

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Agave sisalana* PERRINE E
HÍBRIDO 11648**

FABIO RIBEIRO GARCIA

CRUZ DAS ALMAS / BAHIA

2017

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Agave sisalana* PERRINE E HÍBRIDO
11648**

FABIO RIBEIRO GARCIA

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Dr^a Franceli da Silva

Coorientadora: Dr^a Cristina Ferreira Nepomuceno

Coorientadora: Dr^a Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

G216p

Garcia, Fabio Ribeiro.

Propagação in vitro de *Agave sisalana* e híbrido 11648 / Fabio Ribeiro Garcia. – Cruz das Almas, BA, 2017.

97f.; il.

Orientadora: Francelida Silva.

Coorientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Sisal – Micropropagação de plantas. 2.Sisal – Recursos genéticos vegetais. 3.Controle biológico – Doenças e pragas. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.577

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Agave sisalana* PERRINE E
HÍBRIDO 11648**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
Fábio Ribeiro Garcia**

Realizada em 14 de março de 2017

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB
Examinador interno (Coorientadora)

Prof^a Dr^a Cintia Armond
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB
Examinador externo

Prof^a. Dr^a. Daniela de Souza Hansen
Instituto Federal Baiano-IFBaiano
Examinador externo

Prof. Dr. Everton Hilo de Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical
Examinador externo

Prof. Dr. Wellington Antônio Bastos Almeida
Faculdade Maria Milza
Examinador externo

A Hipólito Vilmar Lopes Garcia, com todo meu amor, imensurável e eterno,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

O apagar das luzes é triste, ele representa o término de mais uma fase nas nossas vidas. É fundamental agradecermos a todos que estiveram ao nosso lado para a realização desta jornada, sem os quais ela não seria possível ser concretizada.

Ao meu pai, Hipólito Garcia, que mesmo não estando mais entre nós, estará sempre presente na minha vida.

A minha mãe, Lucia Ribeiro pela compreensão, paciência, por tanto amor e principalmente por essa pessoa que me surpreende a cada dia. Te amo incondicionalmente!

Aos meus irmãos, Tati Garcia, Tici Garcia e Fabricio Garcia, pelo respeito, admiração e amor.

A minha sobrinha, Letícia Garcia, por encher a minha vida de alegria e muito amor.

A Edinaldo Puridade da Mata pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis! Te amo!

Aos amigos Adilson Nunes, Gustavo Rocha, Klebson Souza, Rone Borges e Ubaldo Neto. Amo vocês!

Ao querido amigo Diego Moraes, pela paciência, e pelos conselhos nos momentos difíceis. Muito obrigado!

A Leandro Cerqueira pelo companheirismo e paciência.

A minha orientadora, Prof^a Franceli da Silva, pela oportunidade de ter aceitado a me orientar, amizade e pelo incentivo.

A minha coorientadora, Prof^a Maria Angélica Costa, pela orientação e ensinamentos ao longo de todos esses anos.

A Cristina Nepomuceno pela orientação e amizade.

A Adilson Nunes da Silva, Daniela de Souza Hansen, Everton Hilo de Souza e Sebastião de Oliveira e Silva pelas considerações na qualificação.

A Moema Rocha por esses anos de amizade, companheirismo e por sempre está disponível quando precisei.

Aos amigos do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais, Josirene Moreira, Lucimário Bastos, Afonso Henrique Ferreira, Daniel Vieira e Simone Sacramento. Obrigado a todos pela amizade, pela ajuda, e companheirismo.

A minha irmã mais nova e filha, Ila Faro pelo companheirismo e amizade.

Ao Rafael Mota, pela disponibilidade para coleta de mudas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela contribuição para a minha formação.

A Deise, secretaria do curso, pela atenção sempre que requisitada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação profissional e pessoal.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	01
Artigo 1	
ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Agave sisalana</i> E DO HÍBRIDO 11648.....	11
Artigo 2	
INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM <i>Agave sisalana</i> E HÍBRIDO11648.....	29
Artigo 3	
PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SISAL HÍBRIDO 11648.....	51
Artigo 4	
ACLIAMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE <i>Agave sisalana</i> EM DIFERENTES SUBSTRATOS.....	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Agave sisalana* E HÍBRIDO 11648

Autor: Fabio Ribeiro Garcia

Orientadora: Franceli da Silva

Coorientadoras: Cristina Ferreira Nepomuceno, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

RESUMO: O Brasil é o maior produtor mundial de sisal, sendo o estado da Bahia responsável por cerca de 96% de toda essa produção. Apesar da sua importância econômica, a cultura vem sofrendo declínio da produção nos últimos anos, em decorrência da podridão vermelha do sisal. Doença que causa o amarelecimento e murcha das folhas e apodrecimento dos tecidos internos base do pseudocaulo, evoluindo para a morte da planta. Com o intuito de diminuir os danos causados pela podridão vermelha, por intermédio da utilização de mudas saudáveis pelos produtores de sisal, é necessário o emprego de técnicas modernas de biotecnologia, como a cultura de tecidos. Este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo de micropropagação de *Agave sisalana* e híbrido 11648 através de rebentos. Para o estabelecimento *in vitro* foram realizados dois experimentos, no primeiro experimento foram testadas soluções do fungicida Carbendazim a 0,0, 0,1%, 0,2% ou 0,3% por 10, 20 ou 30 minutos para a desinfestação dos explantes. No segundo experimento de estabelecimento, foram testadas a adição do antibiótico cloranfenicol nas concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mg L⁻¹ ao meio de cultura. No segundo artigo foram estudadas o efeito do benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 0; 0,013; 0,026; 0,039 e 0,056 mM e ácidonaftalenoacético (ANA) nas concentrações 0,000 ou 0,001 de sobre a regeneração de brotações em segmentos de pseudocaulos e disco de segmento do pseudocaulo de *Agave sisalana* e híbrido 11648. No terceiro artigo foi realizada a pré-aclimatização de brotações de sisal híbrido 11648, para tanto foram testadas concentrações dos sais do meio (50 ou 100% MS) e de sacarose (15 ou 30 gL⁻¹) e vedação dos tubos com tampa plástica ou fita micropore. No quarto artigo foram avaliados o efeito substratos constituídos de diferentes proporções de solo, substrato comercial West Garden® terra vegetal, esterco e fibra de coco sobre a aclimatização e crescimento de brotações de *Agave sisalana*. A utilização de solução de carbendazim a 0,2 % por 20 minutos foi

eficiente para a desinfestação de explantes de *Agave sisalana*, para híbrido 11648, utilização de solução de carbendazim a 0,2 % por 10 minutos. A adição de Cloranfenicol ao meio de cultura na concentração de 200 mg L⁻¹ apresentou melhores resultados no controle da contaminação *in vitro* para *Agave sisalana*, para o híbrido 11648 a concentração de 100 mg L⁻¹ foi mais eficiente. Os tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de BAP mostraram maior eficiência na indução de brotações segmentos de pseudocaule e discos de segmento caulinares de *Agave sisalana* e híbrido 11648, independente da utilização de ANA. A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose combinada com a concentração de 50% de sais do meio MS favoreceu o crescimento e a sobrevivência de plantas do híbrido 11648, independente do tipo de vedação. Por questões econômicas e de disponibilidade, o substrato composto com 50 % solo + 50% de esterco é o mais indicado para a aclimatização de crescimento de brotações de *Agave sisalana*.

Palavras-chave: Asparagaceae, Desinfestação, Micropropagação, Crescimento, Substratos.

PROPAGATION *IN VITRO* OF *Agave sisalana* AND HYBRID 11648

Author: Fabio Ribeiro Garcia

Adviser: Franceli da Silva

co-advisor: Cristina Ferreira Nepomuceno, Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

ABSTRACT: Brazil is the world's largest sisal producer, with Bahia state accounting for about 96 % of all production. Despite its economic importance, the crop has suffered a decline in production in recent years, due to the red rot of sisal. A disease that causes the yellowing and wilting of the leaves and rotting of the inner tissues of the pseudocaulis, evolving to the death of the plant. In order to reduce the damage caused by red rot through the use of healthy seedlings by sisal producers, it is necessary to use modern biotechnology techniques, such as tissue culture. This work aimed to establish the micropropagation protocol of *Agave sisalana* and hybrid 11648 through shoots. For the *in vitro* establishment, two experiments were carried out, in the first experiment, solutions of the fungicide Carbendazim at 0.0, 0.1 %, 0.2 % or 0.3 % were tested for 10, 20 or 30 minutes for disinfection of the explants. In the second establishment experiment, the addition of the antibiotic chloramphenicol at concentrations 0, 50, 100, 200 and 300 mg L⁻¹ to the culture medium was tested. In the second article, the effect of benzylaminopurine (BAP) at concentrations 0; 0.013; 0.026; 0.039 and 0.056 mM and acid-phthalenoacetic acid (ANA) at concentrations of 0.000 or 0.001 of on regeneration of shoots in segments of pseudocaulis and segment disc of the pseudocaulis of *Agave sisalana* and hybrid 11648. In the third article pre-acclimatization of sisal shoots (50 or 100% MS) and sucrose (15 or 30 g L⁻¹) and sealing tubes with a plastic cap or micropore tape. In the fourth article we evaluated the effect of substrates consisting of different proportions of soil, commercial substrate West Garden® vegetable soil, manure and coconut fiber on the acclimatization and growth of *Agave sisalana* shoots. The use of 0.2 % carbendazim solution for 20 minutes was efficient for disinfection of explants of *Agave sisalana*, for hybrid 11648, use of 0.2 % carbendazim solution for 10 minutes. The addition of Chloramphenicol to the culture medium in the concentration of 200 mg L⁻¹ presented better results in the control of the *in vitro* contamination

for *Agave sisalana*, for the hybrid 11648 the concentration of 100 mg L⁻¹ was more efficient. The treatments with 0.039 and 0.053 mM of BAP showed a greater efficiency in the induction of budding segments of pseudocaulis and shoot segments of *Agave sisalana* and hybrid 11648, regardless of ANA use. The concentration of 30 g L⁻¹ of sucrose combined with the 50 % concentration of salts of the MS medium favored the growth and survival of 11648 hybrid plants, regardless of the type of seal. Due to economic and availability issues, the substrate composed of 50 % soil + 50% manure is the most suitable for the acclimatization of shoot growth of *Agave sisalana*.

