

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Maio, 2006

148

Fatores Inerentes À Micropropagação



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 148

Fatores Inerentes À Micropropagação

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Marina Medeiros de Araújo Silva
Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros

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 de Castro Arriel

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)

Fatores Inerentes À Micropropagação, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e outros. Campina Grande, 2006.

28p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148)

1. Micropropagação. 2. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Silva, M.M. de A. III. Medeiros, M.J.L. e IV. V. Título. VI. Série.

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

Marina Medeiros de Araújo Silva

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

Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros

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

Apresentação

É reconhecido por todos que a biotecnologia já é o grande paradigma da atual e a base do futuro da agricultura e assim da própria humanidade. Uma das ferramentas da biotecnologia é sem dúvida a micropropagação, já que a partir da cultura de tecidos in vitro é possível a obtenção de plantas geneticamente idênticas às do exemplar original, em um número elevado e num breve espaço de tempo, estando isto na dependência do controle da morfogênese, a qual é influenciada por vários fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes do meio de cultivo, reguladores de crescimento e ambiente do cultivo .

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Fatores Inerentes À Micropropagação.....	11
Introdução	11
Micropropagação	12
Fatores que Influem na Micropropagação	15
Micropropagação do algodão.....	21
Considerações finais.....	23
Referências Bibliográficas.....	25

Fatores Inerentes À Micropropagação

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Marina Medeiros de Araújo Silva
Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros

Introdução

A biotecnologia consiste na aplicação, em grande escala ou na transferência, para a indústria, dos avanços científicos e tecnológicos. Embora a palavra biotecnologia tenha sido usada a primeira vez em 1919, por um engenheiro agrícola da Hungria, as primeiras aplicações biotecnológicas pelo ser humano datam de 1800 a.C., com o uso de leveduras (organismo vivo) para fermentar vinhos e pães (produtos); desde então, o conceito de biotecnologia tem sido aplicado ao longo do tempo.

O crescimento acelerado do campo da biotecnologia, entretanto, ocorreu a partir da década de 70, com o desenvolvimento da engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante.

No que diz respeito à procura por tecnologias consideradas produtivas, foram alcançados, no mundo, avanços altamente significativos no uso da biotecnologia moderna, entendida como um conjunto de técnicas, que inclui transgenia, processos enzimáticos, clonagem, micropropagação, métodos de fecundação *in vitro* e outros. Agricultores e agroindustriais de vários países vêm usando recursos oferecidos pela biotecnologia para resolver problemas de eficiência e qualidade de produtos além de processos produtivos (CRIBB, 2004). Com suas técnicas específicas, a biotecnologia

modifica e melhora os sistemas biológicos. É reconhecida como o grande paradigma da atualidade e a base do futuro da agricultura e, lógico, da própria humanidade; seu uso elimina as barreiras biológicas normais, possibilitando a criação de plantas transgênicas (CARVALHO, 1999).

A biotecnologia moderna inclui metodologia avançada de genética, biologia molecular, cultura de células e tecidos, engenharia genética, clonagem de espécies e variedades biológicas, para fins produtivos.

O cultivo *in vitro* permite o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, sobre um meio nutritivo e em condições assépticas e ambientais (iluminação e temperatura) controladas. Esta técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões que originarão uma planta inteira (embriogênese somática) em um meio de cultivo favorável (CARVALHO, 1996).

A capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos, tem despertado a atenção de pesquisadores em virtude de sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética de plantas (KERBAUY, 1999).

Segundo Gyves¹ apud Carvalho (1996), o cultivo de tecidos teve início nos anos 30 mas logrou seu maior impulso nos anos 70, com um crescente interesse, tanto na aplicação a nível comercial (micropropagação), como por seu papel auxiliar em programas de melhoramento genético.

Micropropagação

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado em diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais se tem difundido e encontrado aplicações

¹GYVES, E.M. *Agrobiotecnologia*. México: Iberoamérica, 1994. 32p.

práticas comprovadas. Entre as vantagens de sua utilização, estão as possibilidades de se obter várias plantas a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente com fidelidade durante a multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (ERIG; SCHUCH, 2005).

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental e os Estados Unidos (ARAÚJO; CARVALHO, 2005). A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas, mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação de orquídeas (GRATTAPLAGLIA ; MACHADO, 1998; SANTOS, 2003 apud ARAÚJO, 2005).

