvolvimento normal e geraram plantas também normais, as quais floriram abundantemente. As flores eram de cor amarela intensa, com manchas púrpura à base das pétalas, anteras com coloração amarela

sulfurina, portadoras de abundantes grãos de pólen de cor amarela intensa. Tais características indicaram tratar-se de híbridos diplóides interespecíficos e férteis. As plantas de todos os cruzamentos produziram capulhos normais. Suas sementes foram plantadas em vasos e a população resultante (F_2) foi avaliada fenotipicamente, segundo a coloração dos "seedlings" ou seja, verde normal ou "virescent". A ocorrência destes dois tipos de plântulas é apresentada na Tabela 2, bem como o teste de X^2 . As frequências esperadas foram calculadas com base na hipótese de que os dados observados seguissem a razão fenotípica 3:1. O teste de X^2 evidenciou que todos os cruzamentos se ajustaram à razão monohíbrida teórica nas hibridações individuais e quando consideradas em conjunto, a 0,01% de probabilidade.

TABELA 1. Número médio de cloroplastos das células-guarda dos estômatos das folhas cotiledonares de plântulas de algodão, na geração F_1 .

Híbridagens	Regiões amostradas			\bar{X}	S
	Base	Média	Ápice		
H x 2 ¹	18.4	19.5	18.8	18.9	2.04
H x 4	17.2	17.9	17.5	17.5	1.78
H x 5	18.5	17.1	19.5	18.2	2.41
H x 7	20.0	21.5	19.0	20.2	2.30
H x 8	20.5	17.0	19.0	18.3	1.85

¹ H = planta haplóide.
2 = F₁
4 = Paymaster 303
5 = Coker 420-511
7 = ORH
8 = MO-HG

CONCLUSÃO

Conclui-se, através deste estudo, que os cruzamentos entre plantas haplóides semigaméticas ($2n = 26$ cromossomos) de *Gossypium barbadense* L. como fêmea com pais diplóides ($2n = 4x = 52$ cromossomos) de *Gossypium hirsutum* L., produziram descendência viável e, no caso particular, plantas híbridas interespecíficas.

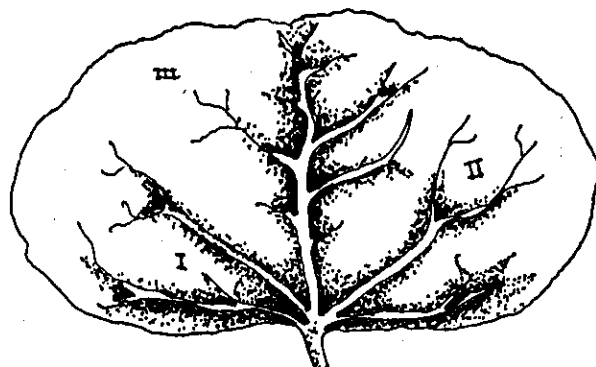


FIG. 2. Regiões das folhas cotiledonares amostradas para contagem de cloroplastos.

TABELA 2. Fenótipos observados na geração F_2 de hibridações envolvendo haplóides x algodoeiro normal.

Hibridações	Coloração da folha cotiledonar		X^2	
	Observada (Esperada)		(O - E) ²	Valor a 0.01%
	Normal V ₁ -	Virescent v _{7v7}		
H x 2 ¹	65 (63)	19 (21)	0.254	6.63
H x 4	38 (32)	04 (11)	5.580	
H x 5	70 (66)	18 (22)	0.970	
H x 7	48 (45)	12 (15)	0.800	
H x 8	72 (69)	20 (23)	0.520	
$X^2 (\Sigma)$			8.124	
Total	293 (275)	73 (92)	5.102	

¹ H = planta haplóide
2 = F₁
4 = Paymaster 303
5 = Coker 420-511
7 = ORH
8 = MO-HG

REFERÊNCIAS

- BARROW, T.R. Meiosis and pollen development in haploid cotton plants. *J. Hered.*, 62:139-41, 1971.
- CHAUDHARI, H.K. & BARROW, J.R. Identification of cotton haploids by stomatal chloroplast-count technique. *Crop Sci.*, 15:760-3, 1975.
- HARLAND, S.C. Haploids in polyembryonic seeds of Sea Island cotton. *J. Hered.*, 27:229-31, 1936.
- HARLAND, S.C. The use of haploids in cotton breeding. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 15:15-7, 1955.

- RILEY, R. The status of haploid research. In: KASHA, K.J. Haploids in higher plants; advances and potential. Guelph, Univ. of Guelph, 1974. p.3-10.
- TURCOTTE, E.L. & FEASTER, C.V. Haploids; high frequency production from single embryo seeds in a line of Pima cotton. *Science*, 140:1407-8, 1963.
- TURCOTTE, E.L. & FEASTER, C.V. Methods of production of haploids; semigametic production of cotton haploids. In: KASHA, K.T. Haploids in higher plants; advances and potential. Guelph, Univ. of Guelph, 1974. p.53-64.
- TURCOTTE, E.L. & FEASTER, C.V. The origin of 2n and n sectors of chimeral Pima cotton plants. *Crop Sci.*, 13:111-2, 1973.
- TURCOTTE, E.L. & FEASTER, C.V. Semigametic production of haploids in Pima cotton. *Crop Sci.*, 9: 653-5, 1969.
- TURCOTTE, E.L. & FEASTER, C.V. Semigamy in Pima cotton. *J. Hered.*, 58:55-7, 1967.
- WEBBER, J.M. Cytology of twin cotton plants. *J. Agric. Res.*, 57:155-60, 1938.