Keywords: Asparageaceae, Desinfestation, micropropagation, Growth, Substrates.

REFERENCIAL TEÓRICO

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) pertence à família Agavaceae, subfamília Agavoidea, gênero *Agave* e subgênero *Euagave*. O gênero *Agave* compreende, aproximadamente, 300 espécies nativas das zonas tropicais e subtropicais da América do Norte e América do Sul (SANCHES POTES et al., 1991).

O sisal possui sistema radicular fibroso, fasciculado, emergindo da base do pseudocaule e dois tipos de raízes: as fixadoras e as alimentadoras. Não tem caule aéreo e, portanto, é acaulescente, mas em seu lugar há um eixo principal ou pseudocaule, sobre o qual se acham inseridas as folhas e o broto terminal (Embrapa, 2008).

O pseudocaule de *A. sisalana* pode, quando adulto, atingir uma altura de até 1,20 m e um diâmetro de 20 cm. O sisal produz brotações a partir de gemas situadas na base da planta, abaixo do nível do solo, e seu diâmetro varia de 1,5 a 3 cm; desenvolve-se em forma longitudinal, com diferentes comprimentos e a uma profundidade que varia entre 5 e 15 cm. A folha do sisal é de forma linear lanceolada, destituída de pecíolo (sésil, ligada diretamente ao pseudocaule), rígida, de cor verde escuro e comprimento entre 120 e 160 cm, com 10 a 15 cm de largura na parte mediana (SILVA et al., 2008).

O sisal é adaptado a viver em condições semiáridas, é originário da América Central, onde se concentra a maior diversidade de espécies na zona de transição árida e semi-árida do México Central (CARVALHO et al., 2008). Do México, o sisal foi levado para outras partes do mundo, passando a ser comercialmente cultivado. Atualmente está expandido em muitos países como: Colômbia, Bolívia, Brasil, Espanha, Equador, Peru e Venezuela. Várias espécies são de interesse econômico, por seu valor ornamental e por ser fonte de matéria prima para subprodutos de interesse comercial (DEVESA, 1997). Dentre as espécies mais importantes deste gênero, destacam-se, *Agave sisalana*, *Agave stringens*, *Agave subinermis*, *Agave tequilana*, *Agave victoriae-reginae*, *Agave vivipara*, *Agave weberi*, *Agave zebra* (DEBNATH et. al., 2010).

No Brasil, a *Agave sisalana* é a espécie de maior importância econômica, pois é a principal fonte de extração de fibras vegetais. A *Agave sisalana* possui grande relevância na indústria automobilística para o preenchimento de estofados e na construção civil, a fibra de sisal vem sendo adicionada a cimentos e

argamassas com o intuito de aumentar resistência. Contudo, existem outros produtos em que o sisal pode ser utilizado, tais como: carpetes, revestimento para paredes, polpa e mucilagem para papel e alimentação animal (SILVA et al., 1999).

No Brasil, a *Agave sisalana* foi introduzida em 1903, no estado da Bahia, sendo posteriormente difundida para outros estados. O Brasil é o maior produtor e exportador de fibra de sisal do mundo, a produção brasileira de sisal alcançou em 2016, 138 mil toneladas (IBGE, 2016).

O sisal apresentou grande facilidade de adaptação às condições da região semiárida do Nordeste brasileiro. O seu cultivo ocupa uma extensa área dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte e em regiões com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas (CARVALHO et al., 2002).

O Nordeste conta com dois genótipos de sisal como opção para cultivo, a *Agave sisalana* (Figura 1A), que é o material amplamente cultivado na região, e o Híbrido 11648 (Figura 1B), originário da África a partir do cruzamento entre *Agave angustifolia* (1C) x *Agave amaniensis* (1D) e introduzido no Brasil por volta de 1930.

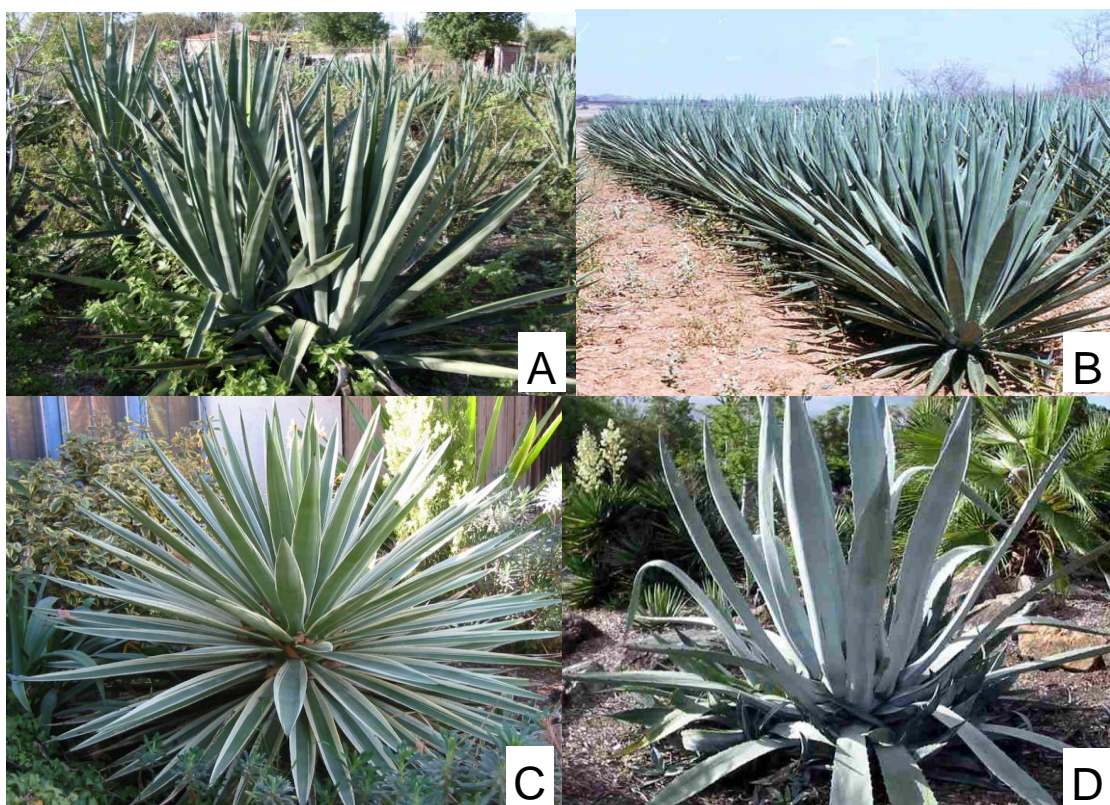


Figura 1. Espécies do Gênero *Agave*, em A). *Agave sisalana* Perrine; B). Híbrido 11648; C). *Agave angustifolia* e D). *Agave amaniensis*.

Entre os dois genótipos, o híbrido 11648 apresenta grande vantagem sobre a *Agave sisalana* em relação à produção de fibra. Em ensaios realizados pela Companhia de Celulose da Bahia (CCB) entre os anos de 1980 e 1990, a produção de folhas do Híbrido 11648 apresentou 116% superior ao *Agave sisalana*, e rendimento de fibra por hectare até 196% superior (SOUZA SOBRINHO et. al.1985).

A Bahia é responsável por 95% de toda a produção nacional, sendo que esta produção concentra-se em 68 municípios, alguns desses com maior expressão em termos de produção, como por exemplo: Conceição do Coité, Santa Luz, Valente, Araci (IBGE, 2016).

Apesar da relevante importância econômica do sisal para o Brasil, sobretudo para estados do Nordeste, alguns fatores podem limitar o desenvolvimento desta cultura, a exemplo de doenças como a podridão do colo ou podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger*, um ascomiceto, que pode ser veiculado pelo solo, água, vento, ferramentas infectadas, sendo o principal problema fitossanitário da cultura do sisal no Brasil (LIMA et. al, 1998).

A podridão vermelha é caracterizada pelo escurecimento dos tecidos internos do pseudocaule (Figura 2). As áreas afetadas variam da coloração cinza escuro a rosa pálido e se estendem da base das folhas à base do tronco da planta, em plantas com estádios avançados da doença, as folhas se tornam amareladas e o tronco completamente apodrecido e posterior morte da planta (COUTINHO et al., 2006).