A micropropagação constitui um modo de se manter sempre disponíveis explantes saudáveis e livres de contaminação para aplicação de técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética, além de ser altamente conveniente para manutenção de coleções de plantas de genótipos diferentes, livres de patógenos (CABRAL et al., 2003).

A Embrapa Clima Temperado, há 26 anos, vem aprimorando protocolo para a produção de matrizes de morangueiro por meio da cultura de tecidos. Desde então, dezenas de milhares de matrizes vem sendo produzidas anualmente e disponibilizadas a viveiristas e produtores de diferentes Estados. Atualmente, existe em torno de uma dezena de empresas de micropropagação no país. Mesmo assim, a produção nacional de matrizes e, conseqüentemente, de mudas é insuficiente para atender a demanda, sendo necessária a ampliação dessa atividade produtiva (OLIVEIRA et al., 2005).

Os grandes avanços nos projetos de fito-melhoramento vem oferecendo

com maior velocidade novas variedades com características de enorme valor agrícola. Com a mesma velocidade vem crescendo a necessidade de ter disponíveis sistemas de produção em massa que facilitem o uso e a distribuição destas novas variedades de maneira ampla e imediata. Pesquisas na área de cultivo de tecidos de espécies tropicais e não-tropicais visando aumentar a eficiência na sua micropropagação vem produzindo resultados muito favoráveis com o objetivo de facilitar a comercialização de novas plantas elite.

A micropropagação tem sido realizada com sucesso em espécies hortícolas (batata e cenoura), ornamentais (orquídea, crisântemo e cravos), frutíferas (abacaxi, morango e banana), medicinais (ipeca e espinheira santa) e mais recentemente em espécies florestais (pinus e eucalipto) (NUNES, 2005). A partir de uma planta de bananeira, por exemplo, podem ser obtidas através da micropropagação aproximadamente 100 mudas, no prazo de oito meses. Em condições de campo são obtidas até 12 mudas em um período similar. Quanto às orquídeas, leva-se cerca de dois anos para a obtenção de uma boa muda utilizando-se os métodos convencionais enquanto que, através do cultivo *in vitro* de meristemas, é possível a produção de centenas de mudas nesse mesmo período de tempo (WILLADINO e CÂMARA, 2005).

Os principais problemas desta tecnologia são o alto custo e a instabilidade do valor biológico (qualidade, estabilidade genética etc) das mudas micropropagadas (FÁRI e MELO, 2005).

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas se torne viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia, mergulhia etc), é necessário reduzir os custos de produção, que se devem, em grande parte, às perdas causadas pela contaminação *in vitro*; por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; à baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*; à necessidade de mão-de-obra especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas e, sobretudo, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (ERIG e SCHUCH, 2005).

Fatores que Influem na Micropropagação

Murashige (1974) apresentou o conceito de três estádios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. No primeiro ocorrem a seleção dos explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo, sob condições assépticas, enquanto no segundo ocorre a multiplicação dos propágulos, mediante sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação e o terceiro é caracterizado pela transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo. Nesta fase, a planta fica mais susceptível ao estresse hídrico e ainda passa de uma existência heterotrófica para um estado autotrófico.

a) Seleção de explantes

A princípio, qualquer tecido é capaz de expressar a totipotência, ou seja, a capacidade de desdiferenciação celular, que permite a formação de uma planta inteira, a partir de uma única célula. Geralmente, para se iniciar o cultivo *in vitro* são utilizados explantes de tecidos jovens com tamanhos que podem variar de 0,2 a 20mm ou mais. Em geral, o tamanho do explante está relacionado com o objetivo do trabalho, devendo ser o menor possível quando se trata de se obter a limpeza clonal. Por outro lado, o tamanho do explante determina suas chances de sobrevivência e desenvolvimento (WILLADINO e CÂMARA, 2005).

O explante deve ser selecionado cuidadosamente, pois o tipo de explante utilizado determina, muitas vezes, o grau de sucesso na micropropagação. Explantes juvenis provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os preferidos, embora tecidos maduros também sejam utilizados. Os explantes devem preferencialmente ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse e ataque de pragas ou doenças (TEIXEIRA, 2005).

