

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa 65
e Desenvolvimento

ISSN 0103-0841
Junho, 2006

**Técnica de Micropropagação In Vitro
do Genótipo de Algodão
(*Gossypium hirsutum* L.)
CNPA 97.668**



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

Luís 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 0103-0841
Junho, 2006

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 65

**Técnica de Micropropagação *In Vitro*
do Genótipo de Algodão
(*Gossypium hirsutum* L.)
CNPA 97.668**

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

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

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Luiz Paulo de Carvalho

Nair Helena de Castro Arriel

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 (2006): 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).

Técnica de Micropropagação *In Vitro* do Genótipo de Algodão
(*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97.668, por Márcia Soares Vidal e
outros. Campina Grande, 2006.

16p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 65).

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

CDD 620.8

© Embrapa 2006

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão	11
Conclusões	14
Referências Bibliográficas	15

Técnica de Micropropagação *In Vitro* do Genótipo de Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNP 97.668

Márcia Soares Vidal¹
Julita Maria Frota Chagas Carvalho²
Eric Beserra de Melo Sousa³
Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima³
José Wellington dos Santos⁴

Resumo

O algodão, excelente fonte de fibras têxteis, é cultivada em vários países e, em razão de sua importância econômica, buscaram-se métodos de transformação do algodão. De vez que um dos pré-requisitos para a transformação de plantas é o desenvolvimento de protocolos de regeneração, desenvolveu-se, neste estudo, um protocolo de micropropagação adequado à indução de superbrotamento *in vitro* em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97.668. 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 para, posteriormente, serem 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 pelo tempo de 48 - 72 horas e depois durante 20-25 dias a 28 °C a um fotoperíodo de 16h luz/8h de escuro, para desenvolvimento da plântula. Dessas plântulas, extraiu-se o ápice caulinar, colocado 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 (KIN) (0,0; 1,0 mg.L⁻¹) e numerados de MB 0 (livre de hormônio) a MB 25. Dez frascos, contendo três explantes cada um, foram empregados por tratamento e, depois, mantidos em câmara de crescimento, durante 45 dias, e só então, o número de brotos por explante foi coletado e submetido a análise estatística, cujos dados foram analisados mediante o procedimento "General Linear Model (GLM)" do SAS, destacando-se o meio MS suplementado com as combinações de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de KIN.

¹Bióloga, DSc., Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, Km 07, CP 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br

²Eng. Agr., DSc., Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CP 174, CEP: 58107-720 Campina Grande, PB. 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

Técnica de Micropropagação *In Vitro* do Genótipo de Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) CNPA 97.668

Abstract

Cotton is an excellent natural source of textile fibers and is cultivated in many countries. Because of its economic importance, cotton transformation protocols are needed. A prerequisite for cotton transformation is the development of regeneration protocols. In this study was developed a micropropagation method for the CNPA 97-668 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 °C with a 16 h photoperiod. From these plantlets shoot apexes 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 statistically analysed. The data were analysed by using the General Linear Model (GLM) of SAS program. MS medium supplemented with 1.5 mg.l⁻¹ of BAP and 1.5 mg.l⁻¹ of KIN produced the highest number of shoots.

Index terms: cotton; multiple shoots; phytohormones

Introdução

O algodão é uma planta de grande importância econômica em virtude dos produtos que sintetiza, em que quase tudo é aproveitado destacando-se, sobretudo, a fibra, principal produto, com larga utilização no ramo industrial têxtil, pois é através dela que se fabricam os diversos tipos de tecido. Assim e através de estudos cada vez mais avançados e que se procura desenvolver técnicas para o melhoramento desta planta, visando à sua uniformidade e resistência e, também, reduzir os níveis de agressão ao meio ambiente. A planta pertence ao gênero *Gossypium*, família *Malvaceae* da ordem das *Malvales*.

Da necessidade do melhoramento do algodão é que surgem os estudos da cultura de tecidos, que consistem no crescimento, multiplicação e desenvolvimento de células ou pedaços de tecidos, chamados explantes que, colocados em um meio nutritivo, originam outros tecidos ou mesmo órgãos da planta, sobretudo brotos, a partir dos quais podem dar origem a várias plantas geneticamente idênticas; desta forma se pode, em um meio de cultura adequado com reguladores de crescimento, incorporar alguma característica genética de interesse econômico no explante o qual passará a característica aos brotos, permanecendo presentes nas plantas futuras.