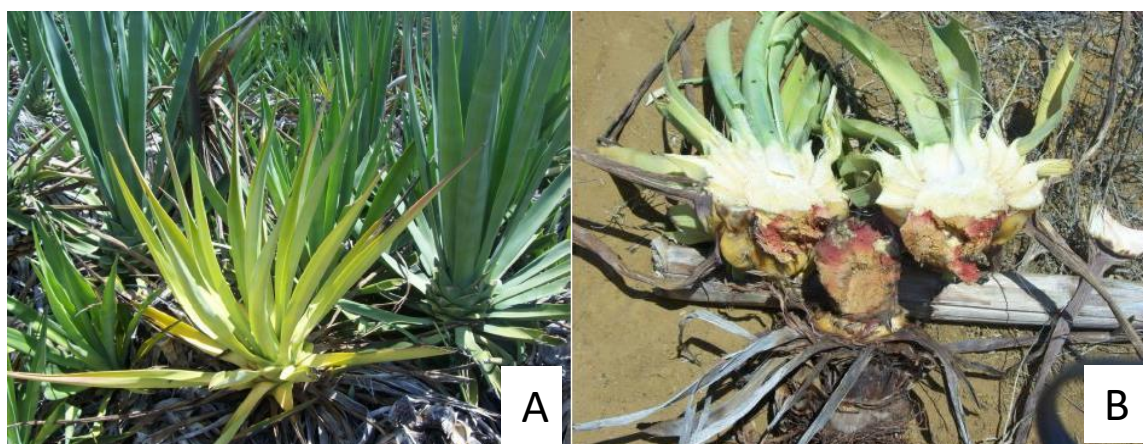


Figura 2. Plantas de *Agave sisalana* apresentando sintomas da doença podridão vermelha: A). Sintoma externo: amarelamento da planta; B). Sintoma interno: podridão vermelha nos tecidos do pseudocaule e na base das folhas.

Segundo Alves et. al. (2004) desde 1970 a podridão vermelha vem afetando as principais áreas produtoras de sisal do nordeste, principalmente o estado da Bahia. Este fato tem despertado muitos produtores de sisal da região baiana, pois as folhas das plantas infectadas devem ser descartadas e não servem para o desfibramento e a planta contaminada morre precocemente.

Distúrbios fisiológicos decorrentes da carência de alguns nutrientes como o potássio e o cálcio, podem favorecer o desenvolvimento de doenças fúngicas, visto que a planta se torna mais frágil e susceptível a infecções (SALGADO; AZZINI, 1982). Fatores como estresse hídrico ou nutricional também podem tornar os tecidos vegetais mais susceptíveis a infecções (ABREU, 2010), uma vez que o patógeno possui baixa capacidade de penetração, utilizando da sensibilidade fisiológica da planta para penetrar nos tecidos vegetais e só então causar a doença.

Com o intuito de evitar a disseminação da doença, são adotadas medidas como a queima e a extração das plantas, além da utilização de mudas saudáveis (SILVA et. al., 2008). Assim, torna-se necessário o emprego de técnicas que otimizem e permitam a obtenção de mudas livres de agentes patogênicos a fim de favorecer o desenvolvimento da cultura sisaleira, destacando-se, entre estas, a cultura de tecidos, técnica amplamente empregada na obtenção de mudas em curto espaço de tempo.

A propagação do sisal pode ocorrer através de bulbilhos produzidos na inflorescência ou por rebentos laterais. Apesar da *Agave sisalana* produzir em torno de 200 a 1000 bulbilhos por inflorescência, a floração só ocorre depois de 8 a 9 anos de cultivo, além disso, as *Agaves* são plantas monocárpicas, ou seja, elas florescem apenas uma vez na vida e morrem posteriormente (KULUS, 2014).

Em vista da importância econômica do sisal, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam protocolos para realizar propagação rápida e maciça, assim, a cultura de tecidos é como uma alternativa para propagação de espécies de interesse econômico.

A técnica de micropropagação vai desde a seleção da fonte de explante, desinfestação dos tecidos e a introdução em ambiente asséptico em meios de crescimento, enraizamento e aclimatização (VASIL, 1985). Esta técnica oferece várias vantagens, como a produção em grande escala de plantas em curto período de tempo, além de plantas livres de fungos e bactérias (MERCIER, 1992).

Tendo em vista que as plantas são obtidas em ambiente asséptico, esta técnica possui grande aplicação e aceitação mundial possibilitando entre os países intercâmbio de material vegetal isento de patógenos, evitando assim, barreiras fitossanitárias.

Segundo Grattapaglia et. al. (1998) a micropropagação é uma importante ferramenta para a propagação de plantas, e pode se dá de forma indireta ou direta, onde ocorre o surgimento de gemas e brotações em tecidos que apresentam potencial morfogenético.

No melhoramento genético de plantas, a micropropagação pode ser utilizada para a indução e exploração da variação somaclonal espontânea ou induzida através de agentes mutagênicos (SOUZA et. al., 2000). A técnica da micropropagação também permite a produção de mudas em grande escala a partir de explante primário. Além disso, a técnica pode contribuir para a conservação *in vitro* de espécies nativas e ameaçadas de extinção (FERREIRA, 2008).

Neste contexto, é extremamente necessário estabelecer um protocolo de propagação *in vitro*, que vise otimizar a produção de mudas de sisal, buscando equacionar as questões ambientais, sociais, econômicas e tecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2010.

ALVES, M.O.; SANTIAGO, E.S.; LIMA, A.R.M. **Diagnóstico socioeconômico da região nordestina produtora de sisal**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 75 p. 2004.

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, 4 p. 2002.

CARVALHO, J.M.F.C., **Técnicas do cultivo *in vitro* no sisal**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos, 208, 2008.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**, Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Fibras Naturais - 11ª Reunião Ordinária - 06/04/2015 Brasília - DF, 2015.

COUTINHO, W.M. SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.M. da; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. da.. **A podridão do tronco do sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, (Comunicado Técnico, 281). p.12, 2006.

DEBNATH, M.; PANDEY, M.; SHARNA, R.; THAKUR, G.S.; LAL, P.
Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plant Research**. Libéria. v.4, p. 177-187, 2010.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Circular técnica 123. **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Campina Grande, PB Julho, 2008.

FERREIRA, W.M. e SUZUKI, R.M.; O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In: Loiola MIB, Baseia IG & Lichston JE (Org.) **Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil**. Natal, Imagem Gráfica, p.67-68. 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BISO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998.

KULUS, D.; ZALEWSKA, M.; Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species: a review. **Scientia Horticulturae**, Netherlands. v. 168, p. 88-107, 2014.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibras**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. In vitro multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.30, p.247-249, 1992.

SALGADO, A. L. B; AZZINI, A. Efeito da omissão de macronutrientes em sisal. **Bragantia**, Campinas. v.41, n.13, 1982.

SANCHES POTES, A. et al. **Manuales para educación agropecuária: cultivos de fibras**. México: Trillas, p. 84, 1991.

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

SILVA, O.R.F. COUTINHO, W.M.; CARTAXO, W. V.; FILHO, J. L. da S.; CARVALHO, S. O.; COSTA, L. B.; **Cultivo do sisal no nordeste**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Circular Técnica, 123, 2008.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. **Produção de mudas**. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). *Banana Produção: aspectos técnicos*. Brasília: EMBRAPA, p. 39-46. 2000.

SOUZA SOBRINHO, J. de; SILVA, D.D. da; SILVA, F. de A.S. Estudo sobre competição das variedades híbrido 11.648 e *Agave sisalanana* zona fisiográfica tabuleiro. Salvador: **Companhia de Celulose da Bahia**, 1985.

VASIL, I. Automation in plant propagation. **Plant, Tissue and Organ Culture**, Vuylsteke, D. E. e E. De Langhe, n. 39, p. 105-109, 1985.

ARTIGO 1

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Agave sisalana* E DO HÍBRIDO 11648¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Caatinga, em versão na língua inglesa.

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Agave sisalana* E DO HÍBRIDO 11648

RESUMO: A grande maioria dos plantios de sisal são realizados utilizando bulbilhos ou rebentos, porém, este tipo de muda apresentam algumas limitações. As técnicas de micropropagação podem elevar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo e melhorar a qualidade da produção de mudas. Contudo, a contaminação é um dos maiores problemas desse processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do antibiótico cloranfenicol e do fungicida Carbendazim na descontaminação de rebentos de *Agave sisalana* e do híbrido 11648. Foram realizados dois experimentos, no primeiro, os explantes foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 1,0 % por 15 minutos, seguindo de imersão em solução de carbendazim a 0,0, 0,1 %, 0,2 % ou 0,3 % por 10, 20 ou 30 minutos, seguindo de três lavagens em água destilada autoclavada, em seguida, foram inoculados em meio de cultura MS. No segundo experimento, os explantes foram imersos em álcool 70 % por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 1,0 % por 15 minutos, solução de carbendazim a 0,1 % por 20 minutos, seguindo de três lavagens em água destilada autoclavada. Após a desinfestação os explantes foram reduzidos a 2 cm em seguida inoculados em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose, 2 g L^{-1} de carvão ativado, 2 g L^{-1} de ácido ascórbico e antibiótico cloranfenicol nas concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mg L^{-1} . Para os dois experimentos, após 30 dias foram avaliadas a contaminação fúngica, bacteriana e oxidação dos explantes. A utilização de solução de carbendazim a 0,2 % por 20 minutos foi eficiente para a desinfestação de explantes de *Agave sisalana*, para híbrido 11648, utilização de solução de carbendazim a 0,2 % por 10 minutos. A adição de Cloranfenicol ao meio de cultura na concentração de 200 mg L^{-1} apresentou melhores resultados no controle da contaminação *in vitro* para *Agave sisalana*, para o híbrido 11648 a concentração de 100 mg L^{-1} foi mais eficiente.