Diversos explantes podem ser utilizados para se iniciar a propagação *in vitro* de uma planta, mas ápices caulinares, gemas axilares e meristemas

isolados são os explantes mais indicados. O tipo de explante exerce forte influência nas subseqüentes respostas obtidas *in vitro* (ARAÚJO e CARVALHO, 2005).

b) Desinfestação

O processo de desinfestação pode começar com os pré-tratamentos aplicados na planta matriz, principalmente para combater microrganismos.

Quando se utilizam explantes de plantas crescidas no campo, deve-se dar preferência aos ramos novos em crescimento ativo, cuja coleta deve ser feita no início do período de brotação. Órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfestação. Quando se detecta a presença de fungos ou bactérias endógenas deve-se preferir outras fontes de explantes, sobretudo aquelas derivadas de plantas cultivadas em ambientes controlados (TEIXEIRA, 2005).

Este controle deve ser feito desde a desinfestação do material vegetal até a esterilização dos instrumentos e recipientes utilizados na manipulação do explante. Os instrumentos (pinças, bisturis etc) devem ser submergidos em etanol 96%; flambados e colocados sobre um suporte limpo, dentro da câmara de fluxo laminar.

A desinfestação do explante é uma etapa essencial na qual podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida, dentre os quais os mais utilizados estão o etanol, o hipoclorito de sódio e o de cálcio, além dos habituais detergentes de cozinha ou Tween 20, que podem ser aplicados na solução desinfestante, com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, reduzindo a tensão superficial. O detergente deve ser adicionado em teor muito baixo, enquanto a concentração dos agentes desinfestantes e o tempo de exposição pode variar, de acordo com o objetivo do trabalho, o tamanho e a natureza do explante (WILLADINO e CÂMARA, 2005).

A esterilização mais comum dos explantes é feita do seguinte modo: primeiro a água bidestilada é colocada em frascos fechados a fim de ser

esterilizada no autoclave (120°C, de 20 a 30 minutos); prepara-se uma solução contendo hipoclorito de sódio ou água sanitária, água bidestilada e uma gota de Tween 20 para cada 100ml de solução; com água e sabão, limpa-se o material vegetal, colocando-o no interior da gaze e, em seguida, na solução de hipoclorito de sódio, mantendo-o durante certo período, sob agitação; na câmara de fluxo retira-se o excesso de hipoclorito de sódio, passando o explante três vezes em água bidestilada estéril; por fim, coloca-se o explante em contato com o meio de cultivo.

c) Contaminação

A micropropagação de plantas é uma técnica que possibilita a propagação massal de genótipos selecionados, no entanto, a contaminação por microrganismos continua sendo um dos principais problemas para a aplicação dessa técnica podendo chegar, inclusive, a ser um fator limitante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de certos explantes (RIBAS et al., 2003).

Um dos maiores problemas diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica; além dessas contaminações superficiais, é freqüente se deparar com contaminações presentes no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena, mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo.

A contaminação por bactérias acontece, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas. A contaminação por fungo ocorre em virtude da deficiência na manipulação durante o subcultivo e à presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado ou a infestação por ácaros (ABREU et al., 2002).

Para minimizar essas contaminações é recomendável cultivar a planta, da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas, como telados com cobertura plástica ou casa de vegetação. O cultivo de planta nesses ambientes permite maior controle da irrigação, adubação, controle de pragas e doenças (TEIXEIRA, 2005).

d) Oxidação

A oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo. Ela depende igualmente do tipo de explante utilizado. Em geral, explantes jovens oxidam menos que os velhos; outro fator que influencia a oxidação *in vitro* é a época do ano. Nos períodos do ano mais favoráveis ao crescimento, a oxidação fenólica dos explantes *in vitro* é menor. Essa oxidação representa um dos mais sérios problemas, especialmente na fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas. Menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o impasse; além do mais, a adição de compostos antioxidantes, como cisteína, ácido ascórbico e adsorventes, como carvão ativado e PVP, pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (TEIXEIRA, 2005).

e) Meios de cultura

Segundo Caldas et al. (1998), no cultivo *in vitro* o meio deve conter todas as fontes de micro e macronutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento, além de fontes de carbono e oxigênio para que a planta possa desenvolver como se estivesse em condições naturais, apesar de que quando cultivada *in vitro*, esta ser heterotrófica e apresentar tamanho limitado.

