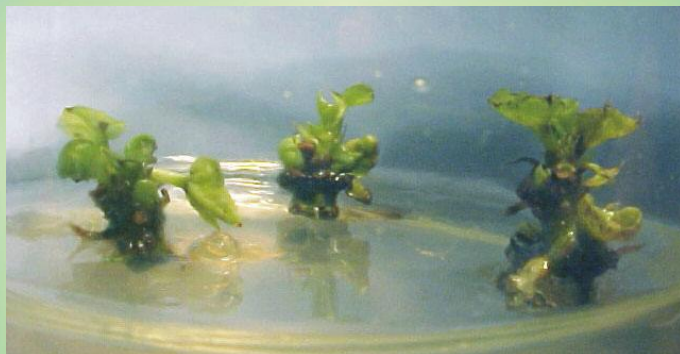


Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa **63** *e Desenvolvimento*

ISSN 0103-0841
Novembro, 2005

Indução de Múltiplos Brotos *In Vitro* a partir de
Ápices Caulinares da Cultivar de Algodão
CNPA-ITA 90II



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor-Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Luiz Paulo de Carvalho
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

José Renato Cortêz Bezerra
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

ISSN 0103-0841
Novembro, 2005

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 63

Indução de Múltiplos Brotos *in vitro* a
partir de Ápices Caulinares da Cultivar
de Algodão CNPA-ITA 90II

Marcia Soares Vidal
Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima
Eric Beserra de Melo Sousa
José Wellington dos Santos

Campina Grande, PB.
2005

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

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

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Márcia Soares Vidal
Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley
Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2005): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Indução de Múltiplos Brotos *in vitro* a partir de Ápices Caulinares da
Cultivar de Algodão CNPA-ITA 90II, por Márcia Soares Vidal e outros.
Campina Grande, 2005.

17p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 63).

1. Biotecnologia I. Vidal, M.S. II. Carvalho, J.M.F.C. III. Lima, L.H.G.
de M. IV. Sousa, E.B. de M. V. Santos, J.W. dos VI. VII. VIII. Título. IX.
Série

CDD 620.8

© Embrapa 2005

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões	15
Referências Bibliográficas	16

Indução de Múltiplos Brotos *in vitro* a partir de Ápices Caulinares da Cultivar de Algodão CNPA-ITA 90II

Marcia Soares Vidal¹

Julita Maria Frota Chagas Carvalho²

Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima³

Eric Beserra de Melo Sousa³

José Wellington dos Santos⁴

Resumo

Como um dos pré-requisitos para a transformação de plantas é o desenvolvimento de protocolos de regeneração, neste estudo foi desenvolvido um protocolo de micropropagação adequado à formação de múltiplos brotos *in vitro* em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA ITA 90 II. As sementes selecionadas foram lavadas e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo e, em seguida, enxaguadas três vezes com água deionizada estéril e, posteriormente, cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS, suplementados com 3% de sacarose; 0,65% de ágar e pH ajustado para 5,8, vedados com fita-filme. Esses tubos foram mantidos no escuro por um período de 48 – 72 horas e depois por 20-25 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ a um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro, para desenvolvimento da plântula. Dessas plântulas foi extraído o ápice caulinar, colocados em frascos contendo meio MS suplementado com diferentes combinações dos hormônios 6-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L⁻¹) e cinetina (CIN) (0,0; 1,0 mg.L⁻¹) e numerados de MB 0 (livre de hormônio) a MB 5. Dez frascos contendo três explantes cada um foram empregados por tratamento. Os frascos foram mantidos durante 45 dias e, então, foi coletado o número de brotos por explante e submetido a análise estatística. Os dados foram analisados mediante o procedimento “General Linear Model (GLM)” do SAS, destacando-se o meio MS suplementado com as combinações de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de CIN.

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

²Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Algodão. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

³Estagiários da Universidade Estadual da Paraíba, CEP 58109-753, Campina Grande, PB.