Palavras-chave: Desinfestação, Fungicida, Antibiótico.

ESTABLISHMENT *IN VITRO* OF *Agave sisalana* AND HYBRID 11648

ABSTRACT: The great majority of sisal plantations are carried out using bulbiles or shoots, however, this type of seedling presents some limitations. Micropropagation techniques can increase the multiplication rate in a short period of time and improve the quality of seedling production. However, contamination is one of the major problems of this process. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the antibiotic chloramphenicol and the fungicide Carbendazim in the decontamination of shoots of *Agave sisalana* and hybrid 11648. Two experiments were carried out, in the first the explants were immersed in 70 % alcohol for 1 minute, followed by immersion in 1.0 % sodium hypochlorite for 15 minutes, followed by immersion in 0.0, 0.1 %, 0.2 %, or 0.3 % carbendazim solution for 10, 20 or 30 minutes, followed by three Washes in autoclaved distilled water, then inoculated into MS culture medium. In the second experiment, the explants were immersed in 70 % alcohol for 1 minute, followed by immersion in 1.0 % sodium hypochlorite for 15 minutes, 0.1 % carbendazim solution for 20 minutes, followed by three washes in water Distilled water. After disinfection the explants were reduced to 2 cm and then inoculated in ½ MS culture medium supplemented with 15 g L⁻¹ sucrose, 2 g L⁻¹ activated charcoal, 2 g L⁻¹ ascorbic acid and antibiotic chloramphenicol at concentrations 0, 50, 100, 200 and 300 mg L⁻¹. For the two experiments, after 30 days the fungal, bacterial and oxidation of the explants were evaluated. The use of 0.2 % carbendazim solution for 20 minutes was efficient for disinfestation of explants of *Agave sisalana*, for hybrid 11648, use of 0.2 % carbendazim solution for 10 minutes. The addition of Chloranfenicol to the culture medium in the concentration of 200 mg L⁻¹ presented better results in the control of the in vitro contamination for *Agave sisalana*, for the hybrid 11648 the concentration of 100 mg L⁻¹ was more efficient.

Key words: Disinfestation, Fungicide, Antibiotic.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de fibra de sisal do mundo, alcançando em 2016, 138 mil de toneladas (IBGE, 2016). Em vista da grande importância econômica do sisal, torna-se necessário cada vez mais o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam protocolos para otimizar a propagação dessa espécie.

A propagação do sisal pode ocorrer através de rebentos laterais ou por bulbilhos produzidos no escapo floral. A propagação vegetativa através de rebentos laterais é a principal causa de disseminação da podridão vermelha, doença que causa perdas consideráveis a cultura, uma vez que 70 % dessas mudas apresentam sintomas da podridão vermelha (ABREU, 2010).

A técnica de micropropagação é uma alternativa para propagação massal desta espécie, disponibilizando uma grande quantidade de mudas saudáveis, livres de agentes fitopatogênicos e com características uniformes (GEORGE et al., 2008)

Uma das premissas para o êxito da micropropagação depende, em parte, de medidas que visem o controle e prevenção da contaminação microbiana *in vitro* (GONÇALVES et al., 2015), pois, os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, além de liberarem metabólitos tóxicos que podem ocasionar a morte dos explantes (PEREIRA; CORREA; BOLIANI, 2011).

A contaminação é bastante prejudicial para a cultura de tecidos, principalmente quando a infecção ocorre por microrganismos introduzidos com os explantes, ocasionando restrições à fase de estabelecimento *in vitro* (PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; VICENTE, 2011)

Diversas substâncias com ação germicida são utilizadas para a desinfestação de explantes, dentre elas, os mais comuns são, etanol, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e fungicidas, e a utilização e combinação dentre estas substâncias pode variar de acordo com a espécie, tipo de explantes e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para o controle e prevenção da contaminação *in vitro*, autores citam a adição de antibióticos como ampicilina sódica, agrimicina e cloranfenicol ao meio de cultura, (PALU et al., 2011). Os antibióticos podem ainda serem adicionados

ao meio de cultura por um período limitado, o necessário para a eliminação dos contaminantes (SCORTICHINI; CHIARIOTTI, 1988).

Segundo Dodds et. al., (1985) muitos antibióticos apresentam efeito fitotóxico, comprometendo o crescimento *in vitro* dos explantes, podendo variar em função da concentração, do tipo de explante e da tolerância da espécie tratada.

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações e tempo de imersão em solução do fungicida Carbendazim e da adição do antibiótico Cloranfenicol ao meio de cultura, no estabelecimento *in vitro* de rebentos de *A. sisalana* e do híbrido de sisal 11648.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fonte de explantes, foram utilizados rebentos de *A. sisalana* e híbrido 11648 com aproximadamente 20 cm de altura (Figura 1A), coletados no mês de janeiro de 2014 no município de Conceição do Coité, BA. Foram retiradas as partes aéreas e raiz dos rebentos, reduzindo-os a segmentos de pseudocaule de 5 cm de comprimento, os quais foram lavados em água corrente para a retirada de resíduo de solo (Figura 1 B-D), seguido da desinfestação dos mesmos.

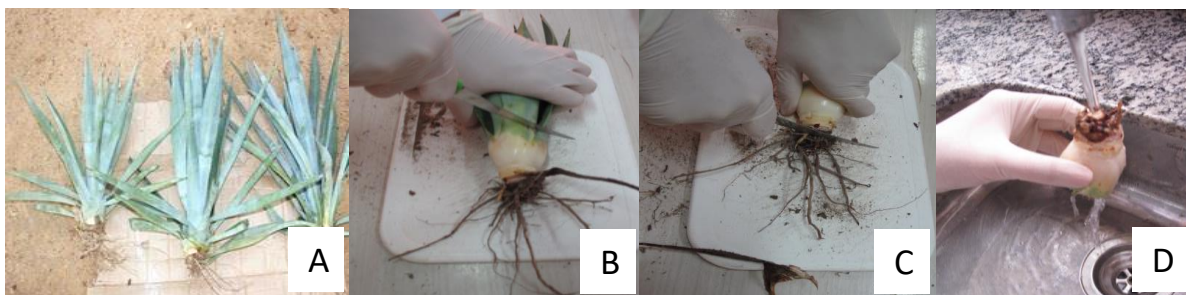


Figura 1. A). Rebentos de *A. sisalana* e híbrido 11648; B-C). Retirada de parte aérea e raízes de rebentos de sisal e D). Lavagem de pseudocaule de sisal em água corrente.

Concentração e tempo de imersão em fungicida sobre o estabelecimento *in vitro* de rebentos de *Agave sisalana* e híbrido 11648

Em câmara de fluxo laminar os explantes de *A. sisalana* e do híbrido 11648 com aproximadamente 5 cm foram imersos em álcool 70 % por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 1 % por 15 minutos e

posteriormente em solução de Carbendazim a 0,0, 0,1 %, 0,2 % ou 0,3 % por 10, 20 ou 30 minutos, seguido de três lavagens em água destilada autoclavada. Após a desinfestação os explantes foram reduzidos a 2 cm de altura, em seguida inoculados em tubos de ensaio (25 mm x150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 15 g de sacarose e 2 g L^{-1} de Phytigel (Figura 2 A-D). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos.

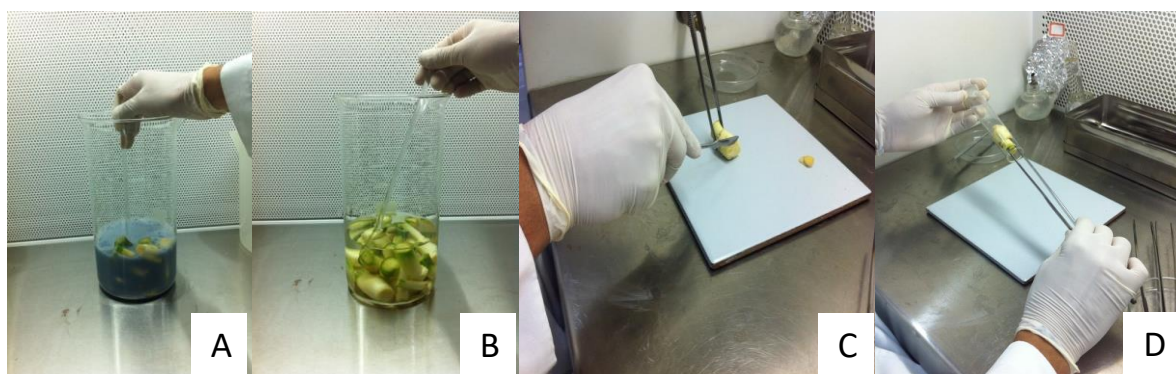


Figura 2. Desinfestação de rebentos de sisal: em A). Desinfestação em de rebentos de sisal em solução de carbendazim; B). Lavagem de explantes de sisal em água destilada autoclavada; C). Redução dos explantes de sisal após a etapa de desinfestação e D). Introdução de explantes de sisal em meio de cultura.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Após 30 dias foram avaliadas as variáveis: porcentagem de contaminação geral, porcentagem de contaminação bacteriana, contaminação fúngica e porcentagem de oxidação fenólica (escurecimento dos explantes), todas expressas em porcentagem (%).

