

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Agosto, 2006 **150**

**Considerações Gerais Sobre
Organogênese**



Embrapa

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Luís Carlos Guedes Pinto
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

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

José Renato Cortez Bezerra
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0205
Agosto, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 150

Considerações Gerais Sobre Organogênese

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Nara Wanderley Pimentel
Priscila Simone Ribeiro Aires
Lívia Wanderley Pimentel

Campina Grande, PB.
2006

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: Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

Luiz Paulo de Carvalho

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: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

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 (2006) 1.000 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)

Considerações Gerais Sobre Organogênese, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e outros. Campina Grande, 2006

26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 150)

1. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Pimentel, N.W. III. Aires, P.S.R.
IV. Pimentel, L.W. V. Título. VI. Série.

CDD620.8

© Embrapa 2006

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário,
CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Nara Wanderley Pimentel

Estagiarias da Embrapa Algodão graduada do curso de Ciência
Biológica da UEPB Estagiário da Universidade Estadual da Paraíba,
CEP 58109-753

Priscila Simone Ribeiro Aires

Estagiarias da Embrapa Algodão graduada do curso de Ciência
Biológica da UEPB Estagiário da Universidade Estadual da Paraíba,
CEP 58109-753

Livia Wanderley Pimentel

Estagiarias da Embrapa Algodão graduada do curso de Ciência
Biológica da UEPB Estagiário da Universidade Estadual da Paraíba,
CEP 58109-753

Apresentação

A organogênese é uma técnica de micropropagação de importância muito significativa para acelerar os programas de melhoramento de plantas e, conseqüentemente, no processo de obtenção de plantas transgênicas; já que as técnicas da engenharia genética estão amplamente baseadas no cultivo de tecidos, pois a transformação requer que se possa cultivar in vitro protoplastos células e tecidos de plantas aos quais serão incorporados os genes e que a partir das células transformadas se possam regenerar plantas.

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Considerações Gerais Sobre Organogênese.....	10
Introdução.....	10
Procedimentos utilizados na indução da organogênese.....	13
Meios nutritivos	14
Hormônios e reguladores de crescimento	15
Organogênese em diferentes culturas : fatores que afetam a organogênese.....	17
Organogênese em algodão.....	21
Conclusões	22
Referência Bibliográfica	23

Considerações Gerais Sobre Organogênese

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Nara Wanderley Pimentel
Priscila Simone Ribeiro Aires
Lívia Wanderley Pimentel

Introdução

Devido a seu significado econômico, as plantas há muito tem sido objeto de análise genética destinada a desenvolver variedades melhoradas (GRIFFITHS et al., 2002). A possibilidade de crescerem células, tecidos e órgãos em um simples meio de cultura com nutrientes, semelhante à cultura de microorganismos em tubos ou placas de petri, vem despertando o interesse de pesquisadores (TAIZ e ZEIGER, 2004). Nesse aspecto, a cultura de tecidos constitui um interessante recurso que se aplica a uma larga variedade de espécies vegetais.

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida, como um conjunto de técnicas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado. No presente, o maior impacto da cultura de tecidos está na área de multiplicação de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, porque os indivíduos produzidos são geneticamente idênticos (RAVEN et al., 2001).

Além de proporcionar um meio de produzir cópias idênticas de uma planta, a micropropagação também proporciona meios para obtenção de plantas isentas de doenças. Isto é devido, em parte, à descontaminação dos explantes, às condições estéreis empregadas e, principalmente ao uso da

técnica de meristemas e ápices vegetativos (RAVEN et al., 2001). Contudo o sucesso de programas de transformação estável de genes depende do potencial de regeneração da espécie em estudo o qual é influenciado pelo genótipo utilizado, pelas concentrações de hormônios, tamanho dos explantes, composição do meio nutritivo e condições de cultivo (FERREIRA et al., 1998).

Grattapaglia e Machado, (1998), assim como, González, et al (2002) ressaltam a importância do tipo de explante utilizado e sua subsequente manipulação, desta forma, a micropropagação pode ser conduzida por (1) multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares, (2) multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta e (3) multiplicação via embriogênese somática.

A organogênese direta refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos (câmbio vascular, base do pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas, segmentos de raízes, entre outros) que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressam. A fase da organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A obtenção de organogênese *in vitro* é atualmente um processo empírico onde são testados para cada espécie, ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, as seguintes condições: I) fonte de explante; II) composição mineral do meio de cultura (suas vitaminas e fonte de carbono) III) balanço hormonal e IV) condições ambientais (PERES, 2002).