⁴Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Algodão. E-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

In vitro multiple shoot induction from stem apex obtained in cotton cv. CNPA-ITA 90II

Abstract

A prerequisite for cotton transformation is the development of regeneration protocols. In this study was developed a micropropagation method for the CNPA ITA 90 II cotton cultivar based on *in vitro* multiple shoots induction. Selected seeds were washed and desinfested with 1% . was removed by rising the seeds three times with sterile glass-distilled water and then inoculated in test tubes containing 10 ml of MS media, supplemented with 3% sucrose and 0.65% agar. The tubes were incubated in the dark for 48-72 h and then maintained for 20-25 at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a 16 h photoperiod. From these plantlets shoot apexis were were extracted and subcultured in baby food vessels containing MS media supplemented with different combinations of 6-Benzylaminopurine (BAP) (0.0; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 mg.l^{-1}) and Kinetin (KIN) (0.0; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 and 3.0 mg.l^{-1}) and numbered from MB0 (MS free of hormones) to MB25. Five flasks were used for each treatment with three explants per flask. The treatments were maintained for 45 days and then the number of shoots from each explant was collected and statistic analysed. The data were analysed by using the General Linear Model (GLM) of SAS program. MS medium supplemented with 1.0 mg.l^{-1} of BAP and 3.0 mg.l^{-1} of KIN produced the highest number of shoots.

Index terms: Cotton; Multiple shoots; Phytohormones

Introdução

O aproveitamento da planta do algodão (*Gossypium* spp.) é um dos mais completos, de vez que quase todas as suas partes podem ser utilizadas oferecendo, assim, variados produtos. O algodão, além de ser a fibra vegetal de maior utilização pelo homem, também é considerado a mais importante e, no setor agropecuário brasileiro, está entre as dez maiores fontes de riqueza.

Para o sucesso de qualquer exploração agrícola e, em especial, na cotonicultura herbácea, duas rotas devem ser consideradas continuamente: a genética, através da qual se buscam a melhoria da qualidade da fibra, o incremento na porcentagem da fibra, o aumento na produtividade e a resistência ampla a pragas e, sobretudo, a doenças, visando reduzir custos de produção e os níveis de agressão ao meio ambiente, e a rota denominada ambiental, objetivando a produtividade máxima econômica, com sustentabilidade global (BELTRÃO et al., 1999).

A cultura de tecidos é um processo através do qual pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos, em um meio nutritivo semidefinido ou definido (MANTELL et al., 1994). Explantes, como hipocótilo, meristema apical, nó cotiledonar e cotilédones, possuem a capacidade de originar plantas inteiras, desde que no meio de cultivo sejam utilizados os reguladores de crescimento adequados.

Dentro da cultura de tecidos, uma das metodologias empregadas é o superbrotamento que, a partir de um único explante cultivado nas condições ideais, possam ser geradas várias plantas geneticamente idênticas às do exemplar original e em menor espaço de tempo.

Sabe-se que as cultivares de algodão sofrem rápida deterioração devido à alta taxa de polinização cruzada natural do algodoeiro. Este fato faz com que a propagação vegetativa possua certas vantagens sobre a propagação sexual, visto que previne a deterioração das cultivares de alta qualidade, manutenção de linhas androestéreis e conservação de clones.

Os hormônios vegetais são biomoléculas prodigiosas, responsáveis por uma

infinidade de importantes eventos nas plantas, desde a divisão celular, no interior de um tecido, até os fenômenos mais externos e tangíveis, como o alongamento do caule, floração, frutificação, produção de borracha, entre outros aspectos de elevado impacto para o total sucesso do agronegócio (VALOIS, 2000).

Alguns tecidos vegetais são autônomos na síntese de fitohormônios, enquanto outros dependem da aplicação de reguladores junto ao meio nutritivo. A interação e o balanço entre os reguladores adicionados no meio e os fitohormônios produzidos de forma endógena nas células, regulam o crescimento e a morfogênese de células e tecidos *in vitro*. Desta forma, de acordo com a parte da planta da qual foi retirado o explante, mesmo sendo da mesma planta ou de uma espécie para outra, as concentrações de reguladores a serem utilizados devem variar. Esta variação se deve às diferenças endógenas naturais nos níveis dessas substâncias.

Quando se trata de regeneração de plantas, as citocininas são um componente essencial nos protocolos, e isto é aplicado à área de comercialização de plantas *in vitro*, transformadas ou não, ou seja, ao campo biotecnológico.

O presente trabalho teve por objetivo a seleção de meio(s) de cultura que induzisse(m) múltiplos brotos *in vitro*, a partir de meristema apical, da cultivar CNPA ITA-90II.

Material e Métodos

Local de desenvolvimento do projeto

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Cultura de Tecidos parte integrante do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão – CNPA, localizada na cidade de Campina Grande, PB.