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 2 (Genótipos: *A. sisalana* e híbrido 11648) x 3 (Concentração de carbendazim: 0,1 %, 0,2 % e 0,3 %) x 3 (Tempo de imersão em solução de Carbendazim: 10, 20 e 30 minutos). Cada tratamento foi composto por 20 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2011).

Uso de antibiótico no controle da contaminação *in vitro* em rebentos de *Agave sisalana* e híbrido 11648

No segundo experimento, explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648 foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 1 % por 15 minutos, solução de Carbendazim a 0,1 % por 20 minutos, seguindo de três lavagens em água destilada autoclavada. Após a desinfestação os explantes foram reduzidos a 2 cm de altura, em seguida inoculados em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de ácido ascórbico e antibiótico Cloranfenicol nas concentrações 0, 50, 100, 200 e 300 mg L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,7± 0,1 antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 60µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

Após 30 dias os explantes foram subcultivados para um novo meio de cultura isento de antibiótico, onde permaneceram por mais 15 dias. Após este período, foram avaliadas as variáveis: porcentagem de contaminação geral (ocorrência de contaminantes junto aos explantes); porcentagem de contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes); porcentagem de contaminação fúngica (contaminações por fungos junto aos explantes) e porcentagem de oxidação fenólica (escurecimento dos explantes); todas expressas em porcentagem (%).

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 2 (Genótipos: *A. sisalana* e híbrido 11648) x 4 (Concentração de antibiótico adicionado ao meio de cultura: 0, 50, 100, 200 e 300 mg L⁻¹). Cada tratamento foi composto por 30 repetições, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. As análises dos dados foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Concentração e tempo de imersão em fungicida sobre o estabelecimento *in vitro* de rebentos de *Agave sisalana* e híbrido 11648

Foi observado eficiência na utilização do fungicida Carbendazim na desinfestação de explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648. Para *A. sisalana*, foi verificado que o tratamento com 0,2 % de carbendazim por 10 minutos, apresentou menor porcentagem de explantes com contaminação fúngica, não diferindo estatisticamente dos tratamentos superiores. Já, para o híbrido 11648, a menor porcentagem de contaminação fúngica foi observada no tratamento com 0,2 % de Carbendazim por 20 minutos, não diferindo estatisticamente dos tratamentos T7, T8, T9 e T10, pois, a partir do tratamento T6, foi observado a estabilização para o número de explantes contaminados (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação geral (CG%), porcentagem de contaminação fúngica (CF%), porcentagem de contaminação bacteriana (CB%) e porcentagem de oxidação (O%) em explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648 em função de diferentes concentrações e tempo de imersão em solução de fungicida carbendazim.

Genótipo	Tratamentos	Concentração x tempo	CG (%)	CF (%)	CB (%)	O (%)
<i>A. sisalana</i>	T1	0,0%/00"	90c	90c	3,3a	3,3a
	T2	0,1%/10"	63b	60b	6,6a	3,3a
	T3	0,1%/20"	52b	50b	3,3a	0,0a
	T4	0,1%/30"	48b	46b	3,3a	0,0a
	T5	0,2%/10"	12a	10a	3,3a	3,3a
	T6	0,2% /20"	16a	16a	3,3a	0,0a
	T7	0,2%/30"	20a	20a	0,0a	3,3a
	T8	0,3%/10"	16a	13a	3,3a	0,0a
	T9	0,3%/20"	18a	16a	6,6a	3,3a
	T10	0,3%/30"	16a	13a	3,3a	3,3a
Híbrido 11648	T1	0,0%/00"	100c	96c	3,3a	3,3a
	T2	0,1%/10"	66b	56b	3,3a	3,3a
	T3	0,1%/20"	40b	40b	0,0a	0,0a
	T4	0,1%/30"	40b	36b	3,3a	0,0a
	T5	0,2%/10"	47b	46b	3,3a	3,3a
	T6	0,2% /20"	16a	16a	0,0a	0,0a
	T7	0,2%/30"	17a	16a	3,3a	3,3a
	T8	0,3%/10"	10a	10a	0,0a	0,0a
	T9	0,3%/20"	16a	13a	6,6a	3,3a
	T10	0,3%/30"	15a	10a	3,3a	3,3a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O aumento da concentração e o tempo de imersão em solução de Carbendazim promoveu comportamento decrescente para a porcentagem de explantes que apresentaram contaminação fúngica, confirmando a dependência do uso do fungicida para a desinfestação de explantes de *A. sisalana* e híbrido

11648. Este comportamento evidencia que as menores concentrações e tempo de imersão em solução de carbendazim não são eficientes para a desinfestação de explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648.

O Carbendazim se caracteriza por atuar em processos metabólicos vitais dos fungos, agindo especificamente na divisão celular, pois apresentam atividade seletiva para a tubulina de fungos, e ligam-se a essa proteína, impedindo que ocorra a polimerização dos microtúbulos formadores do fuso mitótico (WHEELER et al., 1995) e, conseqüentemente reduzindo a proliferação dos mesmos.

Os resultados obtidos neste trabalho se mostraram superiores aos encontrados por Queiroz et al (2006), que, ao trabalhar com a desinfestação de bulbilhos de *A. sisalana*, verificaram uma taxa de contaminação de até 60 % quando os explantes foram imersos em solução de carbendazim a 0,2 %, antes da inoculação *in vitro*. Carneiro et. al (2000) avaliou o efeito do fungicida benomyl[®] adicionado ao meio de cultura nas concentrações 0,1; 0,2 e 0,3 % para o estabelecimento e propagação *in vitro* de bananeira da cultivar Maçã, verificaram que não foram eficientes para eliminação de microrganismos. O mesmo foi relatado por Brondani et. al. (2009) quando testaram o efeito de fungicida no estabelecimento *in vitro* de explantes do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunni*, com a aplicação de 3 % do fungicida kumulus[®] por 7 dias.

Para a variável porcentagem de contaminação bacteriana, os tratamentos estudados neste trabalho, não apresentaram diferença estatística significativa entre si, independente do genótipo (Tabela 1). Segundo Costa et. al. (2013) relataram que, de modo geral, os efeitos dos fungicidas sobre bactérias são bastante inconsistentes e que os fungicidas podem afetar de forma variável a sobrevivência sobre bactérias. De acordo com Puldeko e Madrzak (2004), os fungicidas aplicados no tratamento de sementes de soja podem afetar diretamente a sobrevivência de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, porém, não em razão ao seu princípio ativo, mas devido ao pH e aos solventes usados nas formulações.

A oxidação não foi um fator limitante para o estabelecimento *in vitro* de explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648, pois, foram verificados valores abaixo de 3,3 %, não havendo diferença estatística significativa entre os tratamentos estudados, independente do genótipo.

Segundo Costa et al. (2006) O processo de oxidação é desencadeado quando as substâncias desinfestantes entram em contato com o tecido injuriado, liberando fenóis ao meio de cultura, inibindo o crescimento dos explantes, Costa et al., (2006), Sato et al., (2001) e Van Winkle et al., (2003).

Uso de antibiótico no controle da contaminação *in vitro* em rebentos de *Agave sisalana* e híbrido 11648

Por meio da análise de variância, observou-se que houve diferença significativa entre os resultados a partir das concentrações do antibiótico cloranfenicol utilizadas para as variáveis: porcentagem de contaminação fúngica e porcentagem de contaminação bacteriana (Tabela 2).

Tabela 2 Porcentagem de explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648 contaminados por fungo, bactéria e oxidados em função de diferentes concentrações do antibiótico cloranfenicol.

Genótipo	Cloranfenicol (mg L ⁻¹)	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Oxidação (%)
<i>Agave sisalana</i>	0	96c	20,0b	0,0a
	50	46b	6,6a	0,0a
	100	10b	3,3a	0,0a
	200	0a	0,0a	6,0a
	300	0a	0,0a	13,0b
Híbrido 11648	0	80,0c	20,0b	0,0a
	50	43,3b	6,6a	0,0a
	100	6,3a	3,3a	0,0a
	200	3,1a	3,3a	10,0a
	300	0,0a	0,0a	56,6b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os resultados obtidos mostraram que houve redução total da contaminação fúngica e bacteriana. Para os dois genótipos estudados, as menores porcentagem de contaminação, tanto fúngica quanto bacteriana foram observados quando se utilizou as concentrações 200 e 300 mg L⁻¹. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Carneiro et al. (2000), que relataram taxas de 73 % de explantes não contaminados quando se utilizou os antibióticos cefotaxima e rifampicina na concentração de 300 mg L⁻¹ para a desinfestação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maça).

