

**INDUÇÃO DA MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM CULTIVARES DE
ALGODOEIRO**

TAIZA DA CUNHA SOARES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE - PB

FEVEREIRO DE 2013

**INDUÇÃO DA MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM CULTIVARES DE
ALGODOEIRO**

TAIZA DA CUNHA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Coorientador: Dr. Everaldo Paulo de Medeiros

CAMPINA GRANDE - PB

FEVEREIRO DE 2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

S676i Soares, Taiza da Cunha.
Indução da morfogênese in vitro em cultivares de algodoeiro. [manuscrito] / Taiza da Cunha Soares. – 2013.
56 f. : il. color.

Digitado
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Embrapa Algodão”

1. Embriogênese somática. 2. *Gossypium hirsutum* L. 3. Infravermelho próximo (NIR). I. Título.

21. ed. CDD 581.3


**INDUÇÃO DA MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM CULTIVARES DE
ALGODOEIRO**

TAIZA DA CUNHA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento Genético de Plantas.

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2013.

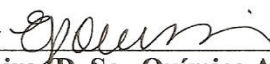
Banca Examinadora:



**Profª. Liziane Maria de Lima (D. Sc., Ciências Biológicas - Biologia Molecular) –
Embrapa Algodão**



**Prof. Humberto Actis Zaidan (D. Sc., Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) –
UFCG**



**Prof. Everaldo Paulo de Medeiros (D. Sc., Química Analítica) – Embrapa Algodão
Coorientador**



**Profª. Julita Mª F. C. Carvalho (D. Sc., Recursos Fitogenéticos) – Embrapa Algodão
Orientador**

*Aos meus pais, Francisco e
Marizete pelo zelo em ensinar-me a
trilhar o caminho do saber.*

Dedico.

“Instruir-te-ei e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir, guiar-te-ei com os meus olhos.”

Salmos 32, v. 8.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor e Salvador da minha vida, Jesus Cristo! Meu melhor amigo, meu refúgio, minha fortaleza. Quem nunca permitiu que eu desistisse. E todos os dias, diz: Não temas, Eu estou contigo! - Obrigada meu Deus, por tudo!

Aos meus pais, Francisco e Marizete, por todo esforço, dedicação e incentivo. Por terem me instruído no caminho em que devo andar. Sem vocês jamais teria conseguido! Também aos meus irmãos Luanna – mais que irmã: Amiga, Raí e Júnior! E aos meus tios, primos e avós. Amo todos vocês!

À minha orientadora, Dra Julita Frota, pela disponibilidade, a confiança, os ensinamentos e até mesmo as “brincas”, por isso a chamamos carinhosamente de “mãe científica”, por ser responsável pelo nosso desenvolvimento acadêmico e pessoal. E ao meu coorientador, Dr. Everaldo Medeiros, que de igual maneira, comprometeu-se a me ajudar para tornar o meu trabalho ainda melhor. Jamais esquecerei o quanto tiveram paciência em me lapidar para que eu pudesse chegar aonde cheguei! Serei sempre grata a vocês!

Aos meus companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Algodão: Oton, Claudiane, Jaricélia, Prof. Humberto, Fernanda, Ruth, Ediene. E, especialmente, Flávia, Ákylla, Jéssica e Raquel. Juntos, nós compartilhamos as alegrias e tristezas nos experimentos e na vida.

De forma especial, quero agradecer a Dione (técnica do laboratório), a pessoa mais prestativa e paciente que já conheci! Obrigada por todas as conversas, conselhos e “quebra galhos”. E a Amaro (assistente do laboratório) pelas risadas que sempre conseguiu arrancar com suas loucas ideologias.

A todo pessoal do setor de biotecnologia da Embrapa Algodão, entre os quais, lembro com carinho do meu amigo Juarez, pela amizade e prestatividade.

A todos os meus colegas de mestrado. Especialmente, Germana, Patrícia, Monalisa e Milena. Sou grata pela amizade de vocês, que de forma direta ou indireta me auxiliaram ao longo

dessa trajetória. Sei que tudo se torna mais fácil e prazeroso quando temos com quem compartilhar as nossas conquistas depois de tantas lutas!

Não poderia deixar de agradecer a Dra Betânia pela prontidão em me auxiliar na realização dos experimentos no NIR.

E, ao Dr. Wellington dos Santos, pelas orientações na parte estatística, às quais foram muito importantes para realização deste trabalho.

Agradeço a todos os professores da Pós Graduação, pelos ensinamentos e experiências que nos foram compartilhados.

A Wágner (meu namorado) pelo amor, carinho e incentivo, a mim transmitidos com suas palavras, gestos e atitudes que sempre me fizeram acreditar que sou capaz!

A todos os meus amigos pelo incentivo e as orações. Em especial, à Priscila, pelos conselhos, incentivos e por me ouvir, sempre que precisei externar algo!

À UEPB, pela oportunidade concedida através do mestrado em Ciências Agrárias.

À Embrapa Algodão, pela infraestrutura oferecida que nos permitiu desenvolver os nossos experimentos com excelência.

A CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cotonicultura: Aspectos gerais e importância	3
2.1.1. <i>Melhoramento genético do algodoeiro</i>	4
2.2. Cultivo de tecidos vegetais in vitro	5
2.2.3. <i>Reguladores de crescimento</i>	6
2.2.4. <i>Fontes de nitrogênio orgânico</i>	7
2.2.5. <i>Quitossana</i>	8
2.2.6. <i>Organogênese</i>	8
2.2.7. <i>Embriogênese Somática</i>	9
2.3. Espectroscopia em infravermelho próximo (Near InfraRed)	10
2.3.1. <i>Quimiometria</i>	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Ensaio 1: Embriogênese Somática	12
3.1.1. <i>Material vegetal</i>	12
3.1.2. <i>Seleção de genótipos: Espectroscopia NIR e Quimiometria</i>	12
3.1.3. <i>Desinfestação das sementes e obtenção de plântulas matrizes</i>	13
3.1.4. <i>Indução de calos (IC)</i>	13
3.1.5. <i>Proliferação de calos (PC)</i>	14
3.1.6. <i>Rediferenciação de calos (RC)</i>	14
3.1.7. <i>Análise dos resultados</i>	15
3.1.8. <i>Maturação e alongamento dos embriões somáticos</i>	15
3.2. Ensaio 2: Organogênese	16
3.2.1. <i>Material vegetal</i>	16
3.2.2. <i>Indução de brotos</i>	16
3.2.3. <i>Alongamento, enraizamento e aclimatização</i>	17
3.2.4. <i>Análise dos dados</i>	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Espectroscopia e quimiometria	18
4.2. Embriogênese somática	21
4.3. Organogênese	25
5. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos tratamentos utilizados na indução de superbrotamento da cv. BRS Rubi.....	16
Tabela 2: Número total de embrióides por tratamento formados a partir de calos embriogênicos subcultivados em meio RC (MS + 2,0 gL ⁻¹ glutamina) e meio RCQ (MS + 2,0 gL ⁻¹ glutamina + 20,0 mgL ⁻¹ quitosana) após oito semanas.....	24
Tabela 3: Resumo de análise de variância referente à variável número de brotos/ explante (NBt).....	27
Tabela 4: Valores médios referentes à variável número de brotos por explante (NBt) em resposta à diferentes concentrações de reguladores de crescimento associados a 3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ QUI.....	29
Tabela 5: Valores médios referentes à variável tamanho do maior broto (TMBt) em resposta à diferentes concentrações de reguladores de crescimento associados a 3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ QUI.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta de algodoeiro herbáceo em frutificação.....	4
Figura 2: Princípio geral da cultura de tecidos.....	6
Figura 3: Análise de componentes principais no NIR: (A) espectrômetro XDS Analyser; (B) célula com sementes de algodão; (C) célula preparada para análise no NIR.....	13
Figura 4: Esquema simplificado das etapas da Embriogênese Somática.....	15
Figura 5: Espectros de reflectância no NIR (região de 1100 a 2500 nm), obtidos da análise de sementes de quinze cultivares de algodão selecionadas para o estudo.....	18
Figura 6: Espectros derivativos (região de 1100 a 2500 nm) obtidos do pré-processamento (Savitzky - Golay) dos dados das amostras de sementes de quinze cultivares de algodoeiro.....	19
Figura 7: PCA dos espectros pré-processados: Escores do PC1 x PC2 (na região de 1100 a 2500 nm) aplicado ao conjunto das amostras de sementes de cultivares de algodão.....	20
Figura 8: Indução (A, C, E, G) e proliferação (B, D, F, H) de calos em meios de cultivos contendo, respectivamente, 2,0 mgL ⁻¹ ANA + 1,0 mgL ⁻¹ KIN e 0,5 mgL ⁻¹ de ANA e 0,1 mgL ⁻¹ de KIN. (A) (B) Coker 312; (C) (D) BRS 201; (E) (F) BRS Rubi; (G) (H) CNPA Precoce 1.....	22
Figura 9: Embriogênese somática em cultivares do algodoeiro. (A) Calos possivelmente embriogênicos em BRS 201; (B) CNPA Precoce 1; Calos embriogênicos e embriões somáticos em (C) (E) (F) BRS Rubi (D) Coker 312, formados após oito semanas.....	23
Figura 10: Embriões somáticos oriundos de segmentos hipocotiledonares da cv. BRS Rubi. (A) (B) Estádio cotiledonar; (C) Maturação; (D) Alongamento.....	24
Figura 11: Organogênese <i>in vitro</i> da cv. BRS Rubi: Superbrotamento em explantes subcultivados em meio de cultura (A) MS com BAP + QUI + 0,1 mgL ⁻¹ AIB; (B) MS com BAP + QUI + 0,5 mgL ⁻¹ KIN; (C) MS com BAP + QUI + 0,1 mgL ⁻¹ ANA; (D) (E) MS com BAP + QUI; (F) Testemunha (MS + 15,0 mgL ⁻¹ QUI).....	26

Figura 12: Média do número de brotos/ frasco em relação às concentrações dos reguladores de crescimento (AIB, KIN e ANA) associados a $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP + $15,0 \text{ mgL}^{-1}$ QUI.....28

Figura 13. Organogênese *in vitro* da cv. BRS Rubi. (A) Alongamento em meio MS sem fitorreguladores; (B) Enraizamento dos brotos em meio MS com $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA; (C) Aclimatização em turfa + vermiculita estéreis; (D) Casa de vegetação (Antes da transferência para vasos).....31

LISTA DE SIGLAS

ANA – Ácido naftalenoacético
AIB - Ácido indolbutírico
AIA - -Ácido 3-indolacético
KIN - Cinetina – 6-furfurilaminopurina
BAP – 6-benzilaminopurina
QUI - Quitosana
NIR – Infravermelho próximo
PCA – Análise de Componentes Principais
IC – Indução de calos
PC – Proliferação de calos
RC – Meio de rediferenciação
RCQ – Meio de rediferenciação de calos com quitosana
MS – Meio de cultura de Murashige e Skoog
GA₃ – Ácido giberélico
OGM – Organismo geneticamente modificado
ES – Embriogênese somática
BAG – Banco de acessos de germoplasma
NB – Número de broto
TMB – Tamanho do maior broto

RESUMO

SOARES, Taiza da Cunha. Msc; Universidade Estadual da Paraíba/ Embrapa Algodão; Fevereiro de 2013; **Indução da morfogênese *in vitro* em cultivares do algodoeiro**; Orientadora: Julita Maria Frota Chagas Carvalho; Coorientador: Everaldo Paulo de Medeiros.

O Algodoeiro (*Gossypium hirsutum L.*), planta da família Malvaceae, é uma das culturas mais importantes no cenário agrícola mundial. O surgimento de novas cultivares mais precoces, produtivas e de fibra colorida, tornou-se um atrativo para novos mercados, culminando numa demanda pelo uso de novas tecnologias. O cultivo *in vitro* é uma importante ferramenta biotecnológica aplicada à agricultura no melhoramento vegetal. O presente trabalho objetivou induzir a morfogênese *in vitro* em genótipos do algodoeiro, tanto por embriogênese somática quanto por organogênese, com intuito de estabelecer um protocolo de micropropagação para auxiliar nos programas de melhoramento genético e transgenia da cultura. Para o estudo da embriogênese somática, utilizou-se quinze genótipos de cultivares do algodoeiro, dos quais foram selecionados quatro, a BRS Rubi, Coker 312, BRS 201 e CNPA Precoce 1, conforme análise por medidas de reflectância na região de 1100 a 2500 nm e análise de componentes principais (PCA). As cv. Coker 312 e BRS Seridó foram utilizadas como modelo para comparação dos espectros. As sementes dos genótipos selecionados foram cultivadas *in vitro* para obtenção de plântulas matrizes, das quais foram retirados os segmentos hipocotiledonares e inoculados em placas de Petri contendo meio MS basal (Murashige e Skoog) suplementado com $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN para indução de calos. Após quatro semanas os calos formados foram transferidos para meio de proliferação contendo $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA + $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN. Em seguida, porções friáveis dos calos foram transferidas para meios de rediferenciação isento de fitorreguladores e adicionados de $2,0 \text{ gL}^{-1}$ de glutamina isolada ou associada a $20,0 \text{ mgL}^{-1}$ de quitosana. Após oito semanas de cultivo, foi avaliada a presença/ ausência e a quantidade de embriões por porção de calo. Os ensaios foram mantidos em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Todos os explantes das cultivares estudadas produziram calos, no entanto, somente a BRS Rubi e a Coker 312 produziram embriões somáticos, embora com frequência muito baixa. Os protocolos de indução e proliferação de calos embriogênicos foram eficazes para todos os genótipos avaliados. Durante a rediferenciação, cada cultivar respondeu diferenciadamente, o que é explicado pelo genótipo – dependência que torna o algodoeiro tão recalcitrante. Para os ensaios da organogênese, foi utilizada somente a BRS Rubi, da qual, foram excisados explantes oriundos de nós cotiledonares de plântulas cultivadas *in vitro* para indução dos brotos e inoculados em meio MS suplementado com $15,0 \text{ mgL}^{-1}$ de quitosana + $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina

(BAP) associados a diferentes concentrações (0,0 mgL⁻¹; 0,1 mgL⁻¹; 0,5 mgL⁻¹; 1,0 mgL⁻¹) de Cinetina (KIN), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA). Foram realizados 13 tratamentos com 10 repetições e três explantes por frasco, em delineamento inteiramente casualizado, com planejamento fatorial 3 x 4 + 1, sendo três tipos de fitorreguladores, quatro concentrações associados ao BAP e QUI mais uma testemunha. As variáveis analisadas foram número de brotos/explante e tamanho do maior broto. Os melhores resultados tanto para o número de brotações, quanto para o tamanho dos brotos foram alcançados nos tratamentos suplementados apenas com BAP e quitosana. Entretanto, a quitosana isolada não contribuiu para o superbrotamento. Nesse sentido, pode-se concluir que, outros estudos acerca da organogênese na cv. BRS Rubi utilizando somente a citocinina BAP devem ser realizados, e assim definir a melhor concentração para produzir o maior número de brotos.

