



Indução de superbrotamento e regeneração de plantas *in vitro*, nas cultivares de algodão colorido¹

Maria do S. Rocha², Julita M. F. C. Carvalho³, Mário E. R. M. Cavalcanti Mata⁴, Kilson P. Lopes⁴

RESUMO

A micropropagação *in vitro* tem-se apresentado como técnica que possibilita várias metodologias que, por sua vez, contribuem com a redução no tempo, para a obtenção de novas cultivares. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o comportamento dos genótipos BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187 8H Branco na indução do superbrotamento em diferentes combinações de reguladores de crescimento. As sementes, para obtenção do material de partida, foram desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por 20 min. Os brotos foram induzidos, a partir de explante de nós cotiledonares em meio básico MS, suplementado com 6-benzylaminopurine (BAP), Cinetina (KIN) e Tiadiazuron (TDZ), isolados ou associados em diferentes concentrações. O material foi mantido por 40 dias em sala de crescimento, sob condições ambientais controladas. Utilizou-se 10 tubos de ensaio por tratamento com um explante por frasco, em um delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de 4 x 17 (quatro genótipos x dezessete meios). Observou-se que o meio MS suplementado com BAP (2,0 mg L⁻¹) isolado ou associado com KIN (1,0 mg L⁻¹), promoveu maior capacidade de regeneração e altura de brotos; o meio MS suplementado com BAP (2,5 mg L⁻¹) estimulou maior altura de brotos e o meio MS suplementado com TDZ (1,0, 0,50 e 0,25 mg L⁻¹) afetou a capacidade de regeneração de brotos, observando-se maior formação de calos.

Palavras-chave: sementes, cultura de tecidos, múltiplos brotos

Induction of multiple shoots and regeneration of plants *in vitro*, in coloured cotton cultivars

ABSTRACT

The micropropagation *in vitro* has been presented as a technique that allows various methodologies which, for in turn, contribute to a reduction in the time to obtain new cultivars. The objective of this work was to evaluate the behavior of the genotypes BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-white and BRS-187-8H- white, in the induction of the multiple shoots in different combinations of growth regulators. The seeds, to obtain the initial material, were placed in a solution of 1% sodium hypochlorite of active chlorine for 20 min. The shoot had been induced, in the explant of cotyledonary nodes in MS medium basic, supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP), Cinetina (KIN) and Tiadiazuron (TDZ), isolated or associated in different concentrations. The material was kept for 40 days in growth chamber, under controlled ambient conditions. 10 mL of medium was used for treatment with a explant for culture tube, in an entirely randomized design, with factorial arrangement of 4 x 17 (four genotypes x seventeen medium). It was observed that the MS medium supplemented with BAP (2.0 mg L⁻¹) isolated or associated with KIN (1.0 mg L⁻¹), promoted greater capacity of regeneration and height of sprouts; MS medium supplemented with BAP (2.5 mg L⁻¹) stimulated greater height of sprouts and the MS medium supplemented with TDZ (1.0, 0.50 and 0.25 mg L⁻¹) affected the capacity of regeneration of sprouts, a larger formation of calluses was observed.

Key words: seeds, tissue culture, multiple shoots

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada a UFCG, Campina Grande, PB

² Bióloga, M.Sc., Rua Olegário Maciel 943, Monte Santo. CEP 58102-000, Campina Grande, PB, Fone: (83) 3322-5432. E-mail: marialirium@uol.com.br

³ Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

⁴ UAEA/UFCG, Av. Aprígio Veloso 882, Bodocongó, CEP 58109-970, Campina Grande, PB E-mail: mmata@deag.ufcg.edu.br, E-mail: kilson@ccta.ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

No semi-árido nordestino, o algodoeiro é considerado uma das plantas mais cultivadas pelo homem, tendo em vista sua fibra. Como subprodutos de sua lavoura são aproveitados o óleo, a farinha da torta, a lente e a casca, todos extraídos da semente ou caroço. Esta oleaginosa tem sido explorada, tradicionalmente por pequenos e médios produtores, constituindo-se em uma grande e importante alternativa agrícola para a economia da região, como ótima geradora de emprego e de matéria-prima indispensáveis ao desenvolvimento da região e do país (Silva et al., 2000).