Planta matriz

Sementes da cultivar CNPA ITA-90 II desenvolvidas pela Embrapa Algodão, foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 20

minutos e, a seguir, enxaguadas 3 vezes em água destilada estéril e posteriormente cultivadas em tubos de ensaio de 25x150mm, fechados com tampa de polipropileno e vedados com fita-filme. Cada tubo recebeu 10mL de meio contendo sais e vitaminas MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose a 3% e Ágar (Vetec) a 0,65%. As culturas foram incubadas no escuro, por 48-72 horas e mantidas durante 10 dias a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Indução de múltiplos brotos

Os explantes estudados neste trabalho constavam de ápice caulinar, originados a partir de plântulas com 15 dias, após o plantio. Na câmara de fluxo laminar e com auxílio de instrumentos cirúrgicos esterilizados, os nós cotiledonares e cotilédones foram excisados e descartados; assim, cada explante teve seu ápice caulinar. Os ápices caulinares foram inoculados em meio básico MS suplementado com combinações dos fitohormônios 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L^{-1}) e cinetina (CIN) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L^{-1}), em frasco de cultivo perfazendo, ao todo, vinte e cinco combinações diferentes (Tabela 1) e estas divididas em dois blocos: para o primeiro, foram designados MB0, MB1 a MB15 e, para o segundo, MB0, MB16 a MB25. Os MB0 são meios de controle, ou seja, não contêm combinações de fitohormônios.

Todos os meios foram suplementados com sacarose a 3% e Ágar a 0,65% e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 120°C . Em todos os casos, a incubação foi mantida a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Utilizaram-se 5 frascos por tratamento, com três explantes cada um.

A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para meio fresco a fim de se evitar problemas de oxidação e, após sete semanas, fez-se a análise dos explantes e somente aqueles que formaram mais que dois brotos por explante, foram considerados indução de múltiplos brotos.

Depois de feita a análise dos experimentos, um segundo experimento foi montado, mas só com alguns meios, com a finalidade de comprovar os

Tabela 1. Concentrações utilizadas por tratamento e seus respectivos valores médios referentes à variável número de brotos em algodão da cultivar CNPA ITA-90 II no primeiro experimento

Meio	Hormônio (mg.L ⁻¹)		Média ¹ CNPA ITA-90II
	KIN	BAP	
MB0	0,0	0,0	1,249 D
MB1	1,0	1,0	2,278 ABC
MB2	1,0	1,5	2,274 ABC
MB3	1,0	2,0	2,372 ABC
MB4	1,0	2,5	1,940 BC
MB5	1,0	3,0	1,897 BCD
MB6	1,5	1,0	2,101 ABC
MB7	1,5	1,5	1,970 ABC
MB8	1,5	2,0	2,039 ABC
MB9	1,5	2,5	2,066 ABC
MB10	1,5	3,0	1,960 BC
MB11	2,0	1,0	2,325 ABC
MB12	2,0	1,5	2,106 ABC
MB13	2,0	2,0	1,926 BC
MB14	2,0	2,5	1,736 CD
MB15	2,0	3,0	2,081 ABC
MB16	2,5	1,0	2,064 ABC
MB17	2,5	1,5	2,341 ABC
MB18	2,5	2,0	1,972 ABC
MB19	2,5	2,5	2,233 ABC
MB20	2,5	3,0	2,235 ABC
MB21	3,0	1,0	2,672 A
MB22	3,0	1,5	2,208 ABC
MB23	3,0	2,0	2,090 ABC
MB24	3,0	2,5	2,456 AB
MB25	3,0	3,0	2,223 ABC
CV% ²			24,852

¹Dados transformados em $y = \sqrt{x+1}$

²Coeficiente de variação

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

resultados obtidos no primeiro teste de indução de múltiplos brotos. Dos 25 meios testados selecionaram-se 13 (MB 1, MB 4, MB 5, MB 6, MB 7, MB 8, MB 10, MB 13, MB 14, MB 18, MB 21, MB 22 e MB 24) que continham maior número de amostras, visto que no primeiro experimento foram utilizados 5 frascos, com três explantes cada um, por tratamento, enquanto no segundo

experimento foram utilizados 10 frascos, também contendo três explantes por frasco.