Palavras-chave: Embriogênese somática; *Gossypium hirsutum* L.; Infravermelho próximo (NIR); Organogênese; Quitosana.

ABSTRACT

SOARES, Taiza da Cunha. Ms Paraíba State University / Embrapa Cotton; February 2013; **Induction of *in vitro* morphogenesis in cotton cultivars**: Advisor: Maria Julita Frota Chagas Carvalho; Coorientador: Everaldo Paulo de Medeiros.

The Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plant family Malvaceae, is one of the most important crops in the world agricultural scenario. The emergence of new cultivars earlier, productive and colored fiber, has become an attraction to new markets, culminating in a demand for the use of new technologies. The *in vitro* culture is an important tool biotechnology applied to agriculture in plant breeding. The present study aimed to induce *in vitro* morphogenesis in cotton genotypes by both somatic embryogenesis and by organogenesis, aiming to establish a micropropagation protocol to assist in breeding programs and transgenic crop. For the study of somatic embryogenesis, we used fifteen genotypes of cotton cultivars, of which four were chosen, the BRS Rubi, Coker 312, BRS 201 and CNPA Precoce 1, according to analysis by reflectance measurements in the region from 1100 to 2500 nm and principal component analysis (PCA). The cv. Coker 312 and BRS Seridó were used as template for comparison of spectra. Seeds of selected genotypes were cultured *in vitro* for obtaining plantlets matrices, including hypocotyl segments were removed and inoculated in Petri dishes containing MS basal medium (Murashige and Skoog) supplemented with 2,0 mgL⁻¹ NAA + 1,0 mgL⁻¹ KIN for callus induction. After four weeks the calli were transferred to proliferation medium containing 0,5 mgL⁻¹ NAA + 0,1 mgL⁻¹ KIN. Then portions of friable calluses were transferred to media free of growth regulators and redifferentiation added 2,0 gL⁻¹ of glutamine alone or associated with 20,0 mgL⁻¹ of chitosan. After eight weeks of cultivation, evaluated the presence / absence and amount of callus per serving embryoid. All assays were kept in a growth chamber at 25 ± 2 °C with a photoperiod of 16 h light and light intensity of 40 mmol m⁻²s⁻¹. All explants of cultivars produced callus, however, only BRS Rubi and Coker 312 produced somatic embryos, albeit with very low frequency. The protocols for induction and proliferation of calli were effective for all genotypes. During redifferentiation, each cultivar responded differently, which is explained by genotype - dependence that makes cotton so recalcitrant. For tests of organogenesis, we used only the cv. BRS Rubi, which were excised from explants of cotyledonary seedlings grown *in vitro* for induction of shoots and cultured on MS medium supplemented with 15 mgL⁻¹ chitosan + 3,0 mgL⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) associated with different concentrations (0,0 mgL⁻¹, 0,1 mgL⁻¹, 0,5 mgL⁻¹, 1,0 mgL⁻¹) of kinetin (KIN) butyric acid (IBA) and naphthaleneacetic acid (NAA). 13 treatments were conducted with 10 repetitions and three explants per bottle, in a completely randomized, factorial design with 3 x 4 + 1, being three kinds of plant hormones.

four concentrations associated with BAP and CHI another witness. The variables analyzed were number of shoots/ explant and size of the largest bud. The best results for both the number of shoots as well as to the size of the shoots were achieved only in treatments supplemented with BAP and chitosan. However, chitosan alone did not contribute to the witches. In this sense, it can be concluded that other studies of organogenesis in the cv. BRS Rubi using only the BAP should be performed, and thus define the optimal concentration to produce the highest number of shoots.

Keywords: Somatic embryogenesis; *Gossypium hirsutum* L.; Near Infrared (NIR); Organogenesis; Chitosan.

1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum L.*) é uma das culturas mais relevantes no cenário agrícola mundial. Seu principal produto, o algodão, é utilizado principalmente, na indústria têxtil (fibra), na indústria de alimentação animal (torta e farelo) e de óleo vegetal por apresentar alto potencial linoléico (SOUSA, 2010; CARVALHO et al., 2006). A cotonicultura desempenha um importante papel para o agronegócio brasileiro, sobretudo, pelo valor econômico agregado aos produtos que oferece e a adaptabilidade da cultura às condições edafoclimáticas.

No início da década de 1980, o Nordeste destacou-se como a primeira maior região produtora do país com o cultivo do algodão arbóreo perene, de fibras longas, que mais tarde foi praticamente extinto com o cultivo do algodão herbáceo, de fibras mais curtas, mais produtivo e de ciclo anual, cuja produção concentrou-se principalmente no Estado de São Paulo (SOUSA, 2010). No final desta mesma década, com a propagação de pragas e doenças, a falta de incentivos e o despreparo dos agricultores (SILVA et al., 2005), a cotonicultura brasileira apresentou uma mudança considerável no seu perfil, passando de exportador à importador. Segundo Cruz e Maia (2008), no final dos anos 1990, a produção de algodão no Brasil começa a se destacar, concentrando-se principalmente na região Centro-Oeste.

Nesse cenário, o uso da biotecnologia para produzir cultivares com características superiores como, resistência a pragas e doenças, precocidade, alta produtividade e fibras naturalmente coloridas, vem desempenhando importante papel na reestruturação da cotonicultura no país.

O cultivo de tecidos *in vitro*, constitui uma importante ferramenta biotecnológica de apoio ao melhoramento genético do algodão. Essa técnica fundamenta-se na totipotência celular que viabiliza a regeneração ou morfogênese *in vitro*, definida como a formação de órgãos a partir da diferenciação tissular e celular (RAVEN et al., 2007), via organogênese ou embriogênese somática. Dessa forma, é possível obter plantas completas utilizando partes da planta de interesse e assim, regenerar um grande número de plantas sem resíduos de heterozigose, reduzindo o tempo de obtenção de uma nova cultivar (SCAGLIUSI, 2011)

A técnica de cultivo de tecidos *in vitro*, vem sendo aplicada na agricultura como sendo parte de uma importante área da biotecnologia, a transgenia. Segundo Faleiro et al. (2011), o melhoramento genético tem a cultura de tecidos como uma ferramenta básica, sem a qual não se alcança a regeneração da planta transgênica completa e funcional a partir da célula geneticamente modificada.

O desenvolvimento de protocolos de regeneração eficazes é decisivo para obter sucesso na transformação genética de plantas. No caso do algodoeiro, isso tem sido um desafio, principalmente nos estudos com embriogênese somática, devido a forte dependência genotípica (HAN et al., 2009) que torna a cultura tão recalcitrante.

O processo de micropropagação via organogênese direta ou indireta *in vitro* constitui-se num método de obtenção de plantas de difícil propagação e de ciclos longos, em menor espaço de tempo comparado ao melhoramento convencional (CARVALHO et al., 2006). Conforme Grattapaglia e Machado (1998), para a indução do superbrotamento utiliza-se a organogênese direta que se refere ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos com potencial morfogenético. A formação de calos, nesse caso, é indesejável, uma vez que, sua constituição cromossômica é geralmente instável, podendo gerar variantes genéticas, por meio de variação somaclonal (LARKIN e SCOWCROFT, 1981).

A rota morfogênica por embriogênese somática destaca-se por proporcionar alta taxa de multiplicação clonal em relação a outros processos de propagação, além de possibilitar a transferência de genes, a indução e seleção de mutações (BARROS, 1999), razões pela qual é preferida em estudos de propagação clonal e melhoramento genético. Entretanto, esta técnica ainda está limitada a poucas linhagens do algodão, principalmente a cv. Coker (DAVIDONS e HAMILTON, 1983; TROLINDER e GOODIN, 1987; HAQ, 2005), devido à forte influência do genótipo, o que limita a eficácia de um mesmo protocolo em diferentes cultivares.

Na tentativa de maximizar a abrangência dos protocolos na formação de embriões somáticos, associou-se o uso da espectroscopia NIR (*Near Infrared*) com auxílio da quimiometria por meio da *Análise de Componentes Principais* (PCA) para selecionar genótipos quimicamente similares.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo geral induzir o processo de morfogênese *in vitro* em cultivares do algodoeiro (*Gossypium hirsutum L.*), utilizando as duas principais vias de regeneração, a organogênese direta e a embriogênese somática indireta, com intuito de definir um protocolo de regeneração. Os objetivos específicos para isto foram: identificar cultivares de algodoeiro com maior competência embriogênica por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e análise de componentes principais (PCA), para posterior indução à formação de embriões somáticos; induzir o superbrotamento por organogênese direta na cultivar BRS Rubi, definindo o melhor tratamento; avaliar a potencialidade do uso da quitosana nos protocolos de regeneração do algodoeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cotonicultura: Aspectos gerais e importância

A classificação botânica apresenta 52 espécies de algodão devidamente identificadas pertencentes ao gênero *Gossypium* e à família Malvaceae. Dentre as quais, apenas quatro são cultivadas comercialmente, a *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* L. e *Gossypium herbaceum* L. Somente a espécie *Gossypium hirsutum* L. é responsável por 90% da produção mundial de algodão e seu cultivo no Brasil é de extrema importância sócio-econômica. As demais espécies são silvestres e não agregam valor econômico (CARVALHO, 2008).

O produto do algodoeiro (Figura 1), o algodão em caroço, é composto pela pluma (fibra) e pelo caroço (sementes com línter). Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem, de alimentação animal (farelo ou torta) e de óleos, além de grande número de produtos secundários (PENNA, 2005).

O Brasil é o quinto maior produtor de sementes e pluma de algodão (FAO, 2010). A área plantada no País para safra 2012/2013 está estimada em 985,3 mil hectares, com redução de 29,3% em relação a safra anterior, decorrente da redução no preço do produto devido à queda nas exportações (CONAB, 2013). Conforme o levantamento sistemático da produção agrícola 2012 realizado pelo IBGE (2012), a região Centro-Oeste foi responsável por 68,3% da produção nacional, enquanto que, a região Nordeste contribuiu com 28,5%, dos quais 25,4% foram colhidos no estado da Bahia.

Ainda que, a prática da cultura no Nordeste, seja em escala de produção mais baixa em relação à região Centro-Oeste, esta tem grande potencial para atender a demanda do mercado em expansão, apoiando-se principalmente na produção do algodão colorido. O lançamento de cultivares coloridas pela Embrapa Algodão tem atraído novos mercados consumidores, principalmente voltados para o uso de produtos ecologicamente corretos, que dispensam o tingimento artificial da fibra. Se produzido de forma orgânica, sem o uso de insumos e fertilizantes químicos, tais produtos agregam ainda mais valor comercial (BELTRÃO et al., 2010).

Os programas de melhoramento realizados em todo o mundo vêm produzindo cultivares superiores e cada vez mais adaptadas as condições de sequeiro. Segundo Beltrão et al. (2010) a oferta de novas cultivares de algodão, mais produtivas e precoces, abre possibilidades de expansão de novas áreas para sistemas de produção no semiárido nordestino.



Figura 1: Planta de algodoeiro herbáceo em frutificação. Foto: A. Koehne. Fonte: Wikipedia.org.

2.1.1. Melhoramento genético do algodoeiro

Dados no início do século XX, os programas de melhoramento genético convencional do algodoeiro, priorizaram inicialmente, à obtenção de cultivares mais precoce e de ciclo determinado, posteriormente se direcionaram para o aumento da produtividade (VILLARI, 2010).

De um modo geral, segundo Villari (2010), as principais modificações decorrentes do melhoramento na cultura do algodoeiro foram: ganho de produtividade; aumento do rendimento e melhoria da qualidade tecnológica das fibras; redução no ciclo, com acentuação da precocidade; redução no porte; aumento no tamanho do fruto do algodoeiro que contém a fibra no seu interior; resistência a pragas e doenças e desenvolvimento de cultivares com fibras coloridas.

Com o advento da biotecnologia, novas técnicas foram implantadas no melhoramento genético da cultura, baseadas no conhecimento da ação gênica e da transformação genética, que permite a transferência de genes de uma espécie para outra. Segundo Fuzzato (1999) o melhoramento genético de qualquer espécie tem como finalidade incrementar características; reduzir ou eliminar a manifestação de características indesejáveis e, acrescentar características de interesse.

Em 2005, a cotonicultura nacional iniciou uma nova fase, marcada pela liberação para o cultivo comercial e pesquisa dos organismos geneticamente modificados (OGMs) (Parecer Técnico Conclusivo, CTNBio nº.513/2005). Com o advento da transgenia é possível incorporar características de interesse oriundas de outros organismos como, alto potencial produtivo e resistência múltipla a doenças, em cultivares e linhagens “elites” de algodão, o que seria impossível pelo melhoramento convencional devido às barreiras reprodutivas. Ampliando as possibilidades do melhoramento genético da cultura.