Pereira e Fortes (2003), estudando o efeito *in vitro* de doze antibióticos no controle de bactérias endofíticas de batata (*Solanum tuberosum* L.), relataram que, dos doze antibióticos testados, seis apresentaram algum tipo de controle, dentre eles, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina.

Para os dois genótipos estudados neste trabalho, o aumento da concentração de cloranfenicol promoveu um comportamento decrescente para a porcentagem de contaminação fúngica e porcentagem de contaminação bacteriana, pois, à medida que a concentração de antibiótico foi elevada, reduziu-se a contaminação (Figura 1 A-D). As informações obtidas no presente trabalho corroboram Biasi (1995) que no cultivo *in vitro* de gemas de abacateiro, usando o antibiótico cloranfenicol na concentração de 50 mg L⁻¹ obteve redução de contaminação. Héctor et al. (2005) ao utilizar 2,5 mg L⁻¹ de cloranfenicol observaram que a adição deste antibiótico ao meio de cultura foi necessária para o controle de microrganismos no cultivo *in vitro* de *Menta arvensis* L. e obtiveram 60% de explantes isentos de contaminação.

Segundo Guimarães, Monesso e Tallarico (2010) o cloranfenicol apresenta grande eficiência no controle de microrganismos. De acordo com estes autores, que o cloranfenicol se liga à subunidade 30S dos ribossomos, inibindo o movimento dos mesmos ao longo do mRNA, provavelmente pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica.

Em relação à oxidação, houve diferença estatística significativa entre os tratamentos avaliados. Foi observado a maior porcentagem de explantes oxidados, no tratamento com 300 mg L⁻¹ de Cloranfenicol (Figura 2 A) sendo, 13% para *A. sisalana* e 56,5 % para o híbrido 11648 (Tabela 2 e Figura 1E-F)

Os dados obtidos estão de acordo com Pereira e Fortes (2003), que obtiveram resultados semelhantes com relação à fitotoxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de explantes de batatas e relataram que a adição de ampicilina sódica ao meio de cultura não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes, mesmo nas mais altas concentrações (300 mg L⁻¹), com cerca de 100% de sobrevivência dos explantes após 21 dias de cultivo.

Pereira, Correia e Boliani (2011), verificaram resultados semelhantes para *musa sp* 'Mysore', quando foi utilizado os antibióticos ampicilina e cloranfenicol na concentração de 20 mg L⁻¹ e, obtiveram taxas de 100% de explantes oxidados, porém, a oxidação não causou grandes danos aos explantes permitindo assim o

estabelecimento normal dos mesmos. Entretanto, Palu et. al. (2011), em seus trabalhos de micropropagação de *Ficus caribaea* L., quando utilizou cloranfenicol na concentração 30 mg L^{-1} obtiveram 30,82 % de explantes oxidados. Esta ação também foi relatada por Marinho et. al. (2011) que utilizando o cefalexina na concentração 200 mg L^{-1} em trabalhos com *Lippia gracilis* observaram que, apesar desta concentração ter favorecido a desinfestação de explantes, ela comprometeu a morfogênese dos explantes, assim, o autor conclui que a utilização de antibiótico no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* Schauer apresentou efeito fitotóxico, sendo indicado somente em casos extremos.

De acordo com Leifert e Woodward (1998), a ação fitotóxica do cloranfenicol pode está relacionado com o fato deste antibiótico possuir a capacidade de inibir a síntese de proteínas, afetando o desenvolvimento de mitocôndrias e cloroplastos.

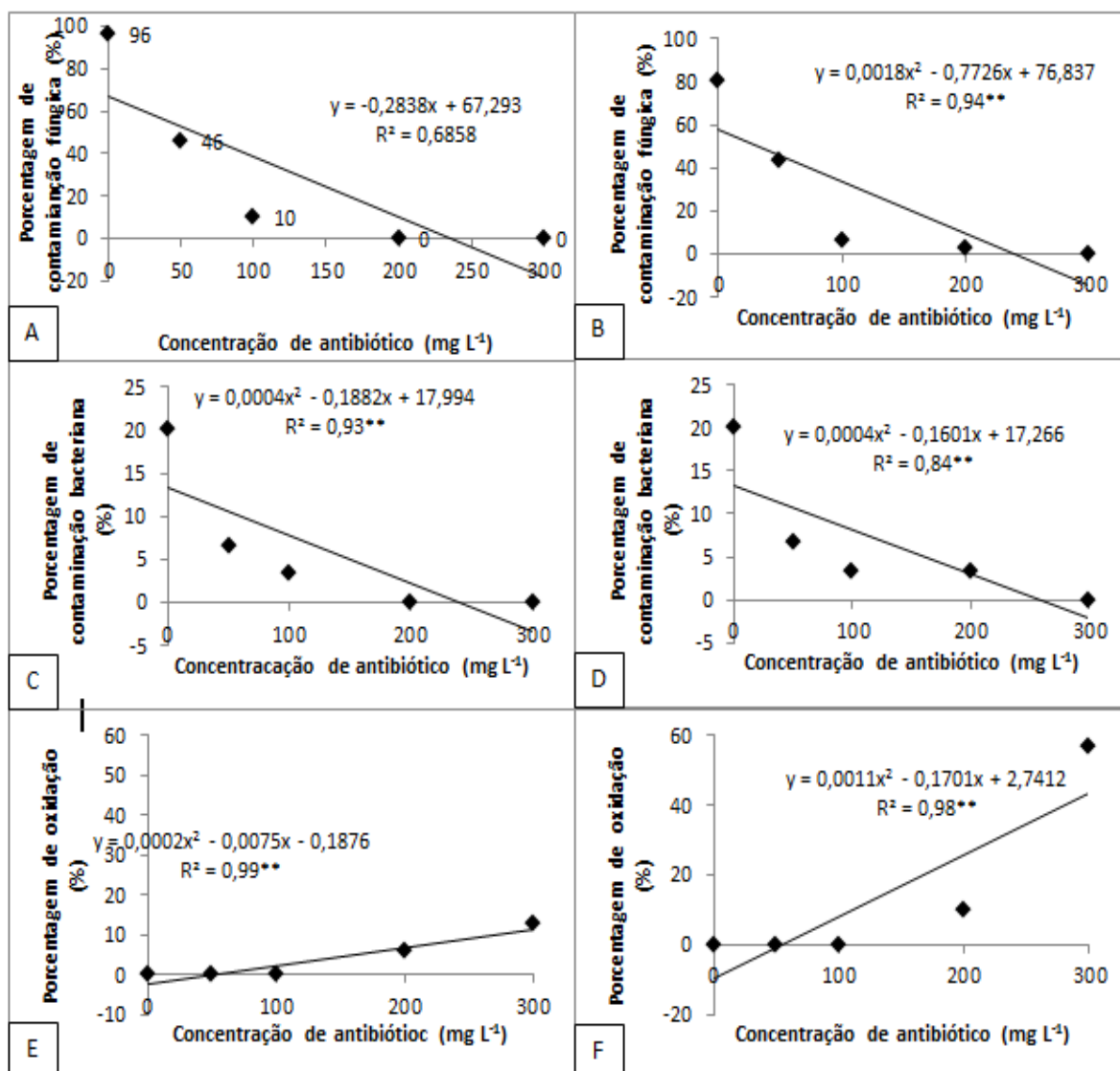


Figura 1. Porcentagem de contaminação fúngica em explantes de *Agave sisalana* (A); Porcentagem de contaminação fúngica em explantes de híbrido 11648 (B); Porcentagem de contaminação bacteriana em explantes de *Agave sisalana* (C); Porcentagem de contaminação bacteriana em explantes de híbrido 11648 (D); Porcentagem de oxidação em explantes de explantes de *Agave sisalana* (E); Porcentagem de oxidação em explantes de híbrido 11648.

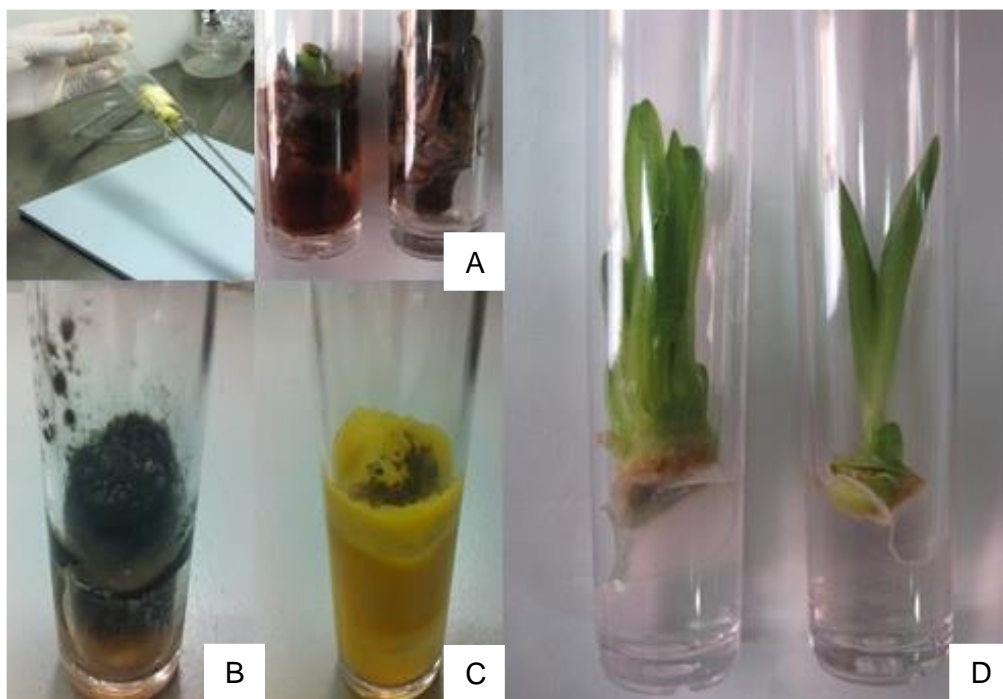


Figura 2 – A). Explantes oxidados de *A. sisalana* e híbrido 11648; B). Explante com presença de fungos; C). Explante com presença de bactéria; D). Explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648 aos 30 de cultivo em meio MS sem contaminação.