Quanto à fonte do explante, haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogênica. Na composição mineral do meio de cultura, os componentes decisivos são os hormônios. Finalmente, as condições ambientais influenciam notavelmente a organogênese *in vitro*, sendo a luz o fator ambiental mais relevante (PERES, 2002).

Procedimentos utilizados na indução da organogênese

No processo de obtenção da organogênese algumas etapas devem ser seguidas para que se tenha maior probabilidade de obtenção de resultados satisfatórios. Inicialmente as sementes ou gemas são desinfestadas, lavadas com água corrente e detergente, e imersas em solução de hipoclorito, a 1% de cloro ativo mais uma gota de polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween 20 para cada 100ml de solução durante 20 minutos em agitação. O próximo passo é a tripla lavagem das sementes em água deionizada esterilizada em condições da câmara de fluxo laminar. As sementes são, então, inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio básico Murashige e Skoog (1962) meio MS, fechados com tampa de polietileno, vedados com fita-filme e mantidas durante 72 horas, em média, no escuro e posteriormente são mantidas durante 20 e/ou 25 dias com um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, até a formação da planta matriz.

Inicia-se então a etapa de indução da organogênese, utilizando-se explantes de hipocótilo, gemas cotiledonares, gemas adventícias, eixo apical e eixo embrionário que são inoculados em meio básico MS, suplementado com combinações de hormônios (geralmente auxinas e citocininas). A cada período de 15 a 30 dias os explantes são transferidos para um meio fresco, a fim de evitar-se problemas de oxidação, realiza-se a avaliação. No caso de ocorrer a organogênese, os explantes são transferidos para um novo meio básico de crescimento, sem hormônios, para que ocorra o alongamento dos brotos.

Após o período de alongamento, os brotos são transferidos para meios de cultura adequados, visando o enraizamento *in vitro* (caracterizado por formação de raízes adventícias). Segundo Grattapaglia e Machado (1998) a etapa seguinte é caracterizada pelo transplântio, envolvendo a transferência da planta da condição *in vitro* para a casa de vegetação, sendo submetida a uma fase de aclimação e endurecimento. Esta passagem é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. De acordo com Carvalho e Vidal (2003), a

aclimatação é um processo de adaptação da planta às condições ambientais, necessitando de alta umidade e temperaturas amenas.

Meios nutritivos

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. No desenvolvimento dos meios nutritivos para a cultura de tecidos, houve desde o início uma procura de meios definidos, de composição conhecida e controlada. Assim, torna-se possível a reprodução dos resultados em qualquer época ou lugar (CALDAS, et al 1998).

Os minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foi definida por White, em 1951 e utilizado durante anos como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. O meio MS de Murashige & Skoog (1962), foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folha de fumo, sendo utilizado na cultura de diversas espécies (CALDAS, et al 1998).

Os estudos da nutrição de plantas provenientes do âmbito da fisiologia vegetal informam que os elementos que compõem o meio nutritivo da cultura *in vitro* devem pertencer à categoria dos essenciais, isto é, a planta não se desenvolve na ausência deles. Existem dois grupos: os macronutrientes (fósforo, magnésio, nitrogênio, potássio, ferro e cálcio) e os micronutrientes (boro, manganês, cobre, zinco, cloro, molibênio, cobalto, iodo, níquel, alumínio). Um meio nutritivo também possui componentes orgânicos (açúcar, sacarose, glicose, sorbitol etc.), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico e piridoxina) e inositol (CID, 2001).

Segundo Caldas et al. (1998), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo fundamental para um ótimo crescimento do explante. Ferreira et al (1998), ressalta que os resultados com diferentes vitaminas parecem ser muito particulares para cada espécie e talvez para diferentes cultivares da mesma espécie, dependendo do tipo de explante. A tiamina destaca-se com efeito benéfico para a maioria das culturas.

Dentre os componentes do meio de cultura, a água é usada em maior quantidade, razão pela qual deve apresentar uma ótima qualidade; impurezas presentes na água podem vir a afetar o desenvolvimento do explante *in vitro*, portanto, deve-se destilar e deionizar a água a ser empregada no preparo do meio de cultura (SANTOS, 2003).

Por fim, um componente crucial para o meio nutritivo são os hormônios vegetais. Segundo Castro et al. (2005), o hormônio vegetal é um composto orgânico, não nutriente, de ocorrência natural, produzido na planta, que em baixas concentrações promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal.