A biotecnologia permite a manipulação de processos biológicos para obter produtos úteis, tornando-se forte aliada à agricultura no melhoramento genético das culturas. Sua aplicação se reflete sobre a agricultura, a indústria alimentar, os consumidores e, sobretudo, o meio ambiente (OLIVEIRA, 2000). Neste enfoque, o domínio da cultura *in vitro* de plantas teve importância crucial, tornando-se uma ferramenta para o sucesso dos programas de melhoramento genético das culturas.

2.2. Cultivo de tecidos vegetais *in vitro*

A cultura de tecidos *in vitro*, apóia-se na teoria da totipotência celular, a qual, segundo Termignoni (2005) define a capacidade que a célula vegetal já diferenciada possui de voltar ao seu estado meristemático e, após, redefinir seu padrão de diferenciação, gerando uma nova planta. O cultivo *in vitro* abrange a cultura de células, tecidos ou órgãos em condições assépticas e meios de cultura artificiais, resultando na obtenção de novas plantas idênticas a original, ou seja, realiza clonagem vegetal, por meio de propagação assexuada. Do ponto de vista comercial esse tipo de reprodução tem importância incontestável para cultivares de valor agrônomo, pois resulta em plantas uniformes quanto ao seu fenótipo, preservando as características de interesse destas plantas (CID e TEIXEIRA, 2010).

O sucesso no processo de regeneração da planta *in vitro* depende da escolha adequada de fatores como, o genótipo a ser utilizado, a fonte de explante e as condições da cultura (meio de cultivo, luz, temperatura, assepsia) (ANDRADE, 2002). Dentre as condições da cultura, a composição do meio de cultivo é decisiva para o estabelecimento do explante *in vitro*.

O meio nutritivo provê as necessidades específicas da planta em condições *in vitro*. Envolve uma combinação de compostos inorgânicos (macronutrientes, micronutrientes, suplemento de ferro e água), orgânicos (fonte de carbono) e complexas substâncias naturais (vitaminas) (CID e TEIXEIRA, 2010). E, quando necessário, reguladores de crescimento que são

componentes indispensáveis para manter a divisão celular. O meio MS de Murashige e Skoog (1962) é o mais utilizado nos protocolos de regeneração.

A regeneração pode ocorrer por duas vias principais, organogênese ou embriogênese somática (Figura 2). No primeiro caso, tecidos vegetais se diferenciam em estruturas monopolares como, meristemas caulinares (cauligênese) ou radiculares (rizogênese). Enquanto que, por embriogênese somática, células ou tecidos somáticos originam estruturas bipolares, que se desenvolvem por uma série de estágios até formar uma nova planta (ZIMMERMANN, 2010).

Em termos gerais, a técnica de cultivo *in vitro* contribui com a obtenção de cultivares transgênicas, já que possibilita regenerar a planta a partir da célula transformada geneticamente, podendo ser utilizada em várias etapas do melhoramento que envolve transgenia. Além de atuar na propagação em larga escala de genótipos superiores; facilitar o transporte de plantas para diversos países, sem preocupações com introdução de novas doenças; recuperar espécies em vias de extinção; limpeza clonal; produção de sementes artificiais e clonagem gênica (TEIXEIRA, 2008; LEMOS, 2003).

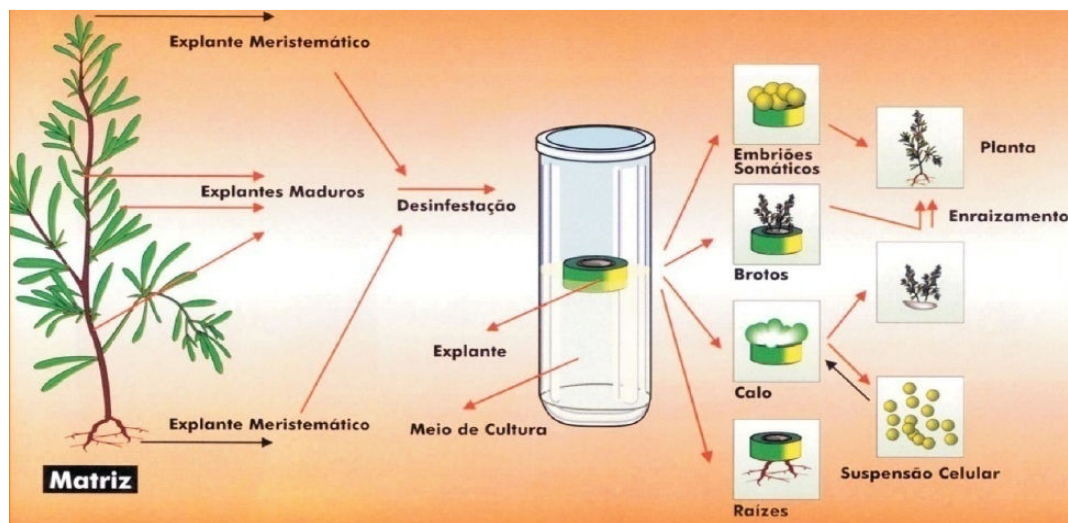


Figura 2: Princípio geral da cultura de tecidos. Fonte: Kerbaui, 1997.

2.2.3. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são usados para suprir as deficiências hormonais endógenas nos explantes em condições *in vitro*. Atuam em pequenas concentrações e têm efeito

similar ao dos fitohormônios produzidos pelas plantas, diferindo destes, apenas por serem sintéticos.

Os hormônios sintetizados pelas plantas podem ser classificados como, auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e ácido jasmônico (CID e TEIXEIRA, 2010). As auxinas e citocininas, seja na forma natural ou sintética, são frequentemente utilizadas nos protocolos de regeneração.

Em cultura de tecidos, as auxinas promovem a indução de calos a partir de um explante e o enraizamento de brotos (CID e TEIXEIRA, 2010). Segundo Nóbrega et al. (1999), estas substâncias atuam no crescimento, alongamento e divisão celular; e são representadas principalmente por: AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenoacético) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético).

As citocininas pertencem ao grupo de substâncias que promovem a divisão celular em calos na presença de auxina (TAIZ e ZEIGER, 2004; CID e TEIXEIRA, 2010), são usadas para promover a indução de brotos adventícios a partir de calos ou induzir multibrotação em gemas axilares ou apicais (CID et al., 1994), podem ainda, inibir a formação de raízes em plântulas (CARVALHO, 1999). Entre as citocininas sintéticas, as mais utilizadas em cultivo *in vitro* são: KIN (Cinetina – 6-furfurilaminopurina) e BAP (6-benzilaminopurina).

2.2.4. Fontes de nitrogênio orgânico

Compostos nitrogenados são considerados essenciais na composição dos meios nutritivos por atuarem nos diversos eventos fisiológicos da planta como, controle do crescimento, diferenciação e morfogênese. A combinação de fontes nitrogenadas tem proporcionado bons resultados na organogênese e embriogênese somática *in vitro* (LAKSHMANAN e TAJI, 2000). Podem ser fornecidos na forma de nitrato, amônio ou aminoácidos, dentre eles a glutamina.

2.2.4.1. L – Glutamina

A glutamina (precursora dos demais aminoácidos) é comumente utilizada em meios de cultura de plantas superiores (FRANKLIN e DIXON, 1994). Também tem sido utilizada na complementação das fontes inorgânicas de nitrogênio, ou ainda como fonte única desse composto promovendo o crescimento de tecidos *in vitro* (CALDAS et al., 1990). Segundo

Stasolla et al. (2001) a suplementação exógena de glutamina pode estimular a síntese de proteínas e a rápida divisão de células embriogênicas.

Estudos envolvendo embriogênese somática *in vitro* reportam a importância da L – glutamina no processo de rediferenciação tissular. Dal Vesco e Guerra (2001) observaram aumento no número de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos imaturos em goiabeira serrana nos meios suplementados com glutamina. Costa (2007) cita a importância desse composto para a obtenção de estruturas globulares e pré embriogênicas em meio basal MSB em cultivar de algodoeiro BRS – 187 – 8H.

2.2.5. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, naturalmente encontrada na parede do micélio de alguns fungos e em alguns moluscos (STAMFORD et al., 2007). Na indústria, a quitosana pode ser obtida por diacetilação da quitina, polímero natural, insolúvel, com o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4 N-acetilglucosamina (CANELLA e GARCIA, 2001). A quitina é o principal componente do exoesqueleto dos artrópodes, crustáceos, e da parede celular de fungos (FAI et al., 2008). O uso da quitosana na agricultura vem sendo amplamente difundido, devido a seus efeitos benéficos sobre as culturas e o meio ambiente. Dentre sua aplicabilidade, atua no crescimento e desenvolvimento das plantas, no estímulo à imunidade e como fertilizante (NGE et al., 2006).

Sua funcionalidade em cultivo *in vitro* ainda é pouco conhecida. Não há estudos que comprovem sua eficácia na regeneração de plantas do algodoeiro. No entanto, Nge et al. (2006), Luan Le et al. (2005), Kanchanapoom et al. (2010) citam, respectivamente, a capacidade da quitosana de estimular a diferenciação de plântulas de orquídeas, o crescimento de plantas *in vitro* com maior taxa de multiplicação da parte aérea, além de apresentar-se potencialmente útil na micropropagação do dendeneiro.

2.2.6. Organogênese

A organogênese *in vitro* compreende o processo de obtenção de estruturas monopolares como, eixos caulinares, que subsequentemente são induzidos ao enraizamento pela ação de reguladores de crescimento até formar plantas completas. Todo o processo é determinado pelo

balanço hormonal entre auxina e citocinina (GUERRA e NODARI, 2006). Esta via de regeneração de plantas pode ocorrer de forma direta ou indireta.

Na organogênese direta, eixos caulinares se formam diretamente de células diferenciadas, sem a proliferação de calos. Diferentemente, a forma indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. Embora esta última, não seja propícia para fins de propagação clonal, porque pode resultar em variantes genéticas indesejáveis, entretanto, é potencialmente útil nos programas de melhoramento para obtenção de novas cultivares, resistentes a fatores de estresses bióticos ou abióticos ou com características melhoradas (GUERRA e NODARI, 2006; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A organogênese direta é a via mais utilizada para induzir o superbrotamento, com o qual, a partir de um único explante se obtém várias plantas geneticamente idênticas à planta matriz em menor espaço de tempo. Dessa forma, a propagação clonal é mais eficaz em termos de estabilidade genética, uma vez que, reduz a possibilidade de gerar variantes genéticas por variação somaclonal. Sua utilização abrange, entre outros, a produção de plantas isentas de patógenos, a regeneração de plantas geneticamente modificadas e a multiplicação de plantas conservadas *in vitro* (LIMA et al., 2012).

Variedades de algodão induzidas ao superbrotamento *in vitro* mostraram-se competentes ao produzirem resultados satisfatórios como relatado em Tavares et al. (2005), Carvalho et al. (2006 a) e Rocha et al. (2008), que utilizaram diferentes concentrações de BAP e KIN para induzir a brotação em explantes das cultivares de algodão CNPA 98-1034, BRS Verde, BRS 200 Marrom, 6M Moco Branco, BRS 187-8H.

2.2.7. Embriogênese Somática

A embriogênese somática (ES) pode ser definida como o processo pelo qual, células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos originando uma nova planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986). Segundo Yang e Zhang (2010), a ES representa uma via única de desenvolvimento que inclui uma série de eventos característicos como, desdiferenciação de células, ativação da divisão celular e reprogramação da sua fisiologia, metabolismo e padrões de expressão de genes.

Existem dois tipos de ES *in vitro*: direta e indireta. No primeiro caso, os embriões se formam a partir de células somáticas competentes sem necessidade de sucessivos estádios de

desdiferenciação. Enquanto que, na forma indireta, as células passam por consecutivos estádios de desdiferenciação até tornarem-se células embriogênicas ao adquirir competência e, posteriormente, serem rediferenciadas para constituição do embrião somático (ZIMMERMANN, 2010).

A ES é considerada um sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores, apresentando aplicações biotecnológicas potenciais como alta taxa de multiplicação comparada a outros processos de propagação, produção de sementes sintéticas, possibilidade de transferência de genes, indução e seleção de mutações, importantes ferramentas para a propagação clonal e o melhoramento genético, além de dispensar a manipulação do material vegetal como separação de brotos e enraizamento que são necessários na organogênese (BARROS, 1999; MOURA, 2007; CASTRO et al., 2010).

A via de regeneração por embriogênese somática tem importância crucial nos programas de melhoramento do algodão. No entanto, ainda está limitada a poucos genótipos, principalmente a cv. Coker (DAVIDONS e HAMILTON, 1983; TROLINDER e GOODIN, 1987; HAQ, 2005), provavelmente devido à forte influência do genótipo que torna a cultura recalcitrante, limitando o uso de um mesmo protocolo em diferentes cultivares.

2.3. Espectroscopia em infravermelho próximo (*Near InfraRed*)

A espectroscopia NIR permite análises simplificadas de propriedades químicas e físicas com mínima ou sem necessidade de preparação da amostra, a fim de adquirir informações qualitativas e/ou quantitativas por meio da interação das ondas eletromagnéticas do infravermelho próximo com os constituintes da amostra (PASQUINI, 2003).

A região espectral NIR (*Near InfraRed*) estende-se de 800 nm até 2500 nm. As absorções envolvidas, geralmente, compreendem C–H, N–H e O–H (SIESLER et al., 2002; HOLLER, 2009).

O interesse pelo uso da técnica NIR para caracterização de produtos agrícolas é crescente. Dentre as vantagens desta técnica pode-se elucidar a análise não destrutiva da amostra, precisão dos resultados, simplicidade e rapidez de leitura. E, ainda, é amplamente utilizado na quantificação e qualificação dos constituintes de uma amostra, como por exemplo, no agrupamento de amostras semelhantes e na determinação de amostras irregulares (ALMEIDA, 2009). Segundo Montes et al. (2007) poderá também emergir como uma importante ferramenta para análise de processos biológicos, tais como a embriogênese somática, por realizar análises

de forma não destrutiva, e assim reduzir o número de ensaios sem a necessidade do uso de reagentes, permitindo a conservação das amostras para uso posterior.