A cultura de tecido consiste, na realidade, no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico, com grande vantagem de se trabalhar apenas com células de plantas desejáveis. Esses explantes, ao serem colocados em tubos de ensaios, se multiplicam com rapidez, formando plantas semelhantes à plantas matriz, ou com modificações em uma ou mais de suas características como, maior produtividade maior tolerância à seca, maior resistência às pragas e doenças e a deficiência mineral do solo (Pescador et al., 2000).

Na realidade, a cultura de tecido consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico, com a grande vantagem de se trabalhar apenas com células de plantas desejáveis. Ao serem colocados em tubos de ensaio, esses explantes se multiplicam com rapidez, formando milhões de plantas, todas iguais à planta-mãe, ou com modificações em uma ou mais de suas características, como maior produtividade, maior tolerância à seca, maior resistência às pragas e doenças e à deficiência mineral do solo (Pescador et al., 2000).

A micropropagação in vitro oferece condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em menor espaço de tempo que o melhoramento convencional. Em estudos com o superbrotamento do algodão in vitro, Carvalho et al. (2000) obtiveram bom resultado ao utilizarem o bioregulador BAP (6-benzilaminopurina), isolado ou combinado com KIN (Cinetina).

Com este trabalho, objetivou-se induzir o superbrotamento das cultivares de algodão BRS-Verde, BRS-200 Marrom, 6M-Mocó Branco e BRS-187-8H Branco, observando-a regeneração de explantes a partir de dezessete tipos de meios, determinando o melhor meio nutritivo, suplementados com fitorreguladores em concentrações e combinações diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Cultivo de Tecidos, do Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, em Campina Grande, PB, sementes dos genótipos BRS-Verde, BRS-200-Marrom, 6M-Mocó-Branco e BRS-187-8H Branco foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por 20 min. Após os procedimentos de desinfestação, as sementes foram cultivadas in vitro em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). As culturas permaneceram no escuro por 72 h até a formação das plântulas matrizes.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os nós cotilédones foram separados e excisados das plântulas matrizes com 25 dias de cultivo. Em seguida, os explantes foram inoculados em meio básico MS suplementados com as combinações e dosagens dos reguladores de crescimento, 6-benzilaminopurine (BAP), 6 - Furfurilaminopurina (Cinetina) e Thidiazuron-, N-fenil - N'-1,2,3- tiadiazol-5,1 - uréia (TDZ), em diferentes combinações e dosagens, T₀= MS, T₁= MS + 0,50 mg L⁻¹ BAP, T₂= MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP, T₃= MS + 2,0 mg L⁻¹ BAP, T₄= MS + 2,5 mg L⁻¹ BAP, T₅= MS + 3,0 mg L⁻¹ BAP, T₆= MS + 2,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ KIN, T₇= MS + 2,0 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ KIN, T₈= MS + 2,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ KIN, T₉= MS + 2,5 mg L⁻¹ BAP + 2,5 mg L⁻¹ KIN, T₁₀= MS + 3,0 mg L⁻¹ BAP + 3,0 mg L⁻¹ KIN, T₁₁= MS + 1,0 mg L⁻¹ TDZ + 1,0 mg L⁻¹ KIN, T₁₂= MS + 2,0 mg L⁻¹ TDZ + 2,5 mg L⁻¹ KIN, T₁₃= MS + 0,25 mg L⁻¹ TDZ, T₁₄= MS + 0,50 mg L⁻¹ TDZ, T₁₅= MS + 1,0 mg L⁻¹ TDZ e T₁₆= MS + 0,25 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ KIN.

Todos os meios utilizados foram suplementados com 3% de sacarose e 0,55% de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Em todos os casos, a incubação foi mantida a 25 ± 1 °C, irradiância de 35 mmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W e fotoperíodo de 16 h. Os subcultivos foram realizados a cada 15 dias.

Após 40 dias, os explantes foram avaliados quanto à emissão e comprimento de brotos. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 17 (4 cultivares x 17 meios), com dez repetições por tratamento. Para a análise de variância, os dados foram transformados para $\sqrt{x+1}$, através do SAEG (1993), versão 5.0 e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Encontra-se, na Tabela 1 o resumo da análise de variância, no qual observou-se efeitos significativos em todas as fontes de variação estudadas, inclusive sua interação para a variável número de broto; enquanto para altura de brotos, nota-se efeito significativo apenas para a fonte de variação meios de cultivo.