Assim, pode-se encurtar o ciclo do melhoramento, já que os cultivos *in vitro* não dependem das mudanças estacionais, reduzem as barreiras reprodutivas da hibridação sexual mediante o resgate de embriões e produzem centenas, e até milhares, de plantas em um espaço pequeno, economizando tempo na multiplicação das novas cultivares e híbridos (CARVALHO et al., 1999).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A micropropagação é, também, a técnica utilizada na execução deste trabalho, cujo foco principal é atribuído ao superbrotamento. Partindo-se do ápice caulinar excisado da planta matriz do algodão cultivada *in vitro* e o colocando em um meio de cultura adequado, contendo reguladores de crescimento, as citocininas BAP (6-benzilaminopurinas) e KIN (cinetina), vários brotos darão origem a novas plantas geneticamente idênticas.

Objetivou-se, com este trabalho, desenvolver um protocolo adequado de

micropropagação para a indução de superbrotamento do genótipo de algodão CNPA 97.668, em meio básico MS suplementado com combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN) e, assim, obter o meio com a concentração de reguladores de crescimento que melhor desenvolveu o explante.

Material e Métodos

Local do Experimento

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia - Cultura de Tecidos da Embrapa Algodão - CNPA, na cidade de Campina Grande, Paraíba.

Material Vegetal

Na execução do estudo, utilizou-se o genótipo de algodão *Gossypium hirsutum* L. CNPA 97.668, com sementes cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, em Campina Grande, PB. Para execução dos ensaios utilizaram-se plantas originadas a partir de sementes germinadas in vitro obtendo-se, posteriormente, os explantes.

Obtenção de Planta Matriz

a) Preparação do Meio de Cultura

Para germinação de sementes foi utilizado, como meio de cultura, o meio MS básico (Murashige e Skoog, 1962), que continha as soluções com as fontes de nutrientes e carbono, suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,8 e 6,5 g.L⁻¹ de agente solidificante, ágar. Depois de misturadas as soluções, distribuíram-se 10 mL do meio em tubos de ensaio de vidro, de 25 x 150 mm, os quais foram fechados com tampa de prolipropileno e autoclavados, a uma atmosfera e 120°C, durante 20 minutos.

b) Germinação das Sementes

As sementes foram selecionadas, lavadas com água corrente e sabão, depois desinfestadas em solução com hipoclorito de sódio a 1% (40 mL de hipoclorito de sódio - a 2,5%, e 60 mL de água deionizada), com uma gota de Tween 20,

durante 20 minutos sob agitação. Utilizando-se pinças e bisturi previamente esterilizados, as sementes foram transferidas para placas de Petri, contendo papel filtro também esterilizado, e cultivadas nos tubos de ensaio com o meio MS previamente preparado, que novamente foram tampados e vedados com filme de PVC; a seguir, os tubos com as sementes cultivadas foram mantidos no escuro, durante 48-72 horas, para germinação. Os tubos com as sementes germinadas foram transferidos para a câmara de crescimento a um fotoperíodo de 16h luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para o desenvolvimento da planta, pelo tempo de 15-20 dias, para excisão do ápice caulinar.

Indução de Superbrotamento

a) Preparação do Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para indução de superbrotamento consistiu de meio MS básico suplementado com diferentes combinações dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L^{-1}) e cinetina (KIN) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L^{-1}). As soluções foram distribuídas em 10 frascos para cada combinação com os dois hormônios com 20 mL de meio, enumerados de MBO (livre de fitohormônios) a MB25, totalizando 26 tratamentos; enfim, os frascos foram fechados com tampa de prolipropileno e autoclavados a uma atmosfera 120°C , durante 20 minutos.

b) Excisão de ápice caulinar

Na câmara de fluxo laminar com placas de Petri contendo papéis filtro previamente esterilizado, juntamente com instrumentos também esterilizados e flambados (pinças, bisturis e tesouras), os ápices caulinares foram extraídos das plântulas e inoculados nos frascos com os meios já preparados, aos quais foram colocados 3 explantes em cada frasco, totalizando 30 explantes por tratamento (lembrando que cada meio com as combinações de hormônio contém 10 frascos) e novamente tampados e vedados com filme de PVC.

Os cultivos foram mantidos na câmara de crescimento a 28°C com fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O desenvolvimento dos brotos foi observado com frequência e, no intervalo de 10 a 15 dias, fez-se a repicagem para novos meios contendo as mesmas concentrações de hormônio designado renovando, assim, os nutrientes de que

os explantes necessitam para seu desenvolvimento e, com isto, induzir o superbrotamento.

Completados 45 dias, fez-se a análise dos brotos em cada explante e somente aqueles que formaram mais que dois brotos por explante foram considerados indução de superbrotamento. Os dados foram analisados usando-se o procedimento "General Linear Model (GLM)" do SAS. Os resultados foram significativos; só então foi aplicado o teste de Tukey, o qual indicou o meio que mais se destacou.