Esses meios desempenham várias funções, como suporte físico para o explante, fornecimento de nutrientes necessários à sua sobrevivência e seus componentes podem ser utilizados para dirigir o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal.

Há inúmeras formulações dos meios de cultura, não existindo um meio padrão, embora o mais amplamente difundido seja o meio idealizado por Murashige e Skoog, conhecido mundialmente como meio MS.

Segundo Mantell et al. (1994), Murashige e Skoog aperfeiçoaram os tipos existentes de meio de cultura de tecidos de plantas, a tal ponto que o meio MS se tornou um dos mais amplamente utilizados em trabalhos de cultura de tecidos.

Quando se encontra, na literatura, uma citação do meio MS, normalmente se refere à composição dos seus componentes básicos. A concentração do carboidrato em dos reguladores de crescimento, é geralmente específica em cada trabalho. De acordo com Mantell et al. (1994) o meio consiste dos seguintes grandes grupos de ingredientes:

- Macronutrientes inorgânicos (N, K, Ca, Mg, P, S, Si)
- Micronutrientes inorgânicos (Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Mo)
- Vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina e tiamina)
- Fontes de nitrogênio orgânico (glicina e inositol)
- Açúcares (sacarose)
- Reguladores de crescimento (auxina, citocinina, ácido giberélico)
- Orgânicos opcionais (hidrolizado de caseína e extrato de levedura)
- Agente gelatinoso opcional (ágar ou phytigel).

A consistência do meio de cultura pode ser ajustada pela adição de agentes gelificantes. Os cultivos em meio líquido devem ser mantidos sob agitação para assegurar a aeração dos explantes; outra possibilidade é inocular o explante sobre um suporte de algodão ou sobre pontes de papel, evitando que fiquem submersos (WILLADINO e CÂMARA, 2005).

f) Fitohormônios e reguladores de crescimento

Fitohormônios ou hormônios vegetais são aqueles produzidos pela própria planta; em baixas concentrações, são biologicamente ativos, podendo promover, inibir ou modificar o crescimento, geralmente em um local diferente daquele onde foi produzido. Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios naturais.

Os fitormônios são classificados em cinco grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e inibidores. Os reguladores de crescimento mais utilizados são auxinas, citocininas e giberelinas.

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 da cultura e da possível interação entre os fitohormônios endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003).

As auxinas são utilizadas para induzir o desenvolvimento de nós, formação de calos e desenvolvimento de raízes adventícias; as mais utilizadas no cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido a-naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (CARVALHO, 1999).

A citocininas estimulam a divisão celular. Em concentrações elevadas induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; as mais freqüentes, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6-bencilaminopurina (BAP ou BA) e 6-(g,g-dimetilaliminol) purina (2iP) (CARVALHO, 1999).

As giberelinas induzem o crescimento dos nós e dos meristemas ou gemas *in vitro*; podem, também, romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de brotos ou raízes adventícias. Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA3) é o mais empregado (CARVALHO, 1999).

Segundo Pereira et al. (2001), aplicações de giberelinas são freqüentemente eficazes para a superação da dormência e retorno ao crescimento das plantas. De todos os reguladores do crescimento, as giberelinas são as que mostram os maiores efeitos e quando aplicadas em plantas intactas, são consideradas substâncias promotoras do crescimento que produzem grande efeito em planta, especialmente no alongamento de entrenós e apresentam importante papel na quebra da dormência das plantas que não tenham recebido um período de frio adequado para retornar ao crescimento.

Micropropagação do algodão

Segundo Freire (2000), atualmente estão identificadas cinqüenta espécies de algodão do gênero *Gossypium*, distribuídas nos continentes: Ásia, África, Oceania e América, ressaltando-se que apenas quatro são cultivadas em razão de apresentarem fibras com valor comercial (*G. arboreum*, *G. herbaceum*, *G. hirsutum* e *G. barbadense*). As espécies mais importantes cultivadas, são a *G. hirsutum* e a *G. barbadense*.