2.3.1. Quimiometria

Quimiometria é uma área de estudo que aplica métodos matemáticos e estatísticos às ciências químicas, de modo a delinear procedimentos experimentais, obter a máxima informação química relevante por meio dos dados obtidos, bem como, obter o conhecimento dos sistemas químicos (ALMEIDA, 2009).

Dentre as diversas subáreas da quimiometria, o reconhecimento de padrões, possibilita encontrar agrupamentos de amostras que são similares entre si e, assim, detectarem tendências nos dados, a partir de uma série de informações químicas ou espectrais, por exemplo, sobre um vasto número de amostras. A análise por componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um dos métodos mais utilizados na quimiometria, constituindo a base para o reconhecimento de padrões. A PCA é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (SOUZA e POPPI, 2012).

Dessa forma, poderá contribuir potencialmente com os estudos de embriogênese somática, como uma ferramenta de seleção de genótipos com provável competência embriogênica, reduzindo a quantidade de testes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratório de Cultivo de Tecidos e Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATEQ) da Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba. E, executados em duas etapas: *Ensaio 1*: Embriogênese somática e *ensaio 2*: Organogênese.

3.1. Ensaio 1: Embriogênese Somática

3.1.1. *Material vegetal*

Foram utilizadas sementes de treze cultivares disponíveis no Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Algodão - BRS Rubi, BRS 286, BRS Safira, BRS 293, CNPA 8H, CNPA Precoce 3, CNPA precoce 1, BRS Verde, BRS Araripe, BRS Acácia, BRS Seridó, BRS Topázio, BRS 201 e duas cultivares estrangeiras, Coker 310 e Coker 312, totalizando quinze amostras.

3.1.2. *Seleção de genótipos: Espectroscopia NIR e Quimiometria*

Dos quinze genótipos supracitados, dois foram utilizados como modelo para as análises por apresentarem competência embriogênica, a BRS Seridó (CARVALHO e SILVA, 2009) e a Coker 312 (TROLINDER e XHIXIAN, 1989; HAQ, 2005; SAKHANOKHO et al., 2004; GHAEMI et al., 2011).

Todas as amostras foram analisadas em espectrômetro VIS-NIR modelo XDS Analyser (Figura 3), usando medidas de reflectância numa faixa espectral de 800 a 2500 nm. Foram realizadas três repetições por amostra.

A escolha dos genótipos para embriogênese foi baseada na análise exploratória por meio de Análise de Componentes Principais usando medidas de reflectância difusa de sementes na região espectral de 1100 a 2500 nm. Os espectros foram pré processados com a técnica de Savitzky e Golay (1964) com janela de 11 pontos e ajuste com polinômio de segunda ordem e primeira derivada. Utilizou-se o software estatístico The Unscrambler X.2[®] para executar as análises quimiométricas.



Figura 3: Análise de componentes principais no NIR: (A) espectrômetro XDS Analyser; (B) célula com sementes de algodão; (C) célula preparada para análise no NIR. Foto: Taiza da Cunha. Soares. Campina Grande, 2013.

3.1.3. Desinfestação das sementes e obtenção de plântulas matrizes

As sementes dos genótipos selecionados foram lavadas em água corrente e, posteriormente, desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 1% (v/v) de cloro ativo, adicionado de duas gotas de Tween-20[®] para cada 100 mL da solução, durante 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por três enxagues em água destilada estéril. Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio MS basal (MURASHIGE e SKOOG, 1962), incubadas na ausência de luminosidade durante 3 a 7 dias e, depois mantidas em câmara de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.1.4. Indução de calos (IC)

Explantos hipocotiledonares com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram excisados das plântulas matrizes obtidas *in vitro* e inoculados em placas de Petri contendo meio

MS com vitaminas do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN. Posteriormente, foram mantidos em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante quatro semanas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado simples com 20 repetições, tendo como unidade experimental placas de Petri contendo nove explantes.

3.1.5. Proliferação de calos (PC)

Os calos formados por indução foram transferidos para o mesmo meio, contendo $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN, e mantidos em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante quatro semanas.

3.1.6. Rediferenciação de calos (RC)

Nessa etapa, realizou-se raspagem dos calos para retirar somente a parte friável, formando pequenas porções com aproximadamente 1,0 g de massa celular que foram transferidos para meio MS isento de fitorreguladores e suplementado com $2,0 \text{ gL}^{-1}$ de glutamina isolada (Meio RC) ou associada a 20 mgL^{-1} de quitosana (Meio RCQ). Foram realizadas 10 repetições. E, cada placa continha aproximadamente 12 porções de calo. Os cultivos foram mantidos em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

As etapas da embriogênese somática foram descritas na figura 4. Os meios de cultura utilizados no ensaio da embriogênese somática foram suplementados com 3,0 % (m/v) de glicose e 0,26% (m/v) de Phytigel. Os procedimentos de inoculação dos explantes e transferência dos calos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

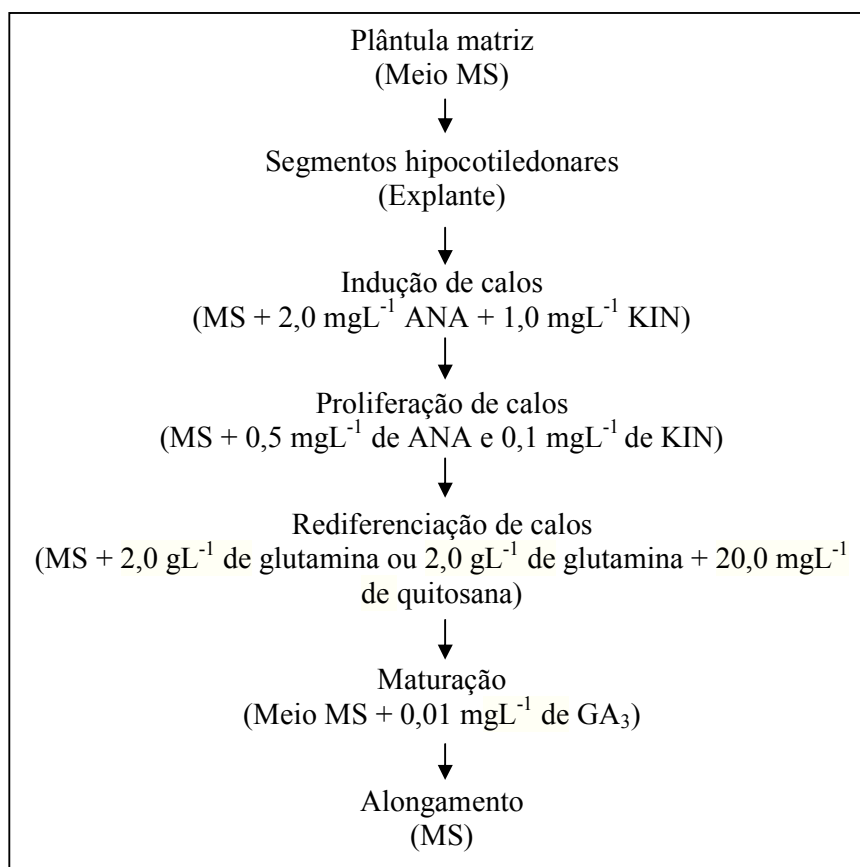


Figura 4: Esquema simplificado das etapas da Embriogênese Somática.

3.1.7. Análise dos resultados

Foi feito o registro fotográfico ao final de cada etapa para evidenciar a ação dos protocolos utilizados e a resposta de cada cultivar.

Durante a etapa de rediferenciação dos calos, foram quantificados os embriões somáticos por tratamento (RC e RCQ) nas cultivares que se apresentaram responsivas.

3.1.8. Maturação e alongamento dos embriões somáticos

Os embriões no estágio cotiledonar foram inoculados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com 0,01 mgL⁻¹ de GA₃ para maturação e, após duas a quatro semanas transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS sem fitorreguladores para promover o alongamento.

3.2. Ensaio 2: Organogênese

3.2.1. Material vegetal

Para este ensaio, utilizou-se sementes da cultivar de algodão colorido BRS Rubi, as quais foram desinfestadas e inoculadas em tubos de ensaio para obtenção das plântulas matrizes, conforme protocolo do tópico 3.1.3 do ensaio da embriogênese somática.

3.2.2. Indução de brotos

A formação de brotos foi induzida a partir de explantes oriundos de nós cotiledonares excisados das plântulas matrizes.

Os explantes foram submetidos a 13 tratamentos (Tabela 1) com combinação similar entre a quitosana (Qui) e a citocinina 6-benzylaminopurine (BAP) associada a diferentes concentrações de Cinetina (KIN), ácido indobultírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA).

Tabela 1: Descrição dos tratamentos utilizados na indução de superbrotamento da cv. BRS Rubi.

TRATAMENTOS	
T1*	MS + 15,0 mgL ⁻¹ Qui
T2	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,0 mgL ⁻¹ KIN
T3	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,1 mgL ⁻¹ KIN
T4	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,5 mgL ⁻¹ KIN
T5	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 1,0 mgL ⁻¹ KIN
T6	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,0 mgL ⁻¹ AIB
T7	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,1 mgL ⁻¹ AIB
T8	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,5 mgL ⁻¹ AIB
T9	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 1,0 mgL ⁻¹ AIB
T10	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,0 mgL ⁻¹ ANA
T11	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,1 mgL ⁻¹ ANA
T12	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 0,5 mgL ⁻¹ ANA
T13	3,0 mgL ⁻¹ BAP + 15,0 mgL ⁻¹ Qui + 1,0 mgL ⁻¹ ANA

* T1 - Testemunha.

Os meios foram suplementados com 3% (m/v) de sacarose, 0,57% (m/v) de ágar e o pH ajustado em 5,7 antes da autoclavagem, a 120°C durante 20 minutos.

Para cada tratamento realizou-se 10 repetições, tendo como unidade experimental, frascos contendo três explantes em delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 4 + 1, sendo três tipos de fitorreguladores (KIN, AIB, ANA) em quatro concentrações (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mgL⁻¹) associados ao BAP e Qui mais uma testemunha. Os cultivos foram mantidos em câmara de crescimento a 25±2°C com fotoperíodo de 16h de luz e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻²s⁻¹.

3.2.3. Alongamento, enraizamento e aclimatização

Os explantes com os brotos formados foram inoculados em meio MS isento de fitorreguladores, durante 30 dias para promover o alongamento. Posteriormente, os brotos com tamanho superior a 1,0 cm foram excisados e induzidos ao enraizamento em meio MS suplementado com 0,25 mgL⁻¹ de AIA (ácido indol-3-acético).

As plântulas enraizadas foram cultivadas em substrato (turfa + vermiculita) estéril e permaneceram em câmara de crescimento para adaptar-se às condições autotróficas. Em seguida, transferidas para vasos em casa de vegetação, para completarem seu crescimento e desenvolvimento.

3.2.4. Análise dos dados

Foram realizadas duas avaliações a cada 25 dias após subcultivo para o mesmo meio. As variáveis analisadas foram o número de brotos/ explante (NB) e o tamanho do maior broto (TMB).

Com auxílio do programa SAS[®] 9.2 (SAS\STAT; 2009), os dados foram transformados pela função $\sqrt{x + 1}$ e submetidos à análise de variância complementada com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para fator qualitativo. E, análise de regressão pelo método polinômios ortogonal para fator quantitativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Espectroscopia e quimiometria

As análises realizadas no NIR mostram que não houve separação dos espectros brutos originados da análise das sementes *in natura* das quinze cultivares de algodoeiro (Figura 5). Dessa forma, a região analisada (1100 a 2500 nm), permite uma sobreposição dos espectros obtidos a partir das amostras estudadas.

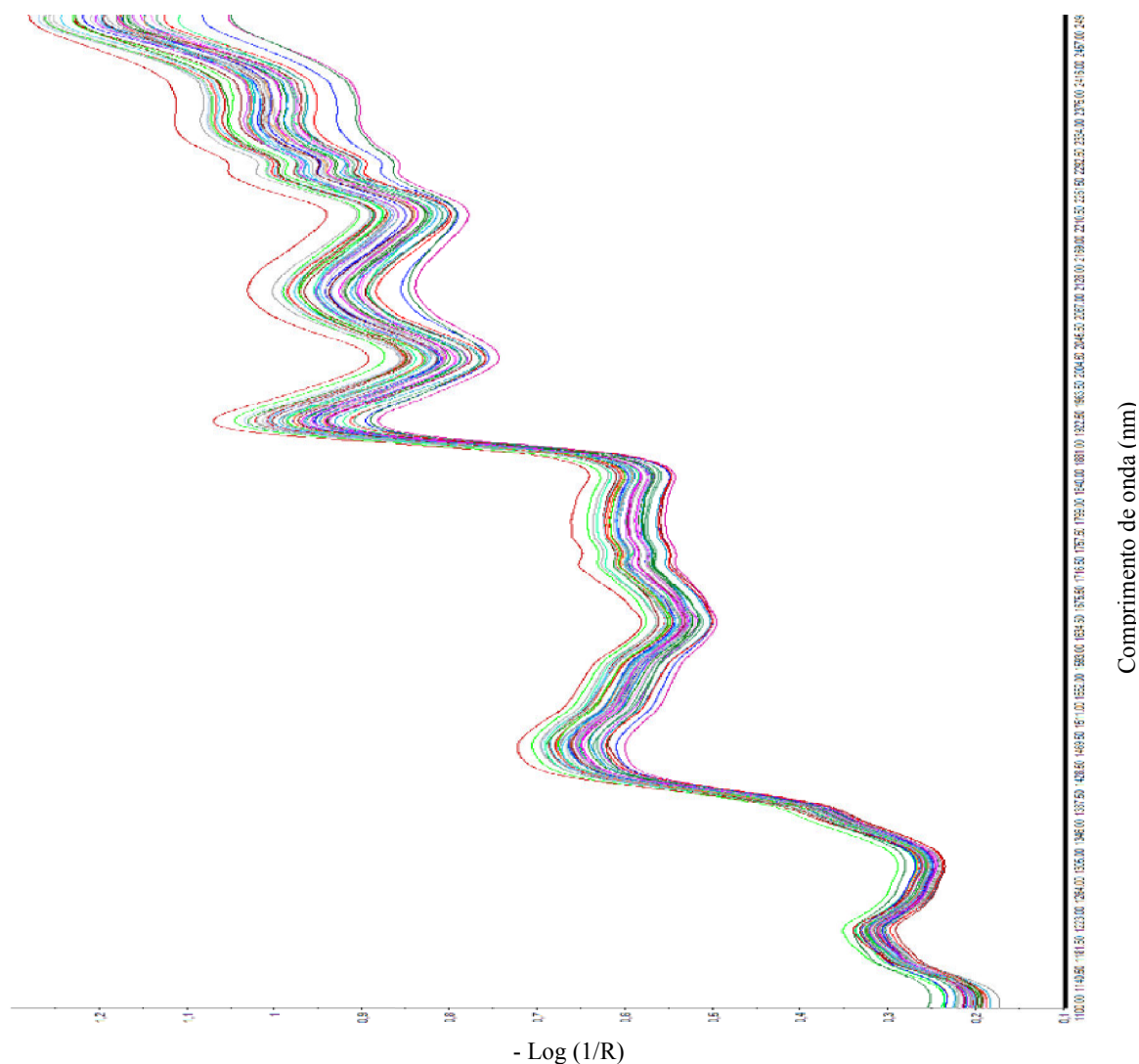


Figura 5: Espectros de reflectância no NIR (região de 1100 a 2500 nm), obtidos da análise de sementes de quinze cultivares de algodão selecionadas para o estudo. Campina Grande, 2013.