Os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos, sendo que a cultura em meio líquido normalmente exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante. Os meios sólidos ou semi-sólidos, podem ser solidificados com ágar (um polissacarídeo extraído de algas marinhas), phyta-gel (gomas produzidas por certas bactérias) ou amido (utilizado em cultura de anteras de cevada e explantes de tubérculos). A escolha do agente de solidificação depende da espécie da planta e das condições de cultivo (FERREIRA et al. 1998)

Hormônios e reguladores de crescimento

Para o desenvolvimento de uma planta, é fundamental a presença de controladores de crescimento, os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico) considerados os reguladores químicos das plantas.

A adição de fitorreguladores em meios nutritivos tem o objetivo principal de suprir possíveis deficiências de teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Simultaneamente, a adição de fitorreguladores estimula certa resposta como alongamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A escolha do fitorregulador a ser utilizado na cultura *in vitro* dependerá do tipo de morfogênese desejada; de seu nível endógeno no explante no momento da excisão; da capacidade do tecido sintetizar o regulador durante o período de cultura; e da possível interação entre os hormônios vegetais endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003).

Segundo Peres, (2002), os hormônios vegetais são os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura. Os principais hormônios utilizados na organogênese são as auxinas e citocininas. Outras classes de hormônios vegetais, como as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico ou mesmo outras substâncias que não sejam propriamente hormônios, muitas vezes, são utilizados em processos de regeneração organogenética.

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto em plantas e é um, dentre uma vasta gama, dos agentes químicos sinalizadores que regulam o desenvolvimento do vegetal, promovendo o desenvolvimento de nós, raízes adventícias e formação de calo. Baixos níveis de auxina são também necessários para o alongamento da raiz, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão (TAIZ e ZEIGER, 2004). As principais auxinas utilizadas no cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA).

As citocininas são básicas para métodos de cultura de tecidos e são extremamente importantes para a biotecnologia. De acordo com Taiz e Zeiger, (2004), as citocininas participam na regulação de muitos processos do vegetal induzindo a divisão celular em calos na presença de auxina, promovendo a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, entre outros.

O tipo de citocinina, assim como sua concentração são fatores fundamentais para o bom desempenho da multiplicação *in vitro*. Grattapaglia e Machado, (1998), ressaltam que as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) sempre são muito eficazes em promover a multiplicação, entretanto, não é regra absoluta e, conforme a espécie, outras citocininas podem apresentar melhores resultados. Furtado

(2004) destaca um composto do grupo das feniluréias, que desempenha atividade de citocinina, o tiadizuron (TDZ), que vem apresentando excelentes resultados na indução da organogênese.

A proporção ou balanço auxina/citocinina em meio de cultura, há muito, é aceita como determinante para a resposta organogênica. Altas razões auxina/citocinina geralmente induzem à formação de raiz, enquanto baixas proporções induzem à formação de brotos. Em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como calos (TAKAHASHI, 2002).

Organogênese em diferentes culturas : fatores que afetam a organogênese.

A regeneração de plantas via organogênese tem sido reportada em alguns trabalhos que procuram definir protocolos e metodologias adequadas para a propagação de diferentes culturas.

Ribeiro et al. (2005) estudando a indução do superbrotamento da cultivar de mamona BRS nordestina, observando a regeneração de plântulas nos explantes de eixo embrionário e gema apical e determinando o melhor meio nutritivo suplementado com a citocinina TDZ para o superbrotamento e melhor tratamento para o enraizamento *ex vitro*, verificou que o meio MS + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ favoreceu o melhor superbrotamento para os dois explantes, com médias de 6,5 brotos para o explante eixo embrionário e 6,6 brotos para o explantes gema apical. No enraizamento *ex vitro* o melhor tratamento observado foi Turfa + vermiculita + 0,125 g.L⁻¹ de AIA, com 75% de plantas enraizadas.

Furtado (2004) objetivando induzir o superbrotamento da cultivar de amendoim BR-1, utilizou o meio MS suplementado com combinações de hormônios 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tiadizurone (TDZ), nas concentrações de 0,0; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de cada citocinina e obteve a formação de múltiplos brotos para as três citocininas utilizadas, sendo o maior número de brotos alcançado quando utilizado o TDZ.

