

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Dezembro, 2008

208

Técnicas de Cultivo *In Vitro* no Sisal



The logo for Embrapa, featuring the word "Embrapa" in a blue, sans-serif font with a green leaf-like shape integrated into the letter 'a'.



ISSN 0103-0205
Dezembro, 2008

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 208

Técnicas de Cultivo *In Vitro* no Sisal

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Daniela Vieira dos Anjos Sena

Campina Grande, PB.
2008

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58.428-095 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3182-4300
Fax: (83) 3182-4367
sac@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva
Secretário: Valter Freire de Castro

Membros: Fábio Aquino de Albuquerque

Giovani Greigh de Brito

João Luiz da Silva Filho

Máira Milani

Maria da Conceição Santana Carvalho

Nair Helena Castro Arriel

Valdinei Sofiatti

Wirton Macedo Coutinho

Supervisor Editorial: Valter Freire de Castro

Revisão de Texto: Maria José da Silva e Luz

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Sérgio Cobel da Silva

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2008) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

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

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Técnicas de cultivo *In Vitro* no sisal, por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Daniela Vieira dos Anjos Sena. Campina Grande, 2008.

21p. (Embrapa Algodão. Documentos, 208)

1. Planta têxtil. 2. Produção vegetal. 3. Cultura de tecido. 4. Banco de germoplasma. 5. Organogênese. 6. Embriogênese somática. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Sena, D.V. dos A. III. Título. IV. Série.

CDD: 633.57

© Embrapa 2008

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Ph.D. Eng. Agrôn. da Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz 1143, Centenário
CEP 58.428-095 Campina Grande, PB.
E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

Daniela Vieira dos Anjos Sena

B.Sc. em Ciências Biológicas, estagiária da Embrapa Algodão
E-mail: danielasenas@hotmail.com

Apresentação

Nos últimos anos, tem-se constatado, um declínio da cultura do sisal, expresso em reduções da área cultivada e produtividade. Vários fatores têm contribuído para esta decadência, dentre eles os quais o baixo índice de aproveitamento da planta de sisal; a concorrência com fibras sintéticas; o elevado custo inicial para a produção da monocultura sisaleira; a falta de variedades adaptadas às regiões produtoras; o não aproveitamento dos resíduos do desfibramento; doenças e o manejo deficitário da fertilidade dos solos. No entanto, é necessário o desenvolvimento de novos sistemas de produção, para elevar a sustentabilidade da atividade sisaleira.

A propagação convencional do sisal é principalmente por bulbilhos produzidos na inflorescência, o que se converte em um problema por ser lento o processo de floração desta espécie que ocorre depois de 8 a 9 anos de cultivo em solo e raramente produz sementes férteis. Em vista da importância econômica desta planta e da lenta propagação convencional da mesma, é necessária investigação para realizar propagação rápida e maciça, ampliando a técnica de cultivo de tecidos *in vitro*.

Espera-se com esta publicação, difundir um método rápido de propagação do sisal, importante ferramenta de apoio ao melhoramento genético vegetal e fitopatologia.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

| | |
|---|----|
| Técnicas de Cultivo <i>In Vitro</i> no Sisal | 11 |
| 1. Introdução..... | 11 |
| 2. Cultura de Tecidos..... | 12 |
| 3. Técnicas de cultivo <i>in vitro</i> de Sisal... .. | 13 |
| 3.1 Banco de Germoplasma..... | 13 |
| 3.2. Organogênese | 14 |
| 3.3 Embriogênese Somática | 16 |
| 4. Conclusão..... | 17 |
| 5. Referências Bibliográficas | 18 |

Técnicas de Cultivo *In Vitro* no Sisal

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Daniela Vieira dos Anjos Sena

1. Introdução

O Sisal (*Agave sisalana* Perrine) é perfeitamente adaptado para sobreviver em condições semidesérticas. É originário da América Central, onde se encontra a maior diversidade de espécies na zona de transição árida e semi-árida do México Central. De lá foi levado para outras partes do mundo, passando a ser comercialmente cultivado (MEDINA, 1954). Atualmente, esta cultura está expandida em muitos países, como: Colômbia, Bolívia, Espanha, Brasil, Equador, Itália, Peru, Panamá e Venezuela. Várias espécies são de interesse econômico por seu valor ornamental e por ser fonte de produtos de interesse (DEVESA, 1997).