Na figura 6, observam-se os espectros derivados na região de 1100 a 2500 nm, obtidos do pré-processamento (Savitzky e Golay, 1964) dos dados brutos. Com isso, foi possível evidenciar as sobreposições entre as amostras em regiões específicas de absorção e uma nítida separação de uma das amostras (BRS Verde) devido a divergência na composição química em relação às cultivares modelo (Coker 312 e BRS Seridó).

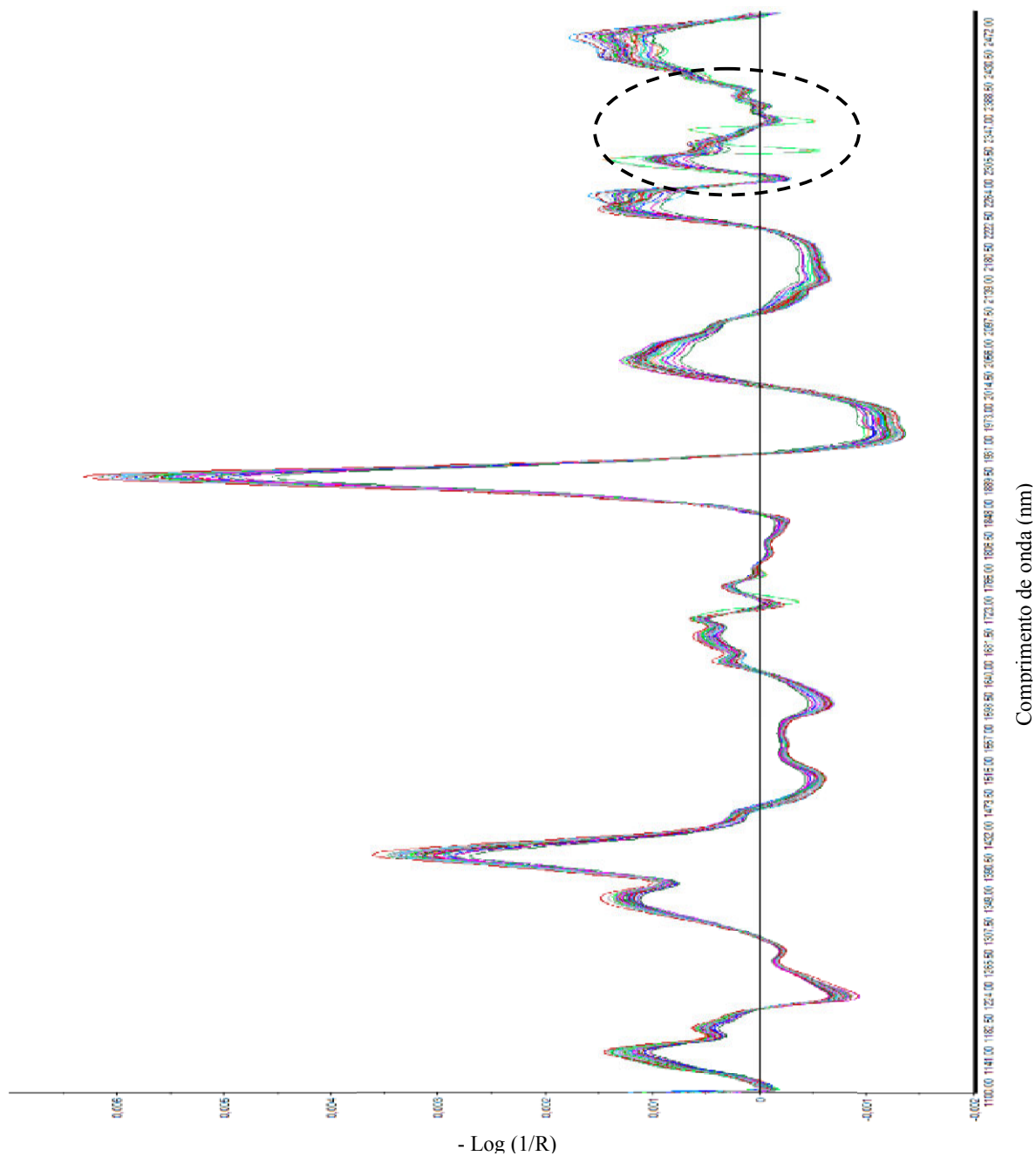


Figura 6: Espectros derivativos (região de 1100 a 2500 nm) obtidos do pré-processamento (Savitzky e Golay) dos dados das amostras de sementes de quinze cultivares de algodoeiro. Campina Grande, 2013.

Na figura 7 do PC1 x PC2, pode-se observar que há separação dos escores das sementes BRS 293, BRS Verde, BRS 286, BRS Safira, Coker 310, BRS Topázio e CNPA 8H, que apresentam-se mais espalhados e numa região menos próxima as cultivares modelo (Coker 312 e BRS Seridó) que, segundo Ferrari (2004), representa uma variação na composição química dessas amostras. Do mesmo modo, há sobreposição ou aproximação nos agrupamentos das cultivares, CNPA Precoce 1 e Precoce 3, BRS 201, BRS Rubi, BRS Araripe e BRS Acácia com a Coker 312 e a BRS Seridó.

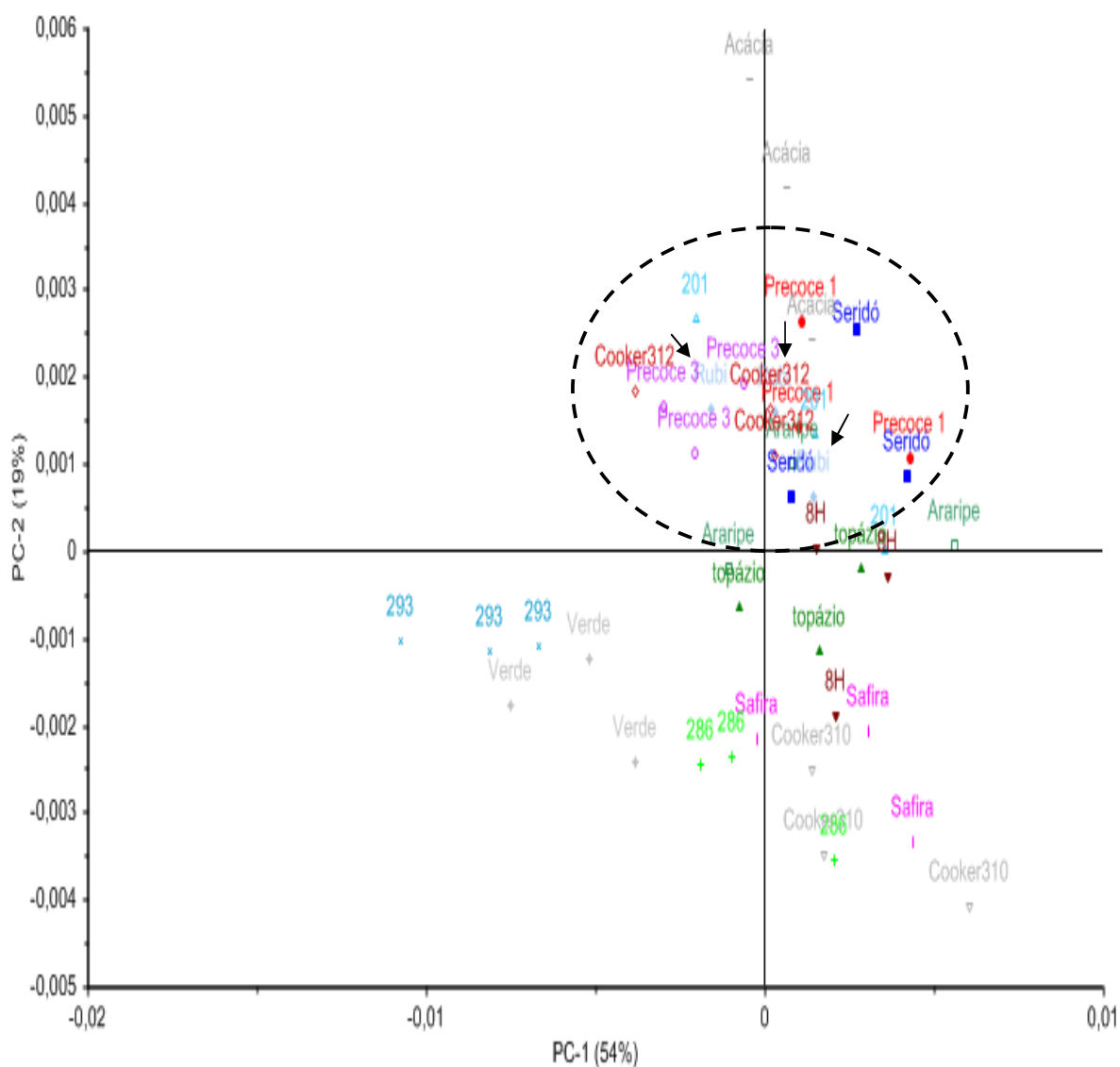


Figura 7: PCA dos espectros pré-processados: Escores do PC1 x PC2 (na região de 1100 a 2500 nm) aplicado ao conjunto das amostras de sementes de cultivares de algodão. Campina Grande, 2013.

Os agrupamentos arranjados pela cv. BRS Rubi foram mais bem definidos, isso porque as amostras ficaram mais agregadas ou sobrepostas as cultivares modelo, demonstrando maior similaridade entre a composição química destas. A variância total explicada para as duas PCs nesta análise foi de 73%. Portanto, o gráfico dos escores da PCA foi usado como critério para escolha dos genótipos com maior possibilidade de indução à embriogênese somática com relação aos genótipos de controle.

Com base nos resultados obtidos na PCA, foram utilizadas sementes das cultivares Coker 312 (controle), BRS Rubi, BRS 201 e CNPA Precoce 1 (Substituiu a Precoce 3 que não apresentou germinação satisfatória para obtenção das plantas matrizes) para indução à embriogênese somática.

4.2. Embriogênese somática

Pode-se constatar na figura 8 que, após quatro semanas todas as cultivares testadas responderam satisfatoriamente aos meios de indução (MS + 2 mgL⁻¹ ANA + 1 mgL⁻¹ KIN) e proliferação de calos (MS + 0,5 mgL⁻¹ de ANA e 0,1 mgL⁻¹ de KIN). Os explantes iniciaram a dediferenciação a partir da primeira semana de cultivo. Outros estudos, como em Sakhanokho et al. (2004) e Silva et al. (2010), evidenciaram os melhores resultados utilizando estas mesmas concentrações para indução de calos em explantes de diferentes genótipos do algodoeiro.

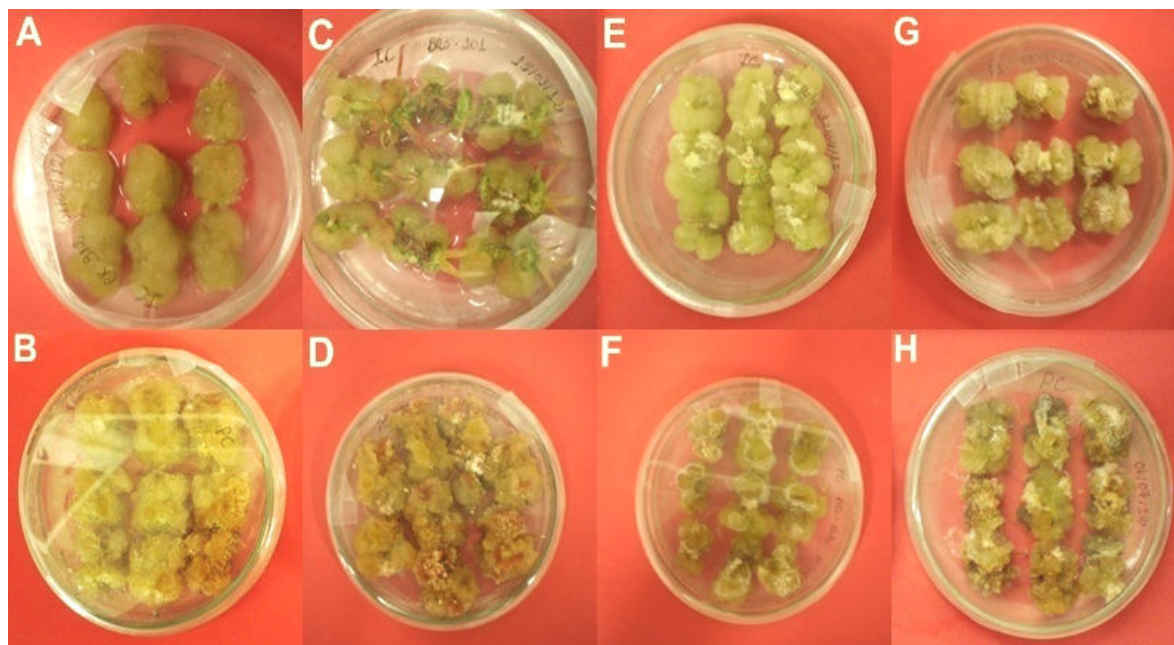


Figura 8: Indução (A, C, E, G) e proliferação (B, D, F, H) de calos em meios de cultivos contendo, respectivamente, $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ ANA + 1 mgL^{-1} KIN e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA + $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN. (A) (B) Coker 312; (C) (D) BRS 201; (E) (F) BRS Rubi; (G) (H) CNPA Precoce 1. Foto: Taiza da Cunha Soares. Campina Grande, 2013.