Resultados e Discussão

Indução do Superbrotamento dos Explantes de Ápice Caulinar

O emprego de ápice caulinar como explante para superbrotamento foi muito eficaz, já que o mesmo apresenta alto poder de diferenciação, gerando novas partes na planta. Uma vez isolado e posto em um meio de cultura contendo nutrientes e diferentes concentrações de reguladores de crescimento (fitormônio) citocinina (BAP e KIN), verificou-se o desenvolvimento de vários brotos a partir de um único explante; dentre os 26 meios testados, o nomeado MB 7 foi o que melhor respondeu a este genótipo de algodão (Tabela 1).

O MB 0, isto é, livre de reguladores de crescimento (fitohormônios) não apresentou broto algum pois se constituía de meio MS básico (sem hormônios); foi feito só para controle, enquanto os explantes apenas se alongaram, fato que mostra que a presença dos reguladores de crescimento foi essencial para induzir brotações.

Em alguns tratamentos os explantes se apresentaram com baixo número de brotos e, alguns casos, ainda encontravam-se necrosados ou contaminados, fazendo com que a média estatística baixasse. Com base nisto, foi necessário refazer o experimento com os meios mais críticos (baixo número de brotos) e que mais necrosaram, totalizando 11 meios, sendo eles: MB 1, MB 2, MB 3, MB 4, MB 7, MB 8, MB 11, MB 12, MB17, MB 18 e MB 23. Diante do exposto, apesar do MB 7 ter apresentado a melhor resposta, foi incluído neste novo teste e verificou-se que realmente foi melhor, confirmando o resultado anterior.

Tabela 1. Valores médios de tratamento referentes à variável número de brotos, dos 26 tratamentos com hormônio, do genótipo de algodão CNPA 97.668.

Meios	BAP (mg.L ⁻¹)	KIN (mg.L ⁻¹)	Média ¹
MB 7	1,5	1,5	2,331 A
MB 8	2	1,5	2,219 AB
MB 6	1	1,5	2,184 AB
MB 14	2,5	2	2,127 ABC
MB 13	2	2	2,079 ABCD
MB 3	2	1	2,073 ABCD
MB 9	2,5	1,5	2,059 ABCD
MB 5	3	1	2,045 ABCD
MB 16	1	2,5	2,025 ABCD
MB 10	3	1,5	2,018 ABCD
MB 21	1	3	2,015 ABCD
MB 19	2,5	2,5	1,949 ABCD
MB 1	1	1	1,947 ABCD
MB 12	1,5	2	1,896 ABCD
MB 15	3	2	1,868 ABCD
MB 24	2,5	3	1,854 ABCD
MB 20	3	2,5	1,839 ABCD
MB 25	3	3	1,791 ABCD
MB 22	1,5	3	1,749 ABCD
MB 11	1	2	1,705 ABCD
MB 23	2	3	1,675 BCD
MB 2	1,5	1	1,575 BCDE
MB 4	2,5	1	1,494 CDE
MB 17	1,5	2,5	1,454 DE
MB 18	2	2,5	1,452 DE
MB 0	-	-	1,000 E
	CV ² %		26,003

¹ Dados transformados em $y = \sqrt{x-1}$ Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

² Coeficiente de variação

Os dados do segundo experimento foram analisados da forma já citada e de acordo com a Tabela 2, isto é, com os 11 meios analisados, se confirmou, que o MB 7 é o meio mais adequado para o superbrotamento deste genótipo de algodão, destacando-se o fato de que um explante apresentou 21 brotos.

Tendo em vista, segundo Caldas et al. (1998) que, o BAP induz à formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação enquanto KIN permite apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas, era de se pensar que o explante desenvolveria maior número de brotos se a quantidade de BAP fosse maior que a de KIN, porém o genótipo CNPA 97.668 respondeu melhor com a concentração igual dos dois hormônios, ou seja, com relação entre BAP e KIN igual a 1,5. Na Figura 1 nota-se o resultado do superbrotamento em que o meio MB 7 foi o mais adequado para este genótipo.

Tabela 2. Valores médios de tratamento referentes à variável número de brotos, dos 11 tratamentos refeitos com hormônios do genótipo de algodão CNPA 97.668.