O Sisal é a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo, com grande relevância na indústria farmacêutica, automobilística e na construção civil. Contudo, existem outros produtos em que o sisal pode ser utilizado, tais como: tecidos, carpetes, revestimento para paredes e geotêxteis, polpa e mucilagem para papel, alimentação animal, fios de qualidade e alvos para dardos (SILVA et al., 1999).

No Brasil, o sisal foi introduzido em 1903, no estado da Bahia, sendo posteriormente difundido para os demais estados. Atualmente, o Brasil é o maior exportador de sisal do mundo, com uma produção anual de 119 mil toneladas, respondendo por 56% da safra mundial que é de aproximadamente 204 mil/t, sendo a Bahia, responsável por cerca de 90% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2006).

Devido a facilidade de aclimação, essa Agavaceae ajustou-se perfeitamente à região semi-árida do Nordeste do Brasil. O seu cultivo ocupa uma extensa área de solos pobres na região semi-árida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte e em regiões com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas. A fibra do sisal, beneficiada ou industrializada, rende cerca de 80 milhões de dólares em divisas internas por ano, além de gerar mais de meio milhão de empregos diretos e indiretos por meio de sua cadeia produtiva, sendo o cultivo dessa Agavaceae um dos principais agentes de fixação do homem à região semi-árida nordestina. (SUINAGA et al., 2006).

Apesar da sua relevância, tem-se constatado nos últimos anos, um declínio desta cultura, expresso em reduções da área cultivada, e produtividade. Vários fatores têm contribuído para esta decadência, dentre eles o baixo índice de aproveitamento da planta de sisal; a concorrência com fibras sintéticas; o elevado custo inicial para a produção da monocultura sisaleira; a falta de variedades adaptadas às regiões produtoras; o não aproveitamento dos resíduos do desfibramento; a ocorrência de doenças e o manejo deficitário da fertilidade dos solos. No entanto, é necessário o desenvolvimento de novos sistemas de produção, para elevar a sustentabilidade da atividade sisaleira.

A propagação convencional desta planta é principalmente por bulbilhos produzidos na inflorescência, o que se converte em um problema devido a lentidão do processo de floração que ocorre depois de 8 a 9 anos de cultivo em solo e raramente produz sementes férteis. Em vista da importância econômica desta planta e da lenta propagação convencional da mesma, é necessária investigação para realizar propagação rápida e maciça, ampliando a técnica de cultivo de tecidos *in vitro*.

2. Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como um conjunto de técnicas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado. Apresenta várias aplicações práticas utilizadas amplamente na agricultura, dentre elas destacam-se: a clonagem de vegetais, o melhoramento genético de plantas e a produção de mudas saudáveis (WILLADINO; CÂMARA, 2008).

Esta prática permite a obtenção de um grande número de plantas em espaço

físico e temporal pequenos, cujos indivíduos são geneticamente idênticos à planta doadora dos explantes (SANTOS, 2003). É, portanto, uma forma rápida de multiplicar uma determinada planta, ou genótipo, que apresente características agronômicas desejáveis.

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

Para propagação in vitro de agaváceas, tem-se aplicado diferentes técnicas; utilizando segmentos caulinares e foliares, bulbilhos, sementes, calos, meristemas, gemas e, embriões zigóticos. A maioria destas técnicas enfoca a multiplicação massiva através de brotos adventícios e axilares e a produção de embriões somáticos. Tem-se reportado; organogênese direta e indireta para diversas espécies; proliferação de brotos diretamente do explante original; proliferação de brotos adventícios a partir de calos e embriogênese somática.