Após oito semanas, porções friáveis dos calos foram induzidas a rediferenciação em meios com $2,0 \text{ gL}^{-1}$ de glutamina isolada ou associada a $20,0 \text{ mgL}^{-1}$ de quitosana. Observou-se que as cultivares produziram calos friáveis, possivelmente embriogênicos, exceto a CNPA Precoce 1. Entretanto, somente as cultivares BRS Rubi e Coker 312 (modelo) mostraram-se competentes ao rediferenciar calos em embrióides, embora com baixa frequência (Figura 9).

O único teste realizado com a cv. BRS Rubi foi relatado em Medeiros et al. (2007) que não obtiveram sucesso ao utilizar diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA, AIA e KIN, não resultando na formação de embriões somáticos

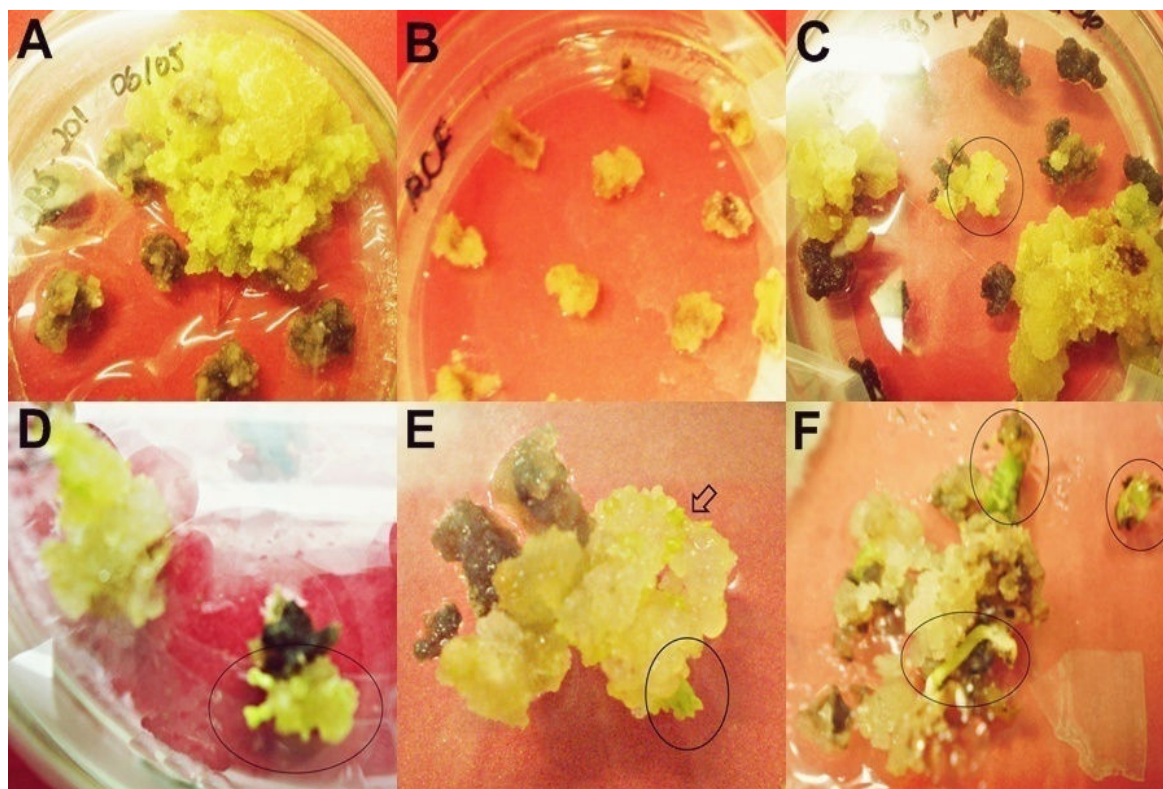


Figura 9: Embriogênese somática em cultivares do algodoeiro. (A) Calos possivelmente embriogênicos em BRS 201; (B) Calos não embriogênicos em CNPA Precoce 1; Calos embriogênicos e embriões somáticos em (C) (E) (F) BRS Rubi (D) Coker 312, formados após oito semanas. Foto: Taiza da Cunha Soares. Campina Grande, 2013.

A formação de embriões somáticos foi notadamente constatada nos meios isentos de quitosana (Tabela 2), aludindo que, esta não induziu ou até inibiu a rediferenciação de calos em embriões somáticos nos genótipos estudados. Nge et al. (2006), ao estudarem o efeito de diferentes preparações de quitosana na diferenciação de meristemas axilares em protocormos de orquídeas, demonstraram a capacidade desse biopolímero em estimular a diferenciação dos tecidos. A glutamina, por sua vez, é uma fonte de nitrogênio orgânico, comumente utilizada nos protocolos de embriogênese somática do algodoeiro, com efeito positivo na morfogênese *in vitro* da cultura (ZHANG et al., 2003; HAN et al., 2009; SILVA et al., 2010), bem como em outras culturas como: mamoeiro (*Carica papaya L.*) (ALMEIDA et al., 2001), goiabeira (*Psidium guajava L.*) (MOURA e MOTOIKE, 2009), dendenzeiro (*Elaeis guineensis Jacq.*) (PEREIRA et al., 2010), entre outras.

Tabela 2: Número total de embriões por tratamento* formados a partir de calos embriogênicos subcultivados em meio RC (MS + 2,0 gL⁻¹ glutamina) e meio RCQ (MS + 2,0 gL⁻¹ glutamina + 20,0 mgL⁻¹ quitosana) após oito semanas.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE EMBRIÓIDES			
	COKER 312	BRS 201	BRS RUBI	PRECOCE 1
RC	4	0	20	0
RCQ	1	0	0	0

* Dez placas por tratamento. Observações feitas a olho nu.

Os embriões somáticos em estágio cotiledonar foram isolados da massa celular (Figura 10 – A, B) e subcultivados em meio MS suplementado com 0,01 mgL⁻¹ de GA₃ para promover o desenvolvimento da parte radicular no processo de maturação e após quinze dias foram transferidos para meio de alongamento sem fitorreguladores (Figura 10 – C, D).

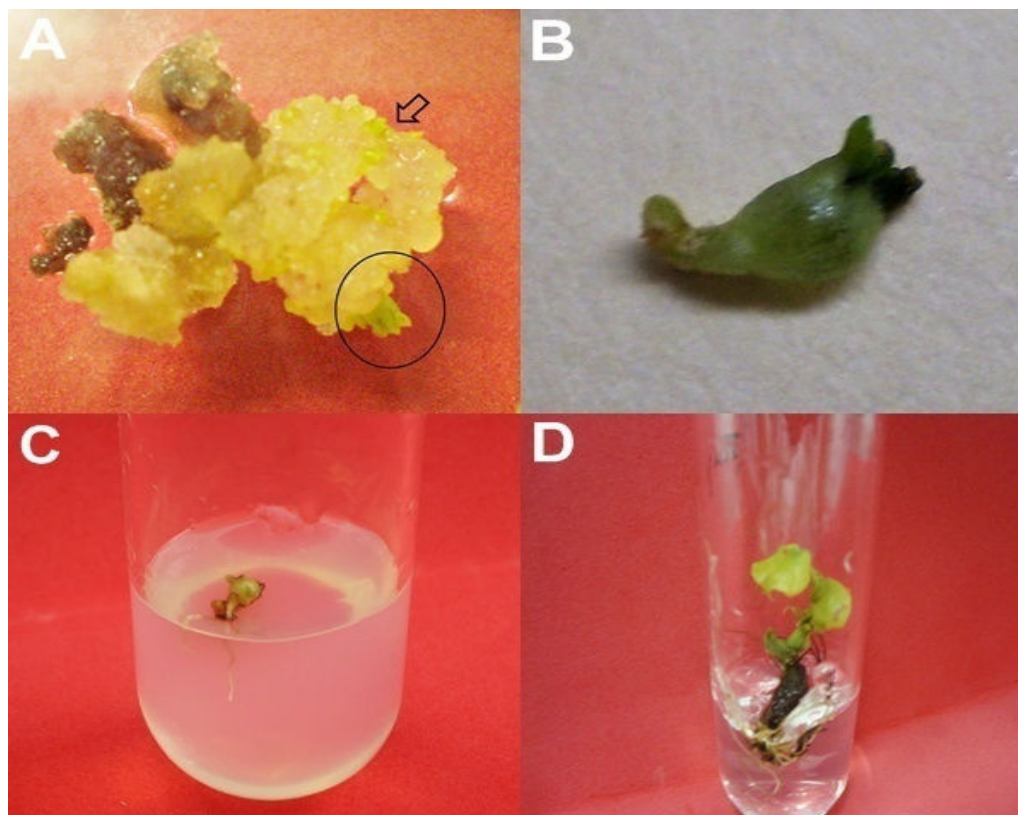


Figura 10: Embriões somáticos oriundos de segmentos hipocotiledonares da cv. BRS Rubi. (A) (B) Estádio cotiledonar; (C) Maturação; (D) Alongamento. Foto: Taiza da Cunha Soares. Campina Grande, 2013.

Apesar da percentagem de embriões somáticos regenerados ter sido baixa (10% na BRS Rubi e 20% na Coker 312) em relação a outros trabalhos realizados com cultivares estrangeiras como em Haq (2005), Han et al. (2009) e Rajeswari et al. (2010), os resultados obtidos constituem informações relevantes para posteriores estudos biotecnológicos com a cv. BRS Rubi. No entanto, os protocolos utilizados para maturação e alongamento dos embriões somáticos resultaram, majoritariamente, em organismos deformados ou mesmo que não conseguiram completar seu crescimento e desenvolvimento. Nesse sentido, novos protocolos devem ser testados com intuito de aperfeiçoar a obtenção de embriões completos e aumentar o número de plantas regeneradas.

Dessa forma, a espectroscopia associada a técnicas quimiométricas como a PCA auxiliou na seleção de genótipos possivelmente competentes à embriogênese somática, uma vez que, as principais cultivares selecionadas (Coker 312 – modelo e BRS Rubi) formaram calos embriogênicos. Entretanto, estudos mais específicos devem ser feitos com relação à aplicação da espectroscopia e da quimiometria na seleção de genótipos competentes e, principalmente, na melhoria dos protocolos de rediferenciação e maturação de embriões somáticos.

A intensificação de pesquisas no campo da embriogênese somática do algodoeiro e, a definição de protocolos cada vez mais eficazes e abrangentes trará novas possibilidades ao melhoramento genético da cultura.

4.3. Organogênese

Para o ensaio da organogênese, selecionou-se a BRS Rubi por ser a única cultivar de algodão colorido e por apresentar competência embriogênica dentre as cultivares testadas no ensaio anterior.

Pode-se observar após 25 dias do primeiro subcultivo, o superbrotamento em explantes submetidos a diferentes tratamentos (Figura 11 – A, B, C, D, E). Entretanto, nos meios suplementados apenas com BAP e quitosana (Figura 11 – D, E), os explantes produziram maior quantidade de brotos quando comparados aos demais tratamentos. Assim como na embriogênese somática a quitosana não favoreceu a rediferenciação tissular, do mesmo modo, na organogênese os explantes alongaram, mas não produziram novos brotos (Figura 11 - F).