Carvalho et al. (2004) objetivando definir um protocolo eficiente de propagação de sisal induzindo *in vitro* o superbrotamento em gemas do gênero *Agave*, observou-se maior número de gemas em *Agave palmeri* para o meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e/ou 5,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA com 10% de água de coco em ambas as combinações; entretanto, constatou-se que tanto na *Agave neomexicana* como na *Agave lechuguilla*, houve maior número de indução de gemas com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA adicionado com 10% de água de coco.

Alves et al. (2004), testando a regeneração *in vitro* por organogênese a partir de explante caulinar de três clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* para avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento TDZ [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia], BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético), obtiveram melhores resultados de calejamento nos tratamentos com a combinação dos reguladores de crescimento TDZ (0,5 mg L⁻¹) e ANA (0,1 mg L⁻¹). Com isso, a intensidade de calejamento e a textura do calo são os parâmetros que devem ser usados na escolha de um tratamento objetivando a organogênese em eucalipto.

Em *Hypericum perforatum*, planta medicinal que apresenta propriedade cicatrizante e antidepressiva, Santarém e Astarita, (2003), propuseram um sistema otimizado de micropropagação via organogênese. As culturas *in vitro* foram iniciadas a partir de segmentos nodais de plantas adultas inoculadas em meio MS, suplementado com 4,5 μ M de BAP, KIN ou TDZ, individualmente ou combinados com 0,05 μ M de ANA. Explantes organogênicos foram obtidos em meio com 4,5 μ M de BAP ou KIN, ou combinações destes com ANA. A subcultura dos explantes no meio de proliferação contendo 4,5 μ M de BAP promoveu a organogênese. A maior média de brotos obtida na fase de proliferação foi de 52,6 brotos, naqueles explantes induzidos na presença de ANA e BAP. As plântulas enraizadas foram aclimatadas com sucesso.

Erig et al., (2003), em sua pesquisa com a multiplicação *in vitro* da amoreira preta (*Rubus idaeus*), assim como Dzazio et al (2003), estudando

a micropropagação da porta-enxerto de videira 420-A, concluíram que a maior quantidade de brotos em cada explante foi notadamente observada nos meios com a presença da citocinina BAP.

Almeida (2002), realizando um trabalho para definir protocolos de regeneração de plantas, via organogênese, para as laranjas, 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), e limão 'Cravo' (*Citrus limona* L. Osbeck), utilizando para a indução de brotações, segmentos de epicótilo cultivados em meio MT, suplementando com 0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mg.L⁻¹ de BAP, obteve melhores resultados na fase de brotações utilizando a combinação de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP para laranjas e 0,5 - 2,5 mg.L⁻¹ de BAP para limão 'Cravo'.

Batista et al (2001) estudando a indução de superbrotamento nas gemas cotiledonares de gergelim (*Sesamum indicum* L.) variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3, utilizando meio MS para desenvolvimento dos explantes e os hormônios BAP, 2IP e KIN, observaram maior quantidade de brotos no meio MS suplementado com concentrações de BAP.

Na análise da expressão do potencial de organogênese em explantes da canela sassafrás (*Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer), utilizando-se o meio MS com BAP, observou-se maiores valores de neoformação de gemas de segmentos nodais na concentração de 4 μM desse hormônio (SILVA, et al., 2001).

Moura et al. (2001) avaliaram o efeito do BAP na organogênese *in vitro* de laranja 'Pêra' e limão 'Cravo'. A utilização de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP adicionado ao meio de cultura MT + 25,0 g.L⁻¹ de sacarose proporcionou a melhor resposta organogenética na laranja 'Pêra', com 85% dos explantes responsivos e 2,53 brotações por explante. Para o limão 'Cravo', a melhor concentração adicionada ao meio MT foi 2,5 mg.L⁻¹, em que obteve-se 62,5% de explantes responsivos e 2,0 brotações por explante. Todas as brotações obtidas foram transferidas para meio de enraizamento (MT + 25,0 g.L⁻¹ de sacarose + 0,5 mg.L⁻¹ de carvão ativado + 1,0 mg.L⁻¹ de NAA), onde alcançou-se índice de enraizamento de 80% e 75% para limão 'Cravo' laranja 'Pêra' respectivamente.