3. Técnicas de cultivo in vitro de Sisal

3.1 Banco de Germoplasma

Germoplasma pode ser definido como o conjunto de genótipos de uma espécie, considerada como um todo, sendo assim, a fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento de plantas. O principal objetivo é desenvolver técnicas ao longo prazo para conservação do germoplasma de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica possível (BAJAJ, 1995).

Segundo Vieira (2000) as coleções de germoplasma têm sido mantidas em instituições diversas, com a finalidade de: garantir sua diversidade; multiplicá-la; distribuí-la aos usuários e promover a sua caracterização por diferentes metodologias.

Carvalho et al., (2002) com intuito de definir um protocolo eficaz de germinação *in vitro* de sementes do banco de Germoplasma de sisal da Embrapa Algodão,

avaliou cinco acessos oriundos da Inglaterra no ano 2000, BAG de Kew Garden e um acesso do Banco de germoplasma da Embrapa Algodão: *Agave parryivar* (Huachucensis (93778); *Agave palmeri* Engelm (93192); *Agave neomexicana* (93398); *Agave lecheguilla* Torrey (93239); *Agave neomexicana* (93387) e *Agave sisalana* (Embrapa- Algodão). De acordo com os resultados obtidos, os acessos do banco de germoplasma de sisal podem ser regenerados in vitro com facilidade. Utilizando-se meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), observou-se um período de seis dias para germinação in vitro das sementes e a embebição em água por 24 horas para induzir a germinação in vitro.

3.2. Organogênese

A organogênese é definida como a multiplicação mediante indução de gemas adventícias, podendo ser da forma direta ou indireta. A primeira refere-se ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta in vitro, mas que em geral não se expressam. A segunda, ocorre quando o processo de regeneração de gemas é procedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Segundo Phillips (2004) e Pasqual (2001) as etapas iniciais do processo de desenvolvimento da organogênese, em nível molecular, ainda são pouco conhecidas, daí a importância de se conhecer quais são os componentes e as propriedades dos meios de cultura.

A obtenção de organogênese in vitro é atualmente um processo empírico onde são testadas para cada espécie, ou mesmo para cada variedade de uma espécie, as seguintes condições: fonte de explante; composição mineral do meio de cultura; balanço hormonal e condições ambientais (PERES, 2002).

A organogênese geralmente se dá pela otimização da relação citocinina/auxina no meio de cultura e ocorre pela diferenciação de órgãos e brotos diretamente do explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta) podendo originar-se de uma única célula ou de um conjunto de células. Caracteriza-se por ser uma estrutura monopolar e apresentar ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante (ANDRADE, 2006).

O balanço entre os dois reguladores (citocinina e auxina) é usualmente requerido para iniciar o crescimento ou diferenciação em cultura de tecidos. Porém,

algumas vezes, o nível de auxina presente no tecido pode ser suficiente para estabelecer o balanço auxina/citocinina e desencadear o processo organogênico (VILLALOBOS-AMADOR et al., 2002).

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

Carvalho et al. (2006) induziram in vitro, o superbrotamento em gemas do gênero Agave. Os acessos utilizados do Banco de Germoplasma da Embrapa Algodão foram: Agave palmeri Engelm (93192), Agave neomexicana Wootton e Standley (93398) e Agave lecheguilla Torrey (93239). Os bulbos foram inoculados em meio básico MS suplementado com combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA): 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA + 10% de água de coco; 2 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA + 10% de água de coco e 5 mg/L BAP + 0,1 mg/L ANA + 10% de água de coco. Dos resultados obtidos observou-se que, combinando-se as concentrações de BAP (1 mg/L) com 0,1 mg/L de ANA e 10% de água de coco obteve-se maior proliferação de brotos de sisal, em *A. lechuguilla*; entretanto para *A. palmieri*, recomendando-se BAP a 2 mg/L.