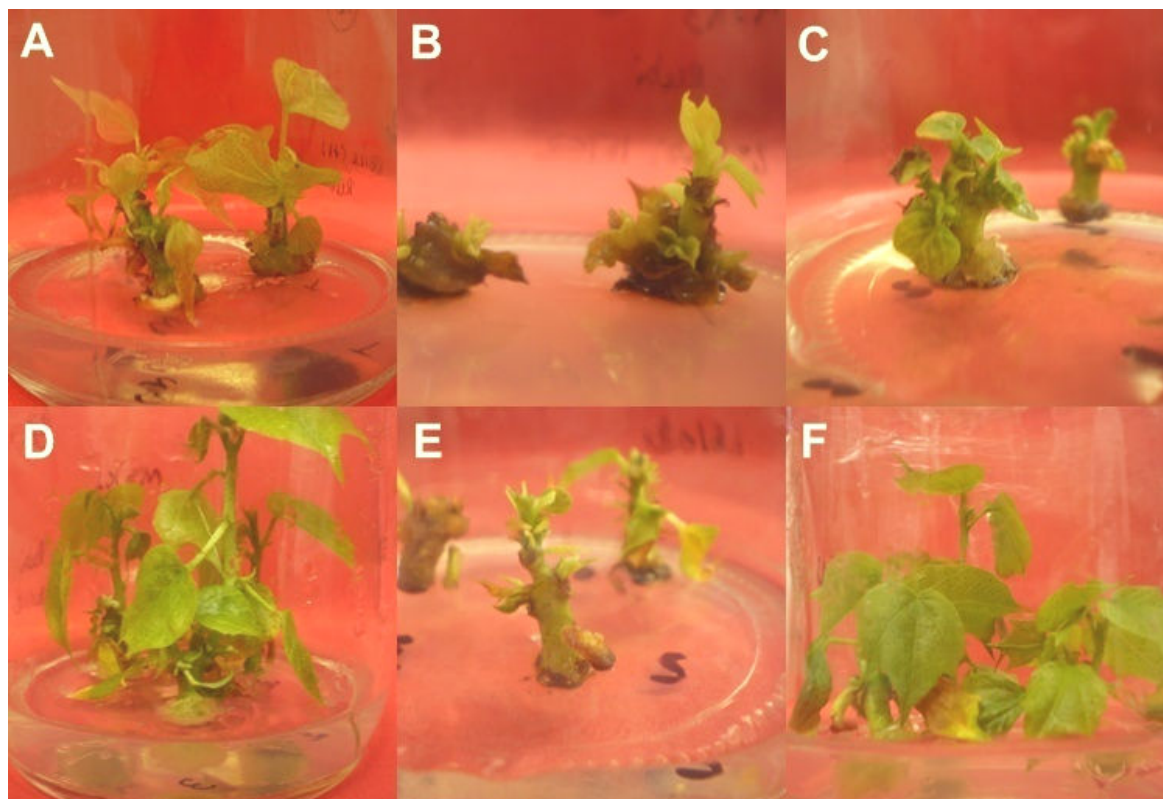


Figura 11: Organogênese *in vitro* da cv. BRS Rubi: Superbrotamento em explantes subcultivados em meio de cultura (A) MS com BAP + QUI + 0,1 mgL⁻¹ AIB; (B) MS com BAP + QUI + 0,5 mgL⁻¹ KIN; (C) MS com BAP + QUI + 0,1 mgL⁻¹ ANA; (D) (E) MS com BAP + QUI; (F) Testemunha (MS + QUI). Foto: Taiza da Cunha Soares. Campina Grande, 2013.

Nesse caso, a quitosana funcionou como fonte de nitrogênio orgânico, mas não influenciou na formação de novos brotos. Em contrapartida, estudos realizados com outras culturas sugerem o efeito positivo deste biopolímero na morfogênese *in vitro*. Kanchanapoom et al. (2012) ao estudar o efeito da quitosana na regeneração de lírio (*Lilium longiflorum* Thunb), obtiveram a média de 5 brotos por explante em meio contendo 25,0 mgL⁻¹ de quitosana contra 4,7 brotos em meio com 5,0 mgL⁻¹ de BAP. E ainda, Kanchanapoom et al. (2010) observaram que calos de embriões zigóticos de dendezeiro adquiriram melhor competência organogênica quando cultivados em meio suplementado com 15,0 mgL⁻¹ de quitosana isolada ou associada ao 2,4 D.

A análise dos dados para número de brotos/ explante (Tabela 3), mostrou que, os reguladores de crescimento analisados, bem como a relação entre o fatorial e a testemunha não foram significativos ($P > 0,05$). Já para os fatores quantitativos, verifica-se diferença significativa ($P < 0,01$) que está relacionada aos efeitos produzidos em relação às diferentes

concentrações. Dessa forma, a adição dos demais reguladores de crescimento associados ao BAP ou as concentrações em que foram utilizados não promoveram aumento significativo da quantidade de brotos em relação à testemunha que não apresentou superbrotamento.

Tabela 3: Resumo de análise de variância referente à variável número de brotos/ explante (NBt).

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
RC	2	0,085	0,0425 ^{NS}	1,416
CONC	3	2,09	0,699 ^{**}	23,3
RC x CONC	6	0,68	0,113 ^{**}	3,76
FAT x TEST	1	0,0034	0,0034 ^{NS}	0,113
ERRO	117	3,566	0,030	
CV %			9,97	

^{NS} Não significativo ($P > 0,05$)

^{**} Significativo ($P < 0,01$)

Observa-se na figura 12 que há tendência linear para as auxinas AIB e ANA, ou seja, com o aumento da concentração a média do número de brotos decresce. Resultados similares foram descritos por Brum et al. (2002) ao estudarem o efeito de diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1; 2; 4 mgL⁻¹) e ANA (0,0; 0,05; 0,1; 0,2 mgL⁻¹) na propagação *in vitro* de Figueira (*Ficus carica L.*) em que o maior número de brotos foi alcançado nas concentrações de 2,0 e 4,0 mgL⁻¹ de BAP isolado, a adição de ANA não melhorou significativamente a resposta dessa variável, exceto 0,1 mgL⁻¹ na ausência de BAP ou 0,1 mgL⁻¹ e 0,2 mgL⁻¹ associados a 1,8 e 2,1 mgL⁻¹ de BAP. Sousa e Miranda (2006) relataram que a adição de AIB nas concentrações 0,0, 0,05 e 0,5 mgL⁻¹ associado ao BAP ou a KIN não influenciou na proliferação de brotos em explantes de *Gerbera jamesonni* var. ‘ornela, no entanto, a concentração de 0,5 mgL⁻¹ dessa auxina propiciou melhores características para a multiplicação dessa variedade.

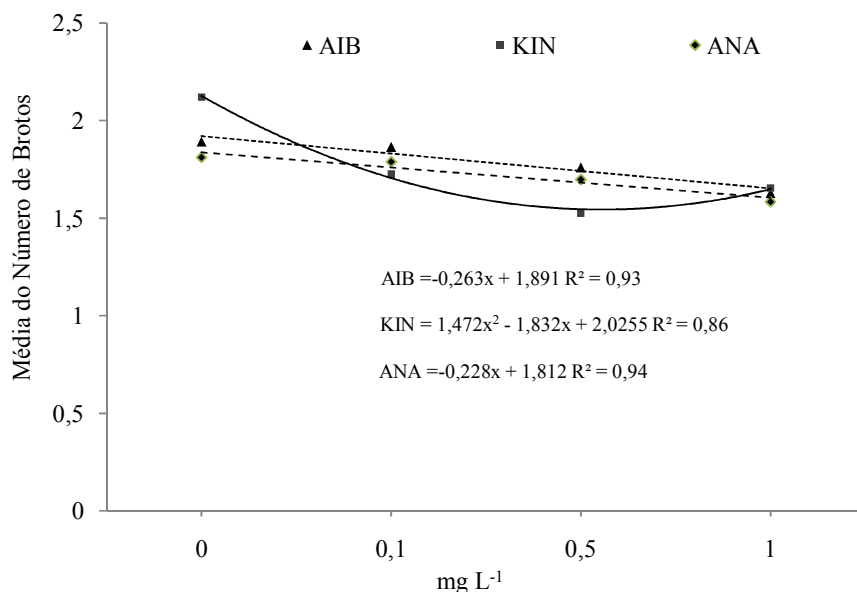


Figura 12: Média do número de brotos/ frasco em relação as concentrações dos reguladores de crescimento (AIB, KIN e ANA) associados a 3,0 mgL⁻¹ BAP + 15,0 mgL⁻¹ QUI.

Já para a citocinina KIN pode-se observar na figura 12 um modelo quadrático que sugere um efeito positivo para a variável número de brotos em concentrações acima de 1 mgL⁻¹. O resultado encontrado está de acordo com, Nicioli et al. (2008) ao observarem em explantes de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) que, à medida que se aumentou a concentração de KIN no meio de cultura, o número de brotos formados a partir do segmento nodal foi favorecido, sendo registrada uma melhor resposta (3,0 brotos/explante) quando se utilizou 5,0 mgL⁻¹ de KIN. Vidal et al. (2006) e Lima et al. (2004), conseguiram o maior número de brotos em explantes, respectivamente, da CNPA 97.668 e CNPA ITA-90 II (*Gossypium hirsutum* L.) nos meios suplementados com 1,5 mgL⁻¹ de KIN associado a mesma concentração de BAP e 3,0 mgL⁻¹ de KIN associado a 1,0 mgL⁻¹ de BAP.

Os melhores resultados para a variável número de brotos (NB) foram alcançados nos meios suplementados apenas com a citocinina BAP em que a maior média de brotação foi de 2,11 (Tabela 4). Os dados obtidos são concordantes com as afirmações de Rodrigues et al. (2012) ao concluírem que o uso de BAP para indução de brotações foi eficiente nas doses entre 3,0 e 5,0 mgL⁻¹ em explantes de palmeira *Astrocaryum aculeatum* Meyer. Cordeiro et al. (2004) conseguiram a maior taxa de brotação (2,14 brotos/ explante) com 3,0 mgL⁻¹ de BAP em explantes de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke); Soares et al. (2011) ao testar três citocininas (BAP, TDZ e KIN) em explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)

observaram as melhores respostas organogênicas (1,98 brotos/ explante) no meio suplementado com 2,0 mgL⁻¹ de BAP. Nessa mesma concentração, Santos et al. (2005) trabalhando com explantes caulinares de *Anana erectifolius* L. B. Smith, verificaram a formação de maior número de brotos (5,83/ explante).

Tabela 4: Valores médios referentes à variável número de brotos por explante (NBt) em resposta à diferentes concentrações de reguladores de crescimento associados a 3,0 mgL⁻¹ BAP + 15,0 mgL⁻¹ QUI.

Variável	R. C.	CONCENTRAÇÕES (mg.L ⁻¹)			
		0	0,1	0,5	1
NBt	AIB	1,92 a	1,86 a	1,70 b	1,66 a
	KIN	2,11 b	1,71 a	1,51 a	1,65 a
	ANA	1,83 a	1,77 a	1,69 ab	1,58 a

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. P < 0,05. Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Estudos realizados com variedades do algodoeiro ressaltam a importância das citocininas na formação de brotos. Carvalho et al. (2006) utilizou a concentração de 3,0 mgL⁻¹ de BAP e 3,0 mgL⁻¹ de KIN e obtiveram uma média de 5,3 brotos/ explantes na cultivar de algodão colorido BRS Verde. Rocha et al. (2008) obtiveram superbrotamento satisfatório para explantes da cultivar BRS-200 ao adicionar BAP isoladamente ao meio MS nas concentrações de 1,0 e 2,0 mgL⁻¹, o mesmo foi verificado para a 6M Mocó e BRS-187-8H, quando utilizou-se 2 mg.L⁻¹ de BAP isolado ou associado a 1,0 mgL⁻¹ de KIN. Em estudo realizado com três cultivares de algodão indiano foi obtida a média de 6-8 brotos/ explantes cultivados em meio contendo 1,5 mgL⁻¹ de BAP e 0,1 mgL⁻¹ de ANA (MUSHKE et al., 2012).

Na tabela 5, pode-se observar resultados similares quanto ao efeito dos reguladores de crescimento em relação à variável tamanho do maior broto (TMB). Em que verifica-se, maior média de 1,71 nos meios isentos dos reguladores de crescimento ANA, AIB ou KIN. Entretanto, na concentração de 0,1 mgL⁻¹ o AIB, demonstra melhores resultados em relação aos demais reguladores de crescimento.

Tabela 5: Valores médios referentes a variável tamanho do maior broto (TMBt) em resposta à diferentes concentrações de reguladores de crescimento associados a 3,0 mgL⁻¹ BAP + 15,0 mgL⁻¹ QUI.

Variáveis	R. C.	CONCENTRAÇÕES (mg.L ⁻¹)			
		0	0,1	0,5	1
TMBt	AIB	0,74 b	0,67 b	0,33 a	0,29 a
	KIN	1,71 c	0,37 a	0,27 a	0,32 a
	ANA	0,40 a	0,34 a	0,26 a	0,20 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. $P < 0,05$.

Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Maiores concentrações de auxinas, no entanto, podem inibir as brotações e favorecer o enraizamento ou formação de calo (SOUZA e JUNGHANS, 2006). Enquanto que, as citocininas usadas no meio de cultura liberam as gemas da dominância apical tanto no ramo original, como nos subsequentes ramos laterais que são formados, originando numerosas brotações (SILVA NETO e ANDRADE, 2011). Estes autores citam ainda, que o BAP tem sido eficaz na multiplicação de diversas espécies, além de ter o menor custo entre todas as citocininas.

Após a indução, os explantes foram subcultivados em meio MS sem regulador de crescimento para promover o alongamento dos brotos (Figura 13A) que, ao atingirem tamanho superior a 1,0 cm foram isolados dos explantes e induzidos ao enraizamento em meio MS suplementado com 0,25 mgL⁻¹ de AIA (Figura 13B), possibilitando assim, o desenvolvimento das plantas e, posteriormente a aclimatização (Figura 13C) e subsequente transferência para casa de vegetação (Figura 13D) para completar seu ciclo de desenvolvimento.

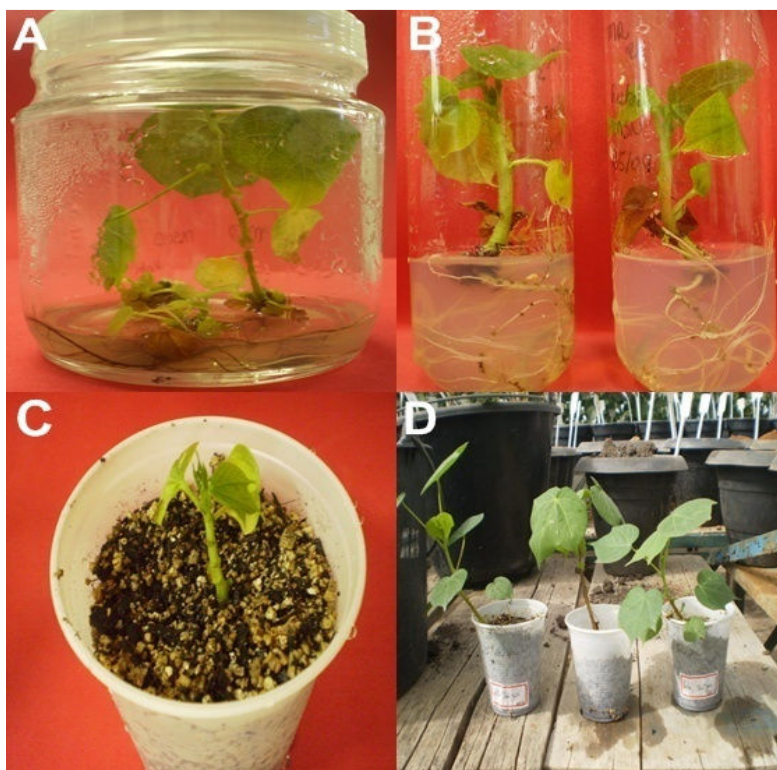


Figura 13. Organogênese *in vitro* da cv. BRS Rubi. (A) Alongamento em meio MS sem fitorreguladores; (B) Enraizamento dos brotos em meio MS com 0,25 mg.L⁻¹ de AIA; (C) Aclimatização em turfa + vermiculita estéreis; (D) Casa de vegetação (Antes da transferência para vasos). Foto: Taiza da Cunha Soares, Campina Grande, 2013.