Tabela 1. Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) do número de brotos (NB) e comprimento de brotos (CB) de explantes de algodoeiro de pluma colorida e tradicional, cultivados em meio de MS com diferentes concentrações hormonais

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		NB	CB
Cultivares (C)	3	0,22 ^{ns}	0,011 ^{ns}
Meios de cultivo (M)	16	10,28 ^{**}	13,75 ^{**}
(C X M)	48	0,046 ^{**}	0,025 ^{ns}
Resíduo	612	0,032	0,016
CV (%)		10,23	11,35

^{ns} Não significativo

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

De acordo com a Tabela 2, conclui-se que os melhores resultados ocorreram na maioria das cultivares estudadas, quando o explante utilizado foi cultivado em meio MS suplementado com BAP, isolado ou associado a KIN(0+1). Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho et al. (2000) com a cultivar CNPA 7H, usando combinação de duas citocininas, (BAP e KIN).

Quando se adicionou BAP isoladamente ao meio MS, nas concentrações 1 e 2 mg L⁻¹, obteve-se superbrotamento satisfatório para explantes da cultivar BRS-200. O mesmo foi verificado-se para a 6M Mocó, quando utilizando-se a concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP, superando os demais meios, aos quais aquela citocinina foi adicionada isoladamente; no entanto, o meio MS suplementado com 2 mg L⁻¹ de BAP associado a 1 mg L⁻¹ de KIN (T₆) garantiu maior número de brotações por explante em todas as cultivares estudadas, não diferindo estatisticamente da cultivar BRS-Verde, onde os explantes foram cultivados no meio em que o BAP foi adicionado isoladamente na concentração de 1 mg L⁻¹ (T₂). Da mesma forma, nas cultivares BRS-200 e BRS-187-8H, o número de brotações por explante obtido no tratamento (T₆) não diferiu daqueles obtidos nos meios em que o BAP foi adicionado isoladamente, nas concentrações de 1 mg L⁻¹ (T₂) e 2 mg L⁻¹ (T₃), nem no meio MS suplementado com 2,5 mg L⁻¹ de BAP associado a 2,5 mg L⁻¹ de KIN (T₉) (Tabela 2), enquanto para a cultivar 6M Mocó o número de brotação obtido no tratamento T₆, não diferiu dos encontrados nos tratamentos T₃, T₉ e T₈. Em outros estudos, a indução de superbrotamento foi também obtida em *Vanilla walkeriae* por ocasião da combinação de BAP e Kinetina na presença de caseína hidrolisada (Grattapaglia et al., 1998). O efeito diferencial entre várias concentrações de BAP na indução de múltiplos brotos com origem no nó cotiledonar, também tem sido reportado em *Glycine* spp. (Leontiev-Orlov, 2000).

As taxas de multiplicação observadas podem ser consideradas adequadas para a micropropagação dessas cultivares.

Os resultados verificados para o número de brotos por explante estão dentro dos valores citados na literatura para diferentes espécies (Nair et al., 1984; Pérez-Tornero & Borgos, 2000). Na multiplicação *in vitro* de pessegueiro, (Chappel & Mauney (1967), observaram variação de 1,3 a 9,9 brotos por explante. Com relação ao efeito da citocinina (BAP) na proliferação de brotos Pérez-Tornero & Borgos (2000) mostraram que a taxa de multiplicação *in vitro* foi superior para o porta-enxerto de *Prunus capdeboseq*, nas concentrações de 1,0 - 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

Os meios em que se empregou a TDZ, isolada ou associada a KIN, não promoveram superbrotamento satisfatório em nenhuma das cultivares estudadas, apresentando número de brotos semelhante ou inferior ao obtido pela testemunha (T₀); comportamento idêntico a este também foi verificado em explantes cultivados em meio MS suplementado com BAP isolado na concentração de 0,5 mg L⁻¹ (T₁) e no meio suplementado com 3,0 mg L⁻¹ de BAP, associado a 3,0 mg L⁻¹ de KIN (T₁₀).

Com relação às cultivares, observaram-se diferenças significativas entre elas, quando seus explantes foram cultivados nos meios em que se obteve superbrotamento satisfatório, com destaque para as cultivares BRS Verde, BRS-200 e BRS-187 8H Branco, que superaram a 6M Mocó nos meios T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈ e T₉. No meio T₅ se destacaram as cultivares BRS-Verde e BRS-187 8H Branco. A cultivar 6M Mocó, independente do meio utilizado, apresentou os menores valores de superbrotamento dos seus explantes, demonstrando responder menos à adição de reguladores vegetais ao meio de cultivo; fato semelhante ocorreu com Keulenans & Dewitte (1994), quando, trabalhando com macieira cv. Gloster obtiveram média de 1,8 e 2,3 brotações por explante, em ápices cotiledonares e cotilédones feridos, respectivamente; já Coboni et al. (2000), obtiveram média de 2,8 brotações por explante no porta-enxerto de macieira Jork-9, utilizando ápices de brotações ou gemas axilares, aos 60 dias após o início do experimento. Ao utilizarem os