Carvalho et al. (2007) procurando definir um protocolo mais eficiente e econômico de multiplicação de sisal in vitro, utilizou como fonte de explantes bulbilhos do gênero Agave, espécie *A. sisalana* desenvolvidos na Embrapa Algodão. Utilizou-se meio MS suplementado com uma combinação dos reguladores de crescimento BAP e ANA: (0,5 mg/L de BAP + 0,25 mg/L de ANA e 10% de água de coco) e um controle apenas com água de coco. Após oito semanas os bulbos foram inoculados em frascos contendo 25 mL de meio MS básico sem reguladores de crescimento e meio MS suplementado com 1,5 mg/L de BAP, designado de MSBap. Verificou-se que para multiplicação do sisal in vitro a citocinina BAP se mostrou bastante eficiente na concentração utilizada.

Hazra et al. (2002), utilizaram, folhas imaturas cultivadas in vitro, folhas maduras cultivadas ex vitro, e rizoma como explantes para a indução de calos, sendo estes cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D (2,0 mg/L) e cinetina (1,0 mg/L) ou 2,4-D (2,0 mg/L), cinetina (1,0 mg/L) e CH (1000 mg/L) ou mod. MS (NH₄NO₃, 1500 mg/L) contendo 2,4-D (2,0 mg/L) e cinetina (1,0 mg/L). A regeneração de calo a partir do meio suplementado com CH, foi

alcançado com rizomas imaturos e tecido de folhas. A mais alta taxa de regeneração foi obtida com meios suplementados apenas com BAP (6,0 mg/L). A propagação de brotos foi obtida utilizando-se meio MS contendo BAP (0,5 mg/L) e GA3(0,5 mg/L) e, finalmente, enraizadas em meio MS contendo IAA (2,0 mg/L). As plântulas enraizadas foram aclimatadas de forma satisfatória no ambiente *ex vitro*.

Nikam (1997) obteve calos em sisal utilizando-se como explante rizoma e caule, em MS, Schenk e Hildebrandt e meio Gamborg e White's suplementado com diferentes concentrações de BAP, cinetina, ANA, IAA e 2,4-D, isolado ou em combinação. Altos índices de brotos foram obtidos a partir de caule e rizoma. 100% das plantas enraizadas adaptaram-se com sucesso às condições *ex vitro*.

3.3 Embriogênese Somática

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se em estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma seqüência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão de gametas (GUERRA et al., 1999; JIMÉNEZ et al., 2001).

Segundo Sharp et al. (1980), embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos de matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos; e indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos, que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma seqüência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1999).

Segundo Vieira e Kobayashi (2000), uma característica diferencial entre estes dois padrões de desenvolvimento embriogênico é a resposta à ação de reguladores de crescimento. Enquanto a embriogênese direta caracteriza-se pelo cultivo dos explantes em um único meio de cultura com a adição de apenas uma citocinina, a indireta requer alta relação auxina/citocinina para a formação de calos não diferenciados em um meio de cultura inicial e baixa relação para a indução de calos embriogênicos durante culturas subseqüentes.

De acordo com Ferreira et al. (2005), através da embriogênese somática pode-se

regenerar plantas-elite *in vitro*, em larga escala, sendo também uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião. Atualmente esse sistema vem sendo utilizado para a obtenção de plantas transgênicas (PARAKASH; VARADARAJAN, 1992; GAMA, 1993) e sementes sintéticas (SCHULTHEIS et al., 1990).

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico, em que as metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento e outras condições de cultura, como a densidade das células, nutrientes e iluminação (TITON et al., 2007).

Nikam et al. (2003) obtiveram culturas de calos embriogênicos em sisal a partir de brotos jovens *in vitro*, em meio suplementado com 1-2 mg/L cinetina (KIN) e 0,2-0,5 mg/L α -naftalenoacético, 1,5 mg/L benzilaminopurina (BAP) ou 0,25-0,5mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético acrescido de BAP ou 0,5-1,0 mg/L KIN. Plântulas regeneradas a partir de embriões foram transferidas para o campo onde a taxa de sobrevivência observada foi de 100%.