CONCLUSÕES

A utilização de solução de Carbendazim a 0,2 % por 10 minutos foi eficiente para a desinfestação de explantes de *Agave sisalana*, para o híbrido 11648 a utilização de solução de Carbendazim a 0,2% por 20 minutos apresentou melhores resultados.

A adição de Cloranfenicol ao meio de cultura na concentração de 200 mg L⁻¹ apresentou melhores resultados no controle da contaminação *in vitro* para *Agave sisalana*, para o híbrido 11648 a concentração de 100 mg L⁻¹ foi mais eficiente.

REFERÊNCIAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2010.

- BIASI, L.A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251-256, 1995.
- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNING, J.; Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden x *Eucalyptus dunii*. **Revista Árvore**, Viçosa. v. 33, n.1, p. 11-19, 2009.
- CARNEIRO, M. F.; SILVA, G. D. da; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I.F.; BIRGES, J. D.; Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (Musa AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n.1, p. 29-35, 2000.
- CONAB**, Companhia Nacional de Abastecimento, Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Fibras Naturais - 11ª Reunião Ordinária - 06/04/2015 Brasília - DF, 2015.
- COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J.A. P. de ; Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- COSTA, M. R.; CAVALHEIRO, J. C. T.; GOULART, A. C. P. MERCANTE, F. M.; Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa phytopathology**, Botucatu, v.39, n.3, p.186-192, 2013.
- DODDS, J.H. e ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge University Press, p. 232, 1985.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht. Springer, v.1, p.1-28, 2008.

GONCALVES, A.H.; A.S. PEREIRA, A. S.; SANTOS, R. S.; GUIMARÃES, L. G. L.; Atividade fungitóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e de seus constituintes majoritários no controle de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1007-1015, 2015.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, EMBRAPA-CNPH, p. 99-169. 1990.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T.; . Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 667-679, 2010.

HECTOR, E.; BARRÓN, M. L.; GODOY, L.; DÍAZ, B.; H.; MARIA, T.; A Un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). **Cultivos Tropicales**, Mayabeque, v. 26 p. 69-71. 2005.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em 09 de dezembro de 2016.

KULUS, D.; ZALEWSKA, M.; Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species: a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam. v. 168, p. 88-107, 2014.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 83-88, 1998.

MARINHO, M.J.M.; Albuquerque, C.C.; Morais, M.B.; Souza, M.C.G.; Silva, K.M.B.; Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu , v. 13, n. 2, p. 246-252, 2011 .

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with Tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino Unido. v.15, p. 473-497, 1962.

PALU, E.G.; CORRÊA, L. de S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C.; Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 587-592, 2011.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G.R.L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de batata em meios semissólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1273-1279, 2003.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, volume especial, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desisfestation *in vitro* of banana 'farta velhaco'(sub gruop AAB)' diferentes concentrations ative choro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.28, n.4, p.64-69, 2015.

PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D. VICENTE, A.; Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, Reino Unido. v. 22, p. 187-193, 2011.

PULDEKO, K.; MADRZAK, C. J. Influence of fungicide Funaben on nodulation of soybean in the field conditions. **Journal of Plant Protection Research**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 155-159, 2004.

QUEIROZ, S. R. de O. D., RIOS, A. P. de S.; SANTANA, J. R. F. de; OSUNA, J. T.A.; NEPOMUCENO, C. F.; RODRIGUES, A. C. C.; Estabelecimento *in vitro* de sisal (*Agave sisalana* Perrine): I. controle da contaminação e oxidação.

Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 18, n. 3, p. 130-139. 2006.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SCORTICHINI, M.; CHIARIOTTI, A.; *In vitro* culture of *Prunus persica* var. Laevis Gray (nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulturae**, Bélgica. v. 225, p. 109-118. 1988.

SILVA, J. T. S.; DOUNG, T. N.; TANAKA, M.; FUKAI, SEIJCHI. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 97, p. 397-410, 2003.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G.S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v.21, p.1175-1182, 2003.

WHEELER, I.E.; KENDAL, S. J.; BUTTERS, J.; HOLLOMON, D. W.; HALL, L.; Using allele-specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *hynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, Alemanha. v.43, p.201-209, 1995.

ARTIGO 2

INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM *Agave sisalana* E HÍBRIDO 11648

INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM *Agave sisalana* E HÍBRIDO 11648

RESUMO - O Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo, no entanto, a cultura de sisal vem sofrendo forte impacto devido à escassez de técnicas de propagação eficientes. Este trabalho tem como objetivo estabelecer protocolo de indução de brotações *in vitro* através de rebentos de *Agave sisalana* e híbrido 11648. Foram realizados dois experimentos, no primeiro, explantes caulinares com aproximadamente 3 cm, oriundos de plantas de *Agave sisalana* e híbrido 11648 foram desinfestados e posteriormente incubados em meio MS suplementado 0,013; 0,026; 0,039 e 0,053 mM de benzilaminopurina (BAP) e 0 ou 0,001 mM de ANA. Após 30 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio cultura contendo as mesmas concentrações de BAP e ANA, onde permaneceram por mais 30 dias. Ao final deste período foi avaliado o número de brotos/explante, comprimento das brotações (cm), número de raízes e comprimento das raízes (cm). No segundo experimento, brotações de *A. sisalana* e do Híbrido 11648 com aproximadamente 3 cm de comprimento foram seccionadas na região basal, retirando-se discos do segmento com 0,5 cm, foram incubados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS suplementado com 0,00; 0,013; 0,026; 0,039 e 0,053 mM de benzilaminopurina (BAP), onde permaneceram por mais 30 dias. Ao final de 90 dias foi avaliado o número de brotos/explante, comprimento das brotações (cm), número de raízes e comprimento das raízes (cm). Para os dois experimentos, foi verificado que dentre os tratamentos estudados, as maiores taxas de multiplicação foram obtidas nos tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de BAP, independente da presença de ANA.

Palavras chave: Organogênese. Citocinina. Auxina.

INDUCTION OF SHOOTS IN *Agave sisalana* AND HYBRID 11648

ABSTRACT - Brazil is the largest producer and exporter of sisal in the world, however, sisal culture has not been strongly impacted due to a lack of efficient propagation techniques. The objective of this work was to establish a protocol for the induction of shoots *in vitro* through shoots of *Agave sisalana* and hybrid 11648. Two experiments were carried out in the first, calcular explants of approximately 3 cm from *Agave sisalana* and 11648 hybrids were disinfested and Subsequently incubated in MS supplemented with 0.013; 0.026; 0.039 and 0.053 mM benzylaminopurine (BAP) and 0 or 0.001 mM ANA. After 30 days, the explants were transferred to a new culture medium containing the same concentrations of BAP and ANA, where they remained for another 30 days. At the end of this period the number of shoots / explants, length of shoots (cm), number of roots and length of roots (cm) were evaluated. In the second experiment, shoots of *A. sisalana* and Hybrid 11648 approximately 3 cm in length were sectioned in the basal region, discs were removed from the segment with 0.5 cm, incubated in test tubes containing 15 mL of supplemented MS medium With 0.00; 0.013; 0.026; 0.039 and 0.053 mM benzylaminopurine (BAP), where they remained for another 30 days. At the end of 90 days the number of buds/explants, shoot length (cm), number of roots and length of roots (cm) were evaluated. For the two experiments, it was verified that among the treatments studied, the highest multiplication rates were obtained in the treatments with 0.039 and 0.053 mM BAP, regardless of the presence of ANA.

Keywords: Organogenesis. Cytokinin. Auxina.

INTRODUÇÃO

As espécies de sisal (*Agave L.*) são importantes por apresentarem grande potencial para a produção de fibra, bem como podem ser cultivadas para fins ornamentais (SOMERVILLE et al., 2010). A cultura também tem sido considerada como matéria-prima para obtenção de bioenergia, energia quimicamente armazenada na biomassa, devido à alta produção de biomassa celulósica (DEBNATH et al., 2010; GARCIA-MOYAE et al., 2011.; JAOUADI et al., 2011), associada a alta eficiência no uso da água, cerca de três a seis vezes mais do que qualquer das culturas candidatas atuais para biomassa (DAVIS et al. 2011).

O uso da biomassa para energia cresce em importância para o desenvolvimento de uma indústria baseada em matérias primas renováveis. Além dos biocombustíveis já conhecidos, um fluxo de inovações em desenvolvimento pode estar lançando as bases de uma indústria integrada de exploração da biomassa (COUTINHO e BONTEMPO, 2011).