O procedimento utilizado no segundo experimento foi igual ao primeiro, ou seja, os explantes foram transferidos para meio fresco a cada 15 dias e após sete semanas realizou-se a análise da indução de múltiplos brotos.

Análise estatística dos dados gerados

Analisaram-se os dados mediante o procedimento “General Linear Model (GLM)” do SAS, em que as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultado e Discussão

Na tabela 1 encontram-se as concentrações referentes à variável número de brotos em algodão da cultivar CNPA ITA-90 II no primeiro experimento. Pelos resultados observa-se que se destacou o meio MB 21 (MS suplementado com as combinações $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de CIN) (Figura 1), enquanto o meio MB 0, como já se esperava, não induziu a formação de múltiplos brotos (Figura 2). (Tabela 1).

A análise dos resultados do segundo experimento foi realizada da mesma forma que no primeiro; os resultados demonstraram que o meio MB 21 (MS



Fig. 1. Brotos induzidos no meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de CIN (MB 21).



Fig. 2. Brotos do meio MS (testemunha) apresentando apenas alongamento, sem formação de múltiplos brotos

suplementado com as combinações 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de CIN) é, realmente, o mais indicado para indução de múltiplos brotos em algodão da cultivar CNPA ITA-90 II, confirmando o que ocorreu no primeiro experimento. Outro meio que também se destacou foi o MB 24 (MS suplementado com as combinações 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de CIN) despontando novamente como grande indutor de superbrotamento para a mesma cultivar (Tabela 2).

Como neste trabalho, em outros também se utilizaram concentrações de BAP e CIN, para induzir a micropropagação *in vitro* de cultivares de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Um desses foi realizado por Sousa et al. (2004) utilizando a cultivar CNPA 97-668, no qual informou, que as concentrações mais indicadas das citocininas BAP e CIN na indução de superbrotamento foram,

Tabela 2. Valores médios de tratamentos referentes à variável número de brotos em algodão da cultivar CNPA ITA-90 II, no segundo experimento

Meios	Médias ¹
MB 1	2,058E
MB 4	2,204 CDE
MB 5	2,176 CDE
MB 6	2,317 BCDE
MB 7	2,391 BCD
MB 8	2,285 BCDE
MB 10	2, 144 DE
MB 13	2,451 BC
MB 14	2,319 BCDE
MB 18	2,242 CDE
MB 21	2,855A
MB 22	2,198 CDE
MB 24	2,566 AB
CV ² %	15,265

¹Dados transformados em $y = \sqrt{x+1}$

²Coeficiente de variação

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

respectivamente, 1,5 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹. Carvalho et al. (2000) constataram, utilizando as mesmas citocininas, que apenas a cinetina (CIN) não teve efeito na indução dos brotos, mas só o BAP, ou este, associado a cinetina, induziu superbrotamento e que o melhor meio de indução de brotos foi suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 2,5 mg.L⁻¹ de cinetina. Esta mesma concentração de BAP e CIN foi a ideal para indução *in vitro* de múltiplos brotos e regeneração de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L. cv. Anjali-LRK 516) segundo o estudo realizado por Agrawal et al. (1997), cuja diferença se deu quando os explantes foram cultivados em tubos de vidro, resultando em uma média de 4,7 brotos/explante mas, quando cultivados em frascos, a média foi de 8,3 brotos/explante; apesar de se ter utilizado cultivares de algodão (*G. hirsutum*) em todos os estudos, a concentração de BAP variou para mais e do CIN para menos, em todos os casos, demonstrando que, dependendo da cultivar, o efeito de cada citocinina pode variar, sendo mais atuante que a outra, no que diz respeito à indução de brotos *in vitro*, tornando-se necessário o estabelecimento de um protocolo ideal de concentração entre essas citocininas, para indução da propagação clonal *in vitro*.

Existem várias outras cultivares nas quais foram utilizadas combinações dos fitohormônios BAP e CIN, no intuito de promover a sua propagação clonal *in vitro*. Estudos descritos por Carvalho et al. (2000), como o de Taylor e Dukic (1993) em que os resultados em *Saccharum spp.* mostraram maior indução de número de brotos usando-se combinações de BAP e cinetina que em relação a outros fitohormônios e os realizados por Agrawal et al. (1997) em que a indução de superbrotamento foi obtida em *Vanilla walkeriae* quando utilizada a combinação de BAP e cinetina na presença de caseína hidrolisada, no trabalho de Oliveira et al. (2003) no qual foram utilizadas diferentes concentrações das citocininas BAP e CIN, obteve-se por conclusões que a micropropagação de *T. fuchsiaefolia* foi positivamente influenciada por citocininas e a cinetina induziu à formação de mais caules por explantes que a citocinina BAP.