Amaral (2001), estudando alguns fatores que influenciam a organogênese, bem como a regeneração *in vitro* de alfavaca (*Ocimum selloi Benth*), visando fornecer subsídios à transformação genética, analisou o efeito de concentrações de sacarose e sais no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares nodais desta espécie. Constatou que a concentração de 100% de sais do meio MS combinada com a concentração 2% de sacarose foi a melhor em sua propagação *in vitro*, em razão de se ter obtido brotos mais longos e com raízes grandes, resultando em maior peso do material vegetal. Estudando o efeito de concentrações de ANA e BAP e da posição dos explantes na indução de organogênese *in vitro* em segmentos caulinares internodais, verificou que o primeiro, o segundo e o terceiro segmentos caulinares internodais apresentaram, em meio de cultivo complementado com 1,00 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP, freqüência de calogênese de 60,00%, 50,00% e 60,00%, respectivamente. O primeiro, o segundo e o terceiro segmento caulinar internodal apresentaram, respectivamente, freqüência de organogênese de 93,33%, 73,33% e 73,33%, média de órgãos produzidos de 2,80, 1,80 e 1,80 e eficiência de organogênese de 2,60, 1,32 e 1,32 em meio de cultivo suplementado com 0,10 mg L⁻¹ de ANA e 1,00 mg L⁻¹ de BAP.

Caboni et al. (2000), utilizando ápices de brotações de macieira (Jork-9, M-26, Galae McIntosh), observaram que em todos os genótipos, 5% dos explantes tornaram-se necróticos e morreram poucos dias após a excisão, porém todos aqueles que sobreviveram regeneraram brotações. Para o número médio de brotações por explante, também não houve diferença significativa entre as gemas apicais e axilares, bem como para os tempos de permanência destas no meio de cultura de indução de regeneração.

Fari (2000), pesquisando a capacidade de regeneração das cultivares de tomateiro industrial (*Lycopersicon esculentum* Mill) IPA-5 e IPA-6, utilizando quatro composições de meio de cultura descritos na literatura e cinco variações de inoculação testou uma nova variação de inoculação, denominada cotilédone fendido (os cotilédones foram saporados ao longo da nervura central, da extremidade até sua metade, sete a oito dias após a semeadura) . A maior freqüência de formação de gemas vegetativas foi

100% no caso de IPA-5, e 65% no caso de IPA-6. No caso de IPA-5, o número de brotos obtidos foi maior quando a indução de gemas foi realizada em meio contendo BAP ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e AIA ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) seguido de três subcultivos, em meio como zeatina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Usando esse protocolo, a cultivar IPA-5 produziu uma média de 5,45 brotos alongados a partir do cotilédone fendido. Essa capacidade excedeu significativamente o cotilédone aparado, que produziu 4,4 brotos alongados por explante. No caso de IPA-6, a melhor combinação de meios e método de inoculação produziu 0,87 broto alongado por explante. Os brotos alongados foram enraizados.

Organogênese em algodão

O sucesso da técnica cultivo *in vitro*, no algodão, assim como em outras culturas, quase sempre está ligado às condições ideais de incubação nos laboratórios. A organogênese no algodoeiro possui inúmeras aplicações e tem dado grande contribuição em toda a área agrônômica. O aproveitamento da planta do algodão é um dos mais completos, pois com seus subprodutos são utilizados o óleo, o línter, a farinha de torta e a casca, todos extraídos da semente ou do caroço.

Tavares et al. (2005) estudando a multibrotação *in vitro*, a partir de gemas cotiledonares da cultivar de algodão CNPA 98-1034 utilizando diferentes concentrações de BAP e KIN, concluiu que as combinações de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN favoreceram o maior superbrotamento.

Rocha, (2004) pesquisando a indução de superbrotamento em algodão, empregando como explante de nós cotiledonares, plântulas cultivadas *in vitro* durante 25 dias utilizando o meio básico MS suplementado com citocininas BAP, KIN e TDZ, concluiu que o meio MS com BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) isolado ou associado com KIN ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), promoveu uma maior capacidade de regeneração e altura de brotos; o meio MS suplementado com BAP ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$) estimulou maior altura de brotos e o MS suplementado com TDZ ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) afetou a capacidade de regeneração de brotos, obteve formação de calos.

Lima (2004) estudando a indução de múltiplos brotos a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA ITA-90 II, cultivadas em meio MS básico com combinações dos fitormônios BAP (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.L⁻¹) e KIN (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg.L⁻¹), observou maior número de brotos no meio MS suplementado com as combinações 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de KIN. Sousa et al. (2004) utilizando a cultivar CNPA 97-668 observou o maior superbrotamento nas concentrações de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e 1,5 mg.L⁻¹ de KIN.