Estas etapas são extremamente importantes, pois é possível observar o desenvolvimento das plântulas. Além disso, a possibilidade de estudar as plantas regeneradas em casa de vegetação é fundamental, pois assim, observa-se sua adaptação ao ambiente *ex vitro* e ciclo reprodutivo, bem como fenômenos epigenéticos ou variação somaclonal (CID e TEIXEIRA, 2010).

5. CONCLUSÕES

1. A faixa espectral de 1100 a 2500 dos espectros pré processados e a Análise de Componentes Principais (PCA) são capazes de identificar amostras susceptíveis à indução *in vitro*, com base em genótipos conhecidos;
2. Todas as cultivares selecionadas na PCA respondem satisfatoriamente aos meios de indução e proliferação de calos;
3. As cultivares BRS Rubi e Coker 312 formam embriões somáticos com baixa frequência;
4. A cv. BRS Rubi responde melhor a formação de embriões somáticos do que a cv. Coker 312 nos protocolos estudados;
5. A maioria dos embriões somáticos apresentam deformações, propiciando pouca regeneração em plantas, sendo necessário testar outros protocolos de rediferenciação e maturação;
6. O BAP é suficiente para promover a brotação em explantes cotiledonares da BRS Rubi, porém outras concentrações devem ser testadas para incrementar a taxa de brotação;
7. A quitosana não influencia na morfogênese *in vitro* dos genótipos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. M. N. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) na caracterização de farinhas para alimentação pueril**. Lisboa, 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Universidade Técnica de Lisboa.

ALMEIDA, E. P. de.; OLIVEIRA, R. P. de.; DANTAS, J. L. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.51-54, 2001.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, DF, 2002. 16 p. (Documentos, 58).

BARROS, L. M. Embriogênese somática. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.2, n.7, p. 36-39, 1999.

BELTRÃO, N. E. M., VALE, L. S.; MARQUES, L. F.; CARDOSO, G. D.; SILVA, F. V. F.; ARAÚJO, W. P. O cultivo do algodão orgânico no semiárido Brasileiro. **Revista Verde**, Mossoró, RN, v. 5, n. 5, p. 8-13, 2010.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*ficus carica* L.). **Ciênc. Agrotec**, Lavras, Ed especial, p. 1403-1409, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASON, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. ABCTP/ EMBRAPA CNPH, Brasília, 443p, 1990.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel - influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CARVALHO, L. P. O gênero *Gossypium* e suas espécies cultivadas e silvestres. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. (Ed). **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, v. 1, 2 ed, p. 251-270, 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, L. W. **Micropropagação *in vitro* da cultivar de algodão BRS-Verde via organogênese utilizando as citocininas BAP e KIN**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 68).

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

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A. **Propagação *in vitro* de algodão via embriogênese somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 4 p. (Circular Técnica, 128).

CARVALHO, J. M. F. C.; MOREIRA, J. A. N.; VIEIRA, R. M. Cultivo *in vitro* do algodão. In: BELTRÃO, N. E. M. e AZEVEDO, D. M. P. (Ed). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, v. 1, 2 ed, p. 483-508, 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; LIMA, M.M. A.; AIRES, P. S. R.; VIDAL, M. S.; PIMENTEL, N. W. **Embriogênese Somática**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35 p. (Documentos, 152).

CARVALHO, J. M. F. C.; GONZÁLEZ-BENITO, E.; PEREZ, C. Análise Histológica de Calogênese e Embriogênese das Cultivares de Algodão CNPA Precoce 2 e Coker 312. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v.5, n.1, p.p. 235-239, 2001.

CASTRO, L.M. de; MOURA FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J.; MIYATA, L. Y. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1831-1834, 2010

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2010, p.15-49.

CID, L. P. B.; ILLG, R. D.; PIEDRABUENA, A. E. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv “Chonan”) via cell culture in liquid medium. **In vitro Plant**, v. 30, p. 150-155, 1994.

CRUZ, M. S.; MAIA, S. F. Desempenho da cotonicultura brasileira pós-abertura econômica. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 39, n. 2, p. 263-284, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: quarto levantamento da safra de grãos 2012/2013**, Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2013.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004.

COSTA, D. A. da. **Embriogênese somática em algodão (*Gossypium hirsutum* L. cv. BRS – 187 – 8H**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 19-25, 2001.

DANTAS, H. V. **Triagem da qualidade de amostras de GNV e GLP usando espectrometria NIR e quimiometria**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

DAVIDONIS, O. H.; HAMILTON, R. H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. **Plant Science Letters**, v.32, p.89-93, 1983.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, p. 435-451, 2008.

FALEIRO, F. G.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; FARIAS NETO, A. L. de. Melhoramento genético de plantas e biotecnologia. IN: Faleiro, F. G.; Andrade, S. R. M. de; Reis Júnior, F. B. (Editores). **Biotecnologia: Estado da arte e aplicações na agropecuária**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2011, p. 553-566.

FAO. **Food and Agricultural commodities production - production - countries by commodity - cottonseed - 2010- value**. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 24 Jan. 2013.

FERRARI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. Curitiba, 2004. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

FRANKLIN, C. I.; DIXON, R. A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. IN: Dixon, R.A., Gonzalez, R.A. (Ed.). **Plant Cell Culture – A practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1994, p.1-25.

FUZATTO, M.G. Melhoramento genético do algodoeiro. In: CIA, E.; FREIRE, E.C.; SANTOS, W.J. **Cultura do Algodoeiro**. Piracicaba: POTAFOS, 1999, p.15-32.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, n. 50, p. 151-158, 1968.

GHAEMI, M.; MAJD, A.; FALLAHIAN, F.; BEZDI, K. G. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium* Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2915-2922, 2011.

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito de biotecnologia**. Edição da Steinmacher, 2006, p. 1-48.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HAN, G. Y.; WANG, X. F.; ZHANG, G. Y.; MA, Z. Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 432-437, 2009.

HAQ, I. U. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 206-209, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da produção agrícola**, Dezembro, 2012. Disponível em: <
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201212.pdf>
Acesso em: 15 Jan. 2013.

KANCHANAPOOM, K.; PIMOLTHAI, P.; KANCHANAPOOM, K. the effect of chitosan on regeneration of lily (*Lilium longiflorum* Thunb. ‘ester lily’) from bulb scale explants cultured *in vitro*. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 12, n. 2, p. 127-129, 2012.

KANCHANAPOOM, K.; PHONGDARA, A.; KANCHANAPOOM, K. The effect of chitosan on the organogenesis of oil palm embryo-derived callus. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, n. 38, p. 213-217, 2010.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n.1. p. 30-33, 1997.

KOEHNE, A. Pés de algodão em fruto, na cidade de Luiz Eduardo Magalhães, estado da Bahia, Brasil, Setembro, 2001. Disponível em: <
http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Algod%C3%A3o_Bahia_2003.jpg#file> Acesso em: 14 Fev., 2013.

LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, v. 2, p.136-148, 2000.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.

LEMOS, O. F. P. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*)**. Piracicaba, 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LIMA, C. O. C.; MARCHI, M. N. G.; BRITO, A. L.; CARNEIRO, C. E.; BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 249-254, 2012.

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, 26, 2004, Viçosa. **Anais...** Campina Grande: Embrapa - CNPA, 2004. p. 138.

MEDEIROS, M. J. L.; CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; SANTOS, R. C. Embriogênese somática do algodão nas cultivares BRS Rubi e BRS Safira. In: ENCONTRO DE PRODUÇÃO CINÉTICA DA EMBRAPA – EPC, 2007, Campina Grande, PB. Resumos ... Campina Grande: Embrapa algodão, 2007. p. 37.

MONTES, J. M.; MELCHINGER, A. E.; REIF, J. C. Novel throughput phenotyping platforms in plant genetic studies. **Plant Science**, v.12, n.10, 2007.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of *guavatee cv. Paluma*. **Rev. Bras. Frutic**, v. 31, n. 2, 2009.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. Minas Gerais, 2007. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa.

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

MUSHKE, R.; SULTANA, T.; PINDI, P. K. High frequency regeneration and multiple shoot induction in indian cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, p. 1109-1112, 2012.

NGE, K. L.; NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. **Plant Science**, p. 1185–1190, 2006.

NICIOLO, P.M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SANTANA, J. R. F. de.; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C. da.; PORTO, J. M. P. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 685-689, 2008.

NÓBREGA, L. B.; VIEIRA, D. J.; BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. Hormônios e reguladores do crescimento e do desenvolvimento. In: Beltrão, N. E. M. (org.). **O agronegócio do algodão no Brasil**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 1999, p. 587-602.

OLIVEIRA, M. M. **Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal**. Boletim Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações. n. 66, 2000, p. 22-27. < Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/downloads/80714.pdf>> Acesso em: 19 de Jan de 2013.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal Braz. Chem. Soc**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PENNA, J. C. V. Melhoramento do algodão. In BORÉM, A. (Ed). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. UFV, 2005, p. 15-53.

PEREIRA, J. E. S.; GUEDES, R. S. da.; FERMINO JR, P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 4, p. 378-385, 2010.

Q LE, L.; HA, V. T.; NAGASAWA, N.; KUME, T.; YOSHII, F.; NAKANISHI T. M. Biological effect of irradiated chitosan on plants *in vitro*. **Biotechnol Appl Biochem**, p. 49-57, 2005.

RAJESWARI, S.; MUTHURAMU, S.; CHANDIRAKALA, R.; THIRUVENGADAM, V.; RAVEENDRAN, T. S. Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*gossypium hirsutum* L.). **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 4, n. 1, p. 1186-1190, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ROCHA, M. S.; CARVALHO, J. M. F. C.; MATA, M. E. R. M. C.; LOPES, K. P. Indução de superbrotamento e regeneração de plantas *in vitro*, nas cultivares de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 5, p. 503-506, 2008.

SAKHANOKHO, H. F.; OZIAS-AKINS, P.; MAY, O. L.; CHEE, P. W. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in select Georgia and pee Dee cotton lines. **Crop Science Society of America**, p. 2199-2205, 2004.

SANTOS, A. S. de A.; MACHADO, I. S.; LEÃO, A. L.; RAMOS, A. de. A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de Carauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 8, n.35, p.62-65, 2005.

SAS Institute Inc. 2009. **SAS Online Doc®: 9.2**. Cary, NC: SAS, Institute Inc.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified leastsquares procedures. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.

SCAGLIUSI, S. M. **O impacto da cultura de tecidos na agricultura**. 3 p., 2011. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/nco/artigos/O%20impacto%20da%20cultura%20de%20tecidos%20na%20agricultura.pdf>> Acesso em: 14 Jan. 2013.

SIESLER, H. W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, H. M. **Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications**. Wiley-VCH, 2002.

SILVA NETO, S. P. da.; ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JR, F. B. dos (Ed). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, p. 411-434.

SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L.; ARAÚJO, S. S.; FELISMINO, D. C.; CARVALHO, J. M. F. C. Indução de calos embriogênicos nas cultivares BRS Araripe e BRS Seridó do algodoeiro. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 34-39, 2010.

SILVA, M. N. B.; BELTRÃO, N. E de M.; CARDOSO, G. D. Adubação do algodão BRS em sistema orgânico no Seridó Paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.2, p. 222-228, 2005.

STASOLLA, C.; LOUKANINA, N.; ASHIHARA, H.; YEUNG, E. C. e THORPE, T. A. Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. **Journal Tree Physiology**, v. 21, p. 359–367, 2001.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de.; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciênc. agrotec**, Lavras, v. 35, n. 1, 2011.

SOUSA, L. B. O algodoeiro: Alguns aspectos importantes da cultura. **Revista Verde**, v.5, n.4, p. 19-26, 2010.

SOUSA, C. M.; MIRANDA, R. M. Otimização do balanço entre auxina e citocinina para multiplicação *in vitro* de *gerbera jamesonii* var. ‘ornela’. **Agronomia**, v. 40, n. 1-2, p. 66-72, 2006.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introduction to plant micropropagation**, 2006. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 152 p.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 1, p. 61-68, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª 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, BA. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005, p.11.

TEIXEIRA, R. A. **Capacitação em melhoramento genético de plantas no Brasil: situação atual e perspectivas**. Campinas: [s. n.], 2008.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 182p., 2005.

TROLINDER, N. L.; GOODIN, J. R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v.6, p. 231-234, 1987.

TROLINDER, N. L.; XHIXIAN, C. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 133-136, 1989.

VIDAL, M. S.; CARVALHO, J. M. F. C.; SOUSA, E. B. M.; LIMA, L. H. G. M.; SANTOS, J. W. dos. **Técnica de micropropagação *in vitro* do genótipo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)** CNPA 97.668, 2006. Campina Grande: Embrapa algodão. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 65).

VILLARI, A. C. (Ed). **Guia do algodão: Tecnologia no Campo para uma Indústria de Qualidade**. Conselho de informações sobre biotecnologia, 15 p., 2010.

ZHANG, Y. S. X.; LIANG, S. J. S.; NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 247–253, 2003.

ZIMMERMANN, M. J. Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2010. p. 67-101.

WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, n. 57, p. 443-462, 1986.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. **Plant Sciences**, v. 29, n. 1, p. 36-57, 2010.