O algodoeiro é um arbusto com caule ereto, cilíndrico, com consistência sublenhosa; sua altura varia de 0,8 a 2,5m., conforme a fertilidade do solo. Dentro da grande família das malváceas, o algodoeiro produz fibra têxtil, denominada algodão. O sistema radicular é do tipo pivotante, com abundante formação de raízes secundárias; a formação das duas primeiras folhas podem ser notadas logo após a formação do embrião, no qual já se delineiam formas dos cotilédones; a flor é completa, isolada, hermafrodita, pedunculada e protegida por três brácteas, cinco sépalas e cinco pétalas (PASSOS, 1977).

Carvalho (1996) afirma que o algodão se cultiva desde tempos remotos, pelo emprego de suas fibras na fabricação de tecidos, cujo cultivo se estendeu a todas as regiões do globo onde a temperatura era adequada para o seu desenvolvimento. Apesar da importância econômica e social para a humanidade, o algodão é um cultivo que apresentou, e ainda apresenta, muitos problemas que desafiam os pesquisadores para obter uma solução definitiva. Entre estes se pode mencionar um elevado número de pragas e enfermidades que afetam este cultivo, e as exigências da indústria têxtil para se obter cultivares de melhor qualidade de fibra para fazer frente à modernização e aos equipamentos industriais.

O método convencional de propagação do algodão é feito principalmente por semente. E como o algodão possui alta taxa de polinização cruzada as cultivares sofrem rápida deterioração genética, sendo necessário a constante obtenção de novas cultivares com características desejáveis ou a utilização de outras técnicas de propagação como, por exemplo, a micropropagação (CARVALHO et al., 1997).

Benito et al. (1997), trabalhando com a cultivar CNPA Precoce 2, obtiveram embriões somáticos de diferentes formas e tamanhos em meio MS desprovido de reguladores de crescimento e com 2 g.L⁻¹ de glutamina. Constataram também o desenvolvimento de várias plântulas, conseguindo, pela primeira vez, a regeneração de plantas dessa cultivar por meio da embriogênese somática.

Em geral, no algodão, a gema procedente diretamente de plântula possui maior capacidade de desenvolvimento no cultivo *in vitro* que as que se formam a partir delas. Segundo Lopes et al. (2004), o maior desenvolvimento de brotos indica uma boa resposta fisiológica dos explantes na presença dos componentes do meio de cultura. Resultados semelhantes foram alcançados por Carvalho et al. (1997), trabalhando com meristema apical e axilar de plântulas do algodoeiro, cultivar CNPA Precoce 2, em que o meio suplementado com glicose e solidificado com gelrite produziu maior número de nós por clone. Este resultado também foi observado nos ensaios de Vesmanova e Dani (1992), cultivando meristemas de *G. hirsutum* cv. Tashken 1, conseguiram clones mais desenvolvidos em meio contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose.

Carvalho et al. (2000), estudando a indução de superbrotamento e regeneração na cultivar de algodão CNPA 7H, verificaram que o meio que produziu um maior número de brotos foi o suplementado com a combinação das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (kinetina), resultado semelhante ao obtido em *Saccharum spp.*, onde essa combinação induziu um maior número de brotos em relação a outros fitohormônios utilizados (TAYLOR e DUKIC, 1993).

De acordo com Carvalho et al. (2000), o desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos para induzir eficiente proliferação em um genótipo independente, é um procedimento desejável para transformação de genótipo de algodão.

Ante o exposto, o aprimoramento das técnicas de micropropagação seria uma ferramenta auxiliar para obtenção de melhores cultivares de algodão.

Considerações finais

A micropropagação permite o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta, em meio artificial, sob condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo controlados. Esta técnica consiste no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de se produzir órgãos (organogênese) ou embriões (embriogênese somática). As plantas produzidas são aclimatadas e posteriormente levadas a campo e, como resultado, são geradas cópias idênticas às plantas que lhe deram origem (matriz) e livres de patógenos.

Vários são os fatores que influenciam na micropropagação, tais como:

- Seleção de explantes, que deve ser feita cuidadosamente pois o tipo de explante utilizado muitas vezes determina o sucesso da micropropagação. Estes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse nem ataque de pragas ou doenças.
- Desinfestação, que é um controle que deve ser feito desde a desinfestação do material vegetal até a esterilização dos instrumentos e recipientes utilizados na manipulação dos explantes.
- Contaminação, um dos maiores problemas, diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica, além das presentes no interior dos tecidos (endógenas).
- Oxidação: para minimizar este problema é recomendável evitar danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação do explante.
- Meios de cultura: devem conter todas as fontes de micro e macronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, além de fonte de carbono e, quando necessário, um agente solidificante.
- Reguladores de crescimento: são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios naturais; os mais utilizados, são: auxinas, citocininas e giberelinas.