Meios	BAP (mg. L-1)	KIN (mg. L-1)	Média ¹
MB 7	1,5	1,5	3,099 A
MB 2	1,5	1,0	2,838 AB
MB 3	2,0	1,0	2,687 ABC
MB 1	1,0	1,0	2,650 BCD
MB 8	2,0	1,5	2,627 BCD
MB 4	2,5	1,0	2,593 BCD
MB 23	2,0	3,0	2,333 CDE
MB 11	1,0	2,0	2,316 CDE
MB 12	1,5	2,0	2,259 CDE
MB 17	1,5	2,5	2,240 DE
MB 18	2,0	2,5	2,093 E
	CV ² %		21,083

¹Dados transformados em $y = \sqrt{x - 1}$. Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Coefficiente de variação

Foto: Eric Beserra

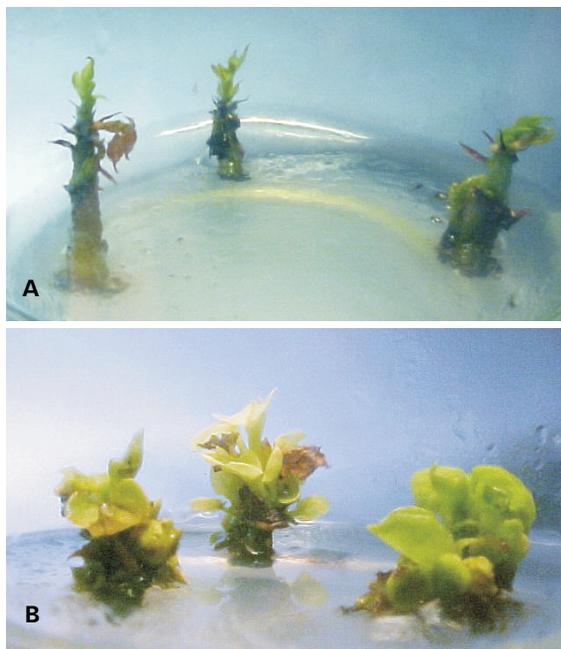


Fig. 1 Desenvolvimento dos ápices caulinares após 45 dias. Em A, explantes em meio MB 0 (sem fitohormônios), que não induziram o superbrotamento, mas somente a alongação. Em B, o meio MB 7 (com fitohormônios) apresentou a maior taxa de superbrotamento.

Respostas similares à relação BAP:KIN foram obtidas por Carvalho et al. (2000) para a cultivar 7H e por Agrawal et al. (1997) com CRK 516, que verificaram maior número de brotos com 2,5 mg dos dois reguladores. Apesar da dose mais elevada, a relação BAP:KIN foi igual a 1,5 mg.L⁻¹, a mesma observada neste experimento.

Lima et al. (2004) realizaram um trabalho semelhante para testar o meio mais adequado para a micropropagação da cultivar CNPA ITA-90 II; concluindo-se que o meio que propiciou o maior número de brotos, foi suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3,0 mg.L⁻¹ de KIN. Os explantes necessitaram de relação bem diferente das citocininas, com KIN em maior quantidade que o BAP.

Conclusões

- O ápice caulinar pode ser usado como explante em trabalhos de micropropagação in vitro.
- BAP e cinetina na concentração de 1,5 mg.L⁻¹ maximizam o superbrotamento de ápices caulinares do genótipo CNPA 97.668.
- A presença de cinetina e BAP no meio é essencial para a indução de brotações laterais (ou superbrotamento).

Referências Bibliográficas

AGRAWAL, D.C.; BANERJEE, A.K.; KOLALA, R.R. et al. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, v. 16, p. 647-652, 1997.

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-CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-104.

CARVALHO, J.M.F.C. *Aplicación de las técnicas de cultivo in vitro em la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L.)*. 1996. 174f. Tese (Doutorado) - Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politécnica de Madrid, 1996.

CARVALHO, J.M.F.C.; MOREIRA, J. de A.N.; VIEIRA, R. de M. *Cultivo in vitro do algodão*. In: BELTRÃO, N.E. de M. *O agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. v. 1, p. 405- 418.

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*. *Journal of Oil Seed and Fiber Crops*, v. 4, n. 2, p. 61-65, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. *Micropropagação*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-241.

LIMA, L.H.G. de M.; SOUSA, E.B. de M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SANTOS, J.W. dos; VIDAL, M.S. *Indução in vitro de múltiplos brotos a partir de meristema apical de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar ITA-90 II*. In: *Congresso Nacional de Botânica, 55; Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES, pela Universidade Federal de Viçosa - UFV, 26., 2004. Anais...* Campina Grande: Embrapa - CNPA, 2004. p. 138.

MACÊDO, C.E.C. de; SILVA, M.G. da; NÓBREGA, F.S. da. et al. *Concentrações*

de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas in vitro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 501-504. dez. 2003.

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

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

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