Carvalho (2000), ao pesquisar a indução de superbrotamento nas gemas cotiledonárias de plantas da cultivar CNPA 7H de algodão, utilizando para o desenvolvimento dos explantes o meio MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,5 mg.L⁻¹) ou KIN (0,0; 1,0; 2,5 mg.L⁻¹), observou o número de brotos por explante, tamanho e número de nós dos brotos. O meio suplementado com cinetina isolada, não teve nenhum efeito na indução de brotos, o meio que produziu o maior número de brotos foi o suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 2,5 mg.L⁻¹ de KIN.

Conclusões

A necessidade de maximizar o número de plantas regeneradas com a manutenção da fidelidade genética contribuiu para uma ampla diversificação das condições do cultivo *in vitro*, tanto para desenvolver novas cultivares como para fornecer outras alternativas para programas de melhoramento.

Para a definição de um sistema de regeneração via organogênese direta ou indireta, é necessário o estabelecimento de protocolos otimizados para cada espécie devido às características genéticas que determinam respostas diferentes.

Os trabalhos sobre organogênese em algodão ainda são escassos, mas o desenvolvimento de novas técnicas pode contribuir significativamente para o aumento da produtividade devido a grande variedade existente.

Referência Bibliográfica

ALMEIDA, W.A.B. de. **Caracterização anatômica da organogênese *in vitro* e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus sp.***

2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 5 nov. 2005.

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004.

AMARAL, C.L.F. **Morfogênese *in vitro* e transformação genética da alfavaca (*Ocimum selloi* Benth).** Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 5 nov. 2005

BATISTA, R.C.; CARVALHO, J.M.F.C.; ALMEIDA, F. de A.C.; MATA M.E.R.M.C. Micropropagação *in vitro* de três cultivares de gergelim. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**. v.5, n.3, p. 397-404, 2001

CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, v. 19, p.755–760, 2000.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1 p.87-132.

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**, v.4, n.2, p. 61-65,2000.

CARVALHO, J.M.F.C. e VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 2003. 39p. (Embrapa CNPA. Documento, 116).

CARVALHO, J.M.F.C.; CARTAXO, G.; COSTA, N. da; VIDAL, M.S. SANTOS, J.W. dos. Indução in vitro de superbrotamento em gemas de espécies do gênero *Agave*. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.2/3, p. 869-873,2004.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Ceres, 650p. 2005.

CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isto? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.3, n. 19, p 16-21,2001.

DZAZIO,P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, dez. 2002.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R. de L. 6-Benzilnopolurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus idaeus L.*), cv. Tupy. **Ciência Rural**. [online]. v. 32, n. 5, p. 765-770, 2003.

FARI, M.R.G.M. de e MELO, N. F. de. Avaliação da capacidade de regeneração in vitro em tomateiro industrial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.8, p.1523-1529, 2000

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH,1998. v.1. p.21-43.

FURTADO, C.M. **Micropropagação da cultivar BR-1 de amendoim (*Arachis hipogaea*) in vitro utilizando citocininas**. 2004. 57 f. Trabalho de Conclusão

de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1 p.183-260. 1998.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R.C. e GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A. de.; BERTOLO, A.L.; et al. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n. 26, p 18-22, 2002.

MOURA, T.L. de; ALMEIDA, W.A.B de; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A. Rivesed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

RIBEIRO, C.S.N.; SILVA, H.; CARVALHO, J.M.F.; AIRES, P.S.R. Micropropagação *in vitro* da mamoneira (*Rícínus communis* L.) via organogênese. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEPB, 13., 2004, Campina Grande. **Anais...**Campina Grande: UEPB, 2005. p.55.

ROCHA, M. do S. **Crioconservação e cultivo in vitro de sementes de algodão colorido**. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.

SANTARÉM, E.R.; ASTARITA, L.V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.1, p. 43-47, 2003.

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

SILVA, J.M.O.D. da. Cultura de embriões imaturos e organogênese. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 20, p. 44-48, 2001.

SOUSA, E. B. de M.; LIMA, L.H.G. de M.; CARVALHO, J.M.F.; SANTOS, J.W. dos; 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., 2004, Viçosa. **Anais...**Campina Grande: Embrapa, 2004. p.178.

TAKAHASHI, E.K. **Transferência do gene *atacína A* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAVARES, A.C.; M.; PINHEIRO, M.P.N.; JERÔNIMO, J.F.; CARVALHO, J.M.F.; VIDAL, M.S. Indução de multibrotações in vitro, a partir de gemas cotiledonares de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar CNPA 98 - 1034. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais...**Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005.p.11.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