Mediante os trabalhos descritos na literatura observa-se que as citocininas são usadas nas mais diversas cultivares e concentrações, podendo ser utilizadas individualmente, como no trabalho de Rogalski et al. (2003) que testaram o efeito da citocinina BAP na multiplicação *in vitro* da ameixa 'Santa Rosa', combinadas entre si, assim como os trabalhos já citados, ou até mesmo

associadas às auxinas, tal como a pesquisa desenvolvida por Brum et al. (2002) em que se utilizaram concentrações de BAP e ANA para promoção de propagação *in vitro* da figueira, com o intuito de determinar a concentração mais adequada para formação de múltiplos brotos *in vitro*, nas suas respectivas cultivares.

O número de estudos já realizados demonstra grande avanço na biotecnologia vegetal, visto que, uma vez determinado o meio adequado para certa cultivar, tornam-se mais fáceis os trabalhos a serem realizados, visando a transgenia ou mesmo ao melhoramento genético, pois a partir de um explante se obtêm várias plantas geneticamente idênticas, resultando em uma área menor de cultivo, com menores gastos e maior número de plantas a serem testadas, de grande valia no ramo do agronegócio.

Conclusões

- O meio MB 21, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de CIN, apresenta os melhores resultados para indução de múltiplos brotos da cultivar CNPA ITA-90 II.
- O meio MB 24, suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de CIN, se mostra, nos dois experimentos, grande indutor de múltiplos brotos;
- O meio MB 0, usado como controle, não induziu a formação de múltiplos brotos.

Referências Bibliográficas

AGRAWAL, D.C.; BANERJEE, A.K.; KOLALA, R.R.; DHAGE, A.B.; KULKARNI, A.V.; NALAWADE, S.M.; HAZRA, S.; KRISHNAMURTHY, K. V.. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports, v. 16, 1997. p. 647-652.

BELTRÃO, N.E de M.; SOUZA, J.G. de; GUERRA, J.S.; TAKIZAWA, E. Manejo cultural do algodoeiro herbáceo na região do cerrado. In: FARIAS, F.J.C.; AGUIAR, P.H.; FREIRE, E.C.; HIROMOTO, D.M.(Ed.) Mato Grosso: liderança e competitividade. Rondonópolis: Fundação MT, 1999. p. 70-86. (Fundação MT. Boletim 3).

BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). Ciência agrotecnica, Lavras, , p.1403-1409, dez., 2002. (Edição Especial)

CARVALHO, J.M.F.C.; SOUZA, D.M. de; SANTOS, J.W. dos. Indução de superbrotamento e regeneração de planta *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H. Revista de oleaginosas e fibrosas, Campina Grande, v.4, n.2, p. 61 - 65, maio – ago. 2000.

CID, L.P.B. Citocininas. In: CID, L.P.B. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, p.73

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiology, v.15 p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A.J.B. de; CARVALHO, V.M. de; FERREIRA, A. *et al.* Multiplicação *in vitro* de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). Revista Árvore, v.27, n.4, p.421-425, jul./ago. 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, Susan E. Biologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RICHETTI, A.; MELO FILHO, G.A. de. Aspectos socioeconômicos do algodoeiro. In: Embrapa Agropecuária Oeste (Dourados, MS) Algodão: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste/ Embrapa Algodão, 2001. p. 13-34.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. Revista Brasileira de Fruticultura, v.25, n.2, p.365-367, 2003.

SANTOS, E.K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B., BERED, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 415-444.

SOUSA, E.B.M.; LIMA, L.H.G.M.; CARVALHO, J.M.F.; SANTOS, J.W.; VIDAL, M.S. Indução *in vitro* de superbrotamento a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97-668. In: Congresso Nacional de Botânica, 55; Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES, 26. Viçosa, 2004. Anais...Campina Grande – Embrapa Algodão, 2004. p. 178.

VALOIS, A.C.C. Apresentação. In: CID, L.P.B. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 7.

Embrapa

Algodão



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