4. Conclusão

Embora trabalhos de multiplicação de sisal *in vitro* terem sido reportados, há uma necessidade de ampliação das técnicas de cultivo de tecidos, considerando que várias espécies deste gênero têm respondido eficazmente aos diferentes reguladores de crescimento.

5. Referências Bibliográficas

ANDRADE, W. F. D. E. **Efeito de "pulse" na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ Y. P. S., (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**, Berlin, v. 32, p. 3-28, 1995.

CARVALHO, J. M. F. C.; CARTAXO, G.; COSTA, J. N. da.; SANTOS, J. W. dos. **Definição de protocolo de germinação *In vitro* do germoplasma de Sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2002. 4 p. (Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 169).

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S; CARTAXO, G.; COSTA, J. N. da.; SANTOS, J. W. dos. **Multiplicação *in vitro* de Sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 3 p. (Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 280).

CARVALHO, J. M. F. C.; PINHEIRO, M. P. N.; SILVA, D. M. de S. **Otimização da multiplicação de bulbo de sisal *In vitro***. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007.3 p. (Embrapa Algodão, Circular Técnica, 107).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: < www.gov.br >. Acesso em: 16 maio 2008.

DEVESA, J. Plantas con semillas, família Agavaceae. In: IZCO, J., E. BARRENO, M.; COSTA, Y. J. (Ed.). **Botánica Interamericana**. Madri: McGraw-Hill, 1997. 781 p.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 27, n .3, p. 500-503, 2005.

GAMA, M. I. C. S. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) por transformação de calos embriogênicos através de**

Agrobacterium tumefaciens. 1993. 130 p. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

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- CNPH, v. 1 p. 183-260,1998.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1999. v. 2. p. 533-568.

HAZRA, S. K.; DAS, S.; DAS, A. K. Sisal plant regeneration via organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 70, n. 3, p. 235-240, Sept. 2002.

JIMÉNEZ , V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223, 2001.

MEDINA, J. C. **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1954. 286 p.

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

NIKAM, T. D. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 51, n. 3, p. 225-228.

NIKAM, T. D.; BANSUDE, G. M.; ANEESH KUMAR, K. C. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). **Cell biology and morphogenesis**, v. 22, p.188-194, 2003.

PARAKASH, C. S.; VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweet potato. In: HILL, W. A.; BONSI,C. K.; LORETAN, P. A. (Ed.). **Sweet potato technology gor the 21th century**. 1992. p. 27- 37.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA, 2001. 92 p.

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

PHILLIPS, G. C. *In vitro* morphogenesis in plants- recent advances. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, Gaithersburg**, v. 40, p. 342-0345, 2004.

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B. ; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.415-426.

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: Imprensa Nacional, 1990, 433 p.

SHARP, W. R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, New York, v. 2, p. 268-310, 1980.

SILVA, O. R. R. F. da; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa -SPI; Campina Grande: Embrapa- CNPA, 1999. p. 205 p.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F. da; COUTINHO, W. M; COSTA, L. B. da; CARTAXO, W. V. **Cultivo de sisal na região semi- árida do nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão, Sistemas de Produção, 05).

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKES, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31. n. 003, p. 417-426, maio/jun. 2007.

VIEIRA, L. G. E.; KOBAYASHI, A. K. Micropropagação do cafeeiro. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de

Caldas. **Palestras...** Poços de Caldas: [s.n.], 2000. p. 147-167.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Tecnologia**, n.14, p. 18-20, 2000.

VILLALOBOS-AMADOR, E.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDES, G.; PEREZ-MOLPHE-BALCH, E. Organogenesis and Agrobacterium rhizogenes-induced rooting in *Pinus maximartinezii* and *Pinus piniceana* Gordon. **Plant Cell Reports, Victoria**, v. 20, p. 779-785, 2002.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/química/culttec.htm>>. Acesso em: 10 jun.2008.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