Tabela 2. Valores médios de números de brotos (NB) e de comprimentos de brotos (CB) originadas de explantes das quatro cultivares de algodoeiro, cultivados em meio MS com diferentes concentrações de fitohormônios

T	BRS-VERDE		BRS-200		6M-MOCÓ		BRS-187-8H	
	NB	CB	NB	CB	NB	CB	NB	CB
T ₀	1,76 eA	1,77 cA	1,88 dA	1,92 bcA	1,73 eA	1,93 bA	1,73 dA	1,78 cA
T ₁	1,14 eA	1,00 dA	1,08 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 cA	1,00 eA	1,00 dA
T ₂	2,49 abA	1,92 bcA	2,57 aA	1,92bcA	1,02 fB	1,92 bA	2,57 abAB	1,92 bcA
T ₃	2,42 bcA	1,00 dA	2,61 aA	1,00 dA	2,06 aC	1,00 cA	2,56 abAB	1,00 dA
T ₄	2,41 bcdA	2,21 aA	2,29 bA	2,13abA	1,90 bcdB	2,04 abA	2,33 cA	2,04 abA
T ₅	2,32 cdA	1,00 dA	2,12 cB	1,00 dA	1,84 cdeC	1,00 cA	2,43 bcA	2,21 aA
T ₆	2,64 aA	2,21 aA	2,61 aA	2,21aA	2,11 aB	2,21 aA	2,66 aA	1,81 bcA
T ₇	2,28 dA	1,81 bcA	2,37 bA	1,81 cA	1,85 cdeB	1,82 bcA	2,32 cA	2,21 aA
T ₈	2,30 dA	1,00 dA	2,36 bA	1,00 dA	1,98 abcB	1,00 dA	2,36 cA	1,00 dA
T ₉	2,46 bcdA	1,00 dB	2,52 aA	2,11 cA	2,04 abB	2,01 abAB	2,55 abA	1,00 dB
T ₁₀	1,00 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,01 eA	1,00 eA	1,00 dA
T ₁₁	1,00 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 eA	1,00 eA	1,00 dA
T ₁₂	1,05 fA	1,00 dA	1,07 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 eA	1,00 eA	1,00 dA
T ₁₃	1,62 eBC	1,00 dA	1,59 eC	1,00 dA	1,77 deAB	1,00 eA	1,82 dA	1,00 dA
T ₁₄	1,12 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 eA	1,00 eA	11,00 dA
T ₁₅	1,14 fA	1,00 dA	1,10 fA	1,00 dA	1,07 fA	1,00 eA	1,00 eA	11,00 dA
T ₁₆	1,12 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 dA	1,00 fA	1,00 eA	1,00 eA	1,00 cA

Dados transformados $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas, pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, em cada variável estudada

Não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

hormônios BAP e KIN para a micropropagação da babosa, Araújo et al. (2003) obtiveram, por explante (meristema apical), 2,5 brotações por explantes sendo considerados um excelente brotamento; enquanto que Nicoloso et al. (2003) utilizando apenas o BAP para a micropropagação da grábia (*Apuleia leiocarpa* L.), obtiveram grande índice de brotos, com média de 2,6 brotações.

Para a variável comprimento dos brotos, constatou-se (Tabela 2) que o meio MS suplementado com 2,5 mg L⁻¹ de BAP (T₄) e com 2,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ KIN (T₆), garantiu maior comprimento dos brotos, na maioria das cultivares empregadas. Para a cultivar BRS 187-8H, além dos meios já citados, aqueles suplementados com 3,0 mg L⁻¹ de BAP (T₅) e com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, associados a 2,0 mg L⁻¹ de KIN (T₇) também induziram maior comprimento de brotos.