Devido à larga utilização de sua fibra, o algodão é cultivado desde tempos remotos. Apesar da importância econômica, seu cultivo ainda apresenta muitos problemas, o que desafia pesquisadores a buscar uma melhor qualidade de fibra para atingir as exigências da indústria têxtil, e uma das técnicas de propagação mais utilizadas para obtenção de cultivares com caracteres desejáveis é a micropropagação.

Referências Bibliográficas

ABREU, L.A.; SANTOS, L. de F.; SOUZA, G.A.B. de; MENDES, R.A. O uso de benomil em cultura de tecidos. In: ENCONTRO DE TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 7., 2002, Brasília. **Resumo dos Trabalhos...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. p.28.

ARAÚJO, L.H.A.; CARVALHO, J.M.F.C. de. **Técnicas de cultivo *in vitro***. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias, 2005. (Programa de Pós-Graduação).

BENITO, M.E.G.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ, C. Embriogênese somática na cultivar Precoce do algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, maio. 1997.

CABRAL, G.B.; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T. de C. **Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp.*** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 101).

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. v.1, p.104.

CARVALHO, J.M.F.C. de. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo *in vitro* en la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L)**. 1996. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) – Departamento de Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1996.

CARVALHO, J.M.F.C. de; BENITO, E.G.; PÉREZ, C.; SANTOS, J.W. dos. Efeito da origem das gemas, fonte de carbono e agente solidificante sobre a micropropagação da cultivar de algodão CNPA precoce. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.1, n.1, p.81-86, dez. 1997.

CARVALHO, J.M.F.C. de; SOUZA, D.M. de; SANTOS, J.W. dos. Indução de superbrotamento e regeneração de plantas *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.

CARVALHO, J.M.F.C. de. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999. 39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 64).

CRIBB, A.Y. Sistema agroalimentar brasileiro e biotecnologia moderna: oportunidade e perspectiva. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, Brasília, DF, v.21, n.1, p.169-195, jan/abr. 2004.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. **Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural**. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a39v35n4.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2005.

FÁRI, M.; MELO, N.F. de. **Automação e racionalização na micropropagação industrial**. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abctp26.htm>>. Acesso em: 10 out. 2005.

FREIRE, E.C. **Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000. 22p. (Embrapa Algodão. Documentos, 78).

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília. Embrapa - SPI / Embrapa - CNPH, 1999. v.2, p.519-531.

LOPES, K.P.; CARVALHO, J.M.F.C.; ALMEIDA, F. de A.C.; ROCHA, M. do S. Regeneração de gemas do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cv. BRS

2001. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.8, n.1, p.771-778, jan/abr. 2004.

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. Plant propagation through tissue culture. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.25, p.135-166, 1974.

NUNES, H.da C.B. **Micropropagação de espécies**. Disponível em: <http://www2.uepa.br/tenagro/isetec/mini-cursos/micropropagação_de_especies.htm>. Acesso em: 08 out. 2005.

OLIVEIRA, R.P. de; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. da; BRAHM, R.U. **Produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MatrizesMorangueiro/autores.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2005.

PASSOS, S.M. de G. **Algodão**. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1977.

PEREIRA, J.G.S.; FORTES, G.R. de L.; SILVA, J.B. Crescimento de plantas micropropagadas de macieira em casa de vegetação com aplicação de ácido giberélico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.6, p.881-886, jun. 2001.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polineurom*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p.115-122, jun. 2003. (Nota Técnica)

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

TAYLOR, P.W.J.; DUKIC, S. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum spp.* Hybrid germplasm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.34, p.217-222, 1993.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.** Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, [s.d].

VESMANOVA, Y.; DANI, R.G. Influence of carbohydrate composition of media on clonal micropropagation ability of cotton. **Advances Plant Science**, v.5, p.97-99, 1992.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais.** Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>> . Acesso em: 10 out. 2005.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