Explantes cultivados em meios suplementados com BAP em concentração inferior a 1,0 mg L⁻¹ e superior a 3,0 mg L⁻¹ e com TDZ isolado ou associado a KIN, também apresentaram os menores valores de comprimento de brotos em todas as cultivares estudadas verificando-se, nesses casos, grande ocorrência de calos. É provável que a ausência do efeito de TDZ sobre o número de brotos tenha sido devido uma relação inversa entre número de brotos produzidos e dosagens de TDZ. Han et al. (1997) verificaram que o TDZ, em concentração acima de 0,01 mg L⁻¹, não promoveu a multiplicação de brotos em *Ficus benjamina*. Trabalhando com micropropagação de crisântemo (*Dendranthema morifolium*), Salgado et al. (2001) notaram que o TDZ possui efeito inibitório na regeneração de brotos, quando utilizado em concentrações acima do nível ótimo. Este efeito inibitório no crescimento de brotos ocorreu, sem dúvida, em virtude do seu efeito fitotóxico.

CONCLUSÕES

1. O meio MS suplementado com BAP (2,0 mg L⁻¹) isolado ou associado a KIN (1,0 mg L⁻¹), promove maior capacidade de regeneração e comprimento de brotos.
2. O meio MS suplementado com BAP (2,5 mg L⁻¹) estimula o maior comprimento de brotos.
3. O meio MS suplementado com TDZ (1,0 mg L⁻¹, 0,50 mg L⁻¹ e 0,25 mg L⁻¹) afeta a capacidade de regeneração de brotos, com a formação de calos.

LITERATURA CITADA

- Araújo, P. S.; Silva, J. M. O. D.; Neckel, C. A.; Ianssen, C.; Oltramari, A. C.; Passos, R.; Tiepo, E.; Bach, D. B.; Maraschin, M. Micropropagação da Babosa (*Aloe vera*). <http://www.biotecnologia.com.br/bio/bio25/10.html-68K>. 21 Jan. 2003.
- Carvalho, J. M. F. C.; Sousa, D. M.; Santos, W. dos. Indução do superbrotamento e regeneração de planta in vitro na cultivar de algodão CNPA 7H. *Revista de Oleaginosas e Fibras*, v.4, n.2, p.61-65, 2000.
- Chappel, E. J.; Mauney, J. R. Culture of apical meristem of *Gossypium hirsutum* in vitro. *Phyton*, v.24, p.93-100, 1967.
- Coboni, E.; Lauri, P.; D'Angeli, S. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports*, v.19, p.755-760, 2000.
- Grattapaglia, D.; Caldas, L. S.; Silva, J. R. Machado, M. A. Cultura de tecidos e estaquia de maracujá. In: Simpósio Nacional de Maracujá, 3, 1998, Vitória da Conquista Anais... Vitória da Conquista: Fundação Cargill, 1998.
- Han, B. H.; Joung, H. Y.; Ko, J. Y. In vitro propagation of *Ficus benjamina* by shoot tip culture. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, v.38, n.3, p.315-319, 1997.
- Keulensans, J.; Dewitte, K. Plant-regeneration from cotyledons and embryonic axes in applier - sites of reaction and effect of culture in the light, *Euphytica*, v.1-2, n.77, p.135-139, 1994.
- Leontiev-Orlov, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de ameixas (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.22, n.2, p.268-271, 2000.
- Murashige, T.; Skoog, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- Nair, S.; Gupta, P. K.; Shirgurkar, M. V.; Mascarenhas, A. F. In vitro organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.3, p.29-40, 1984.
- Nicoloso, F. T.; Garlet, A.; Zanchetti, F.; Sebem, E. Micropropagação in vitro da Grábia (*Apuleia leiocarpa*). www.cnpt.embrapa.br/redbiobr/anais/redv96/res39.html-4K. 30 Jul. 2003.
- Pérez-Tornero, O.; Burgos, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.63, p.133-141, 2000.
- Pescador, R.; Araújo, P. S.; Maas, C. H. Protocolos para obtenção de Saffrol. *Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento*, v.3, n.15, p.18-23, 2000.
- SAEG - Sistema para análise estatística em genética. Uberlândia: Fundação Arthur Bernardes, UFV, 1993. 5.p.
- Salgado S. M. L.; Cunha R. L.; Niella G. R.; Teixeira H. P. M.. Efeito da utilização de TDZ e Benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). *Ciência e Agrotecnologia*, v.25, n.2, p.274-280, 2001.
- Silva, L. C.; Amorim Neto, M. da S.; Beltrão, N. E. de M. Recomendações técnicas para o cultivo e época de plantio de mamoneira cv. BRS 149 (Nordestina) na microrregião de Iracê, Bahia. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000. p.6. Comunicado Técnico 112