A cultura do sisal é eminentemente tropical, adaptada para terras marginais de baixa fertilidade, apresenta resistência a seca por ser uma planta semixerófila e requer clima quente e grande luminosidade para o seu desenvolvimento (SOMERVILLE et al., 2010). Adaptou-se perfeitamente à região semiárida do Nordeste do Brasil, ocupando uma extensa área de solos pobres com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas. Área que além do estado da Bahia envolve também os estados da Paraíba e Rio Grande do Norte (SUINAGA et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de fibra de sisal, com produção de 138.008 toneladas, sendo o estado da Bahia responsável por 95,7% (132.078 toneladas) da produção brasileira (IBGE, 2016). A produção se concentra na região denominada “região sisaleira” a qual envolve 68 municípios (SEAGRI, 2016), por meio de uma cadeia produtiva que abrange desde os trabalhos de manutenção das lavouras (baseados na mão-de-obra familiar), extração e processamento da fibra para o beneficiamento, bem como atividades de industrialização de diversos produtos e seu uso para fins artesanais.

Ainda que o sisal apresente um papel de grande importância no país, pouco são as ferramentas biotecnológicas voltadas ao melhoramento da cultura, seja sob o ponto de vista para a obtenção de genótipos ricos em fibras ou com

maior potencial para a utilização como bioenergia, ou até mesmo como estratégia de conservação, dada a velocidade com que a região semi-árida vem sendo degradada. O que tem levado nos últimos anos, queda na área plantada e na produtividade.

Assim a cultura de tecidos consiste em uma alternativa factível para melhorar o padrão das mudas de sisal tanto em qualidade fitossanitária quanto em quantidade, o que permitirá ampliar novas áreas de plantio, e/ou recuperar as já existentes. Além do que, o estabelecimento de um protocolo de regeneração de planta ser um pré-requisito para muitas tecnologias de manipulação *in vitro*, tais como a indução de mutação, seleção, regeneração de cultivares oriunda de programas de melhoramento genético, estabelecimento de bancos de germoplasma e engenharia genética, ampliando a base de tecnologia a ser aplicada em benefício para a cultura (GUERRA et al., 2010).

Há relatos de varias rotas morfogênica para a regeneração *in vitro* do sisal, (MONJA-MIO e ROBERT, 2013; ZHANG et al., 2013; CARNEIRO et al., 2014; CHEN et al., 2014) em que a porcentagem de brotos e/ou embriões formados são incipientes, variando de 2 a 18 brotações, quando do processo da organogênese ou entre 1 a 8 embriões, salvo algumas exceções a depender do genótipo, quando da embriogênese somática.

Estudos têm demonstrado que cada uma das espécies de *Agave* requer concentrações e combinações particulares de reguladores vegetais, bem como as respostas são espécie específica consequentemente, protocolos de micropropagação confiável devem ser estabelecidos para as diversas espécies de *Agave*.

Neste sentido, o objetivo desta proposta foi de estabelecer um protocolo de indução de brotações em *Agave sisalana* e do híbrido 11648 em função da combinação de reguladores vegetais e tipos de explantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, rebentos de *A. sisalana* e do híbrido 11648 foram coletadas no município baiano de Conceição do Coité, Bahia, Brasil. Para desinfestação, rebentos de sisal com aproximadamente 25 a 30 cm de altura, foram lavados em água corrente, seguido da remoção das folhas de

acordo com sua filotaxia e seccionados a 5 cm de altura do seu tamanho original. Estes foram colocados em solução de água destilada autoclavada contendo 0,5% de Tween 20 por 5 minutos, seguida da imersão em etanol a 70% por 2 minutos, após, submersão em solução contendo hipoclorito de sódio a 0,25% e água destilada autoclavada (2:1) por 20 minutos, e por fim, imersão em solução contendo o fungicida carbendazim a 3% por 30 minutos, seguida de cinco lavagens com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Após esse procedimento foi utilizado dois tipos de explantes diferentes, tendo-se realizado dois experimentos separadamente. Para o experimento 01 foi utilizado como explante de partida segmento do pseudocaule com aproximadamente 3 cm de altura e no experimento 02 o explante de partida foi discos com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro.

Para ambos os experimentos os explantes foram incubados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de Phytigel[®], 0; 0,013; 0,026; 0,039 e 0,053 mM de benzilaminopurina (BAP) e 0 ou 0,001 mM de ANA, em todas as combinações. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem à temperatura de 120°C por 15 minutos

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 60µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5X), sendo cinco concentrações de BAP e duas de ANA. Cada tratamento foi composto por 20 repetições. Cada repetição foi constituído de 1 explante por tubo de ensaio.

Após 30 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para um novo meio cultura contendo as mesmas concentrações de BAP e ANA, onde permaneceram por mais 30 dias. Ao final deste período foi avaliado o número médio de brotos/explante, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio das raízes (cm).

Para a avaliação da eficiência dos tratamentos para indução da multiplicação, foi determinado o índice de capacidade de formação de brotos calculado de acordo com a Vanegas et al (2002), onde:

$$CFB = \frac{NMB \times (\% ERB)}{100}$$

CFB: capacidade de formação de brotos;

NMB: número médio de brotações por explantes;

% ERB: porcentagem de explantes responsivos para a formação de brotos.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 (FERREIRA, 2011) e as médias analisadas por regressão ou comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, para os dados quantitativos e qualitativos, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Organogênese em segmento de pseudocaule de *Agave sisalana* e híbrido 11648

Foi observada a formação de brotações em todos os tratamentos, dentre estes, observa-se que, para os dois genótipos, as maiores taxas de indução de brotações foram obtidas para os tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de BAP, como média de 1 brotação por explante, independente da presença ANA (Tabela 1).

Resultados superiores aos observados neste trabalho foram reportados por Angeles-Espino et. al. (2012) para *Agave tequilana* A. Weber, onde, se obteve média de 6 brotações por explante utilizando-se 0,043 mM de BAP, porém, os autores relatam que, apesar desta concentração ter proporcionado o maior número médio de brotos por explante, estes apresentaram características anormais morfológicamente, como, brotos pequenos sem raiz e/ou em pequena quantidade. Do mesmo modo, Chen et al., (2014) relataram uma média de 14 brotações por segmento de pseudocaule de *Agave americana* L. quando os explantes foram cultivados em meio suplementado com 0,013 mM de BAP. Gariga et. al. (2010) utilizando a combinação de 0,004mM de BAP e AIB encontraram resultados semelhantes a este trabalho, com média de 1,9 brotações por explantes para *Agave fourcroydes* Lem.

Provavelmente, neste trabalho o balanço hormonal foi insuficiente para a indução de brotações. Segundo Taiz et. al. (2013) diversas espécies vegetais possuem predominância de dominância apical regulada por auxinas endógenas

produzidas na parte aérea, o que sugere a utilização de concentrações mais elevadas de BAP para a indução de brotações adventícias em segmento de pseudocaule de *A. sisalana* e híbrido 11648.

Tabela 1. Número médio de brotações por explante de *A. sisalana* e híbrido11648 em diferentes concentrações de BAP e ANA.

BAP (mM)	Número médio de brotações/explante			
	<i>Agave sisalana</i>		Híbrido 11648	
	ANA (mM)		ANA (mM)	
	0,000	0,001	0,000	0,001
0,000	0,00cA	0,05cA	0,05cA	0,15cA
0,013	0,10cA	0,25cA	0,25cA	0,30cA
0,026	0,25cA	0,40cA	0,35cA	0,45bcA
0,039	0,80abA	0,95abA	0,80abB	1,00aA
0,053	1,05aA	1,15aA	1,20aA	1,25aA
	CV=54%		CV=70%	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para a variável altura das brotações, foi observado que o híbrido foi estatisticamente superior a *A. sisalana*, para os tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de BAP e independente da presença de ANA, verificando-se um comportamento crescente, pois à medida que se aumentou a concentração de BAP, houve o aumento do comprimento das brotações (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de brotações por explante de *A. sisalana* e híbrido11648 em diferentes concentrações de BAP e ANA.

BAP (mM)	Altura média de brotações			
	<i>Agave sisalana</i>		Híbrido 11648	
	ANA (mM)		ANA (mM)	
	0,000	0,001	0,000	0,001
0,000	0,00cA	0,16cA	0,10dA	0,62dA
0,013	0,27cA	1,20bA	0,85cA	1,27cdA
0,026	0,97bA	1,40bA	1,67bA	2,06bcA
0,039	2,62aB	2,60aB	3,62aA	4,19aA
0,053	2,76aB	3,08aB	4,72aA	4,06aA
	CV=11%		CV=6%	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Estes resultados vão a confronto com a maioria dos trabalhos da literatura. Este comportamento, provavelmente, deve-se ao fato de algumas espécies apresentarem grande atividade de auxinas endógenas, assim, estas

auxinas quando aliadas às citocininas, podem causar um incremento da parte aérea. Segundo Silveira et al., (2013) em trabalhos com *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez, observaram que, a medida que foi adicionado BAP ao meio de cultura, promoveu maior número de brotações, entretanto os brotos eram pequenos e com poucas raízes formadas. O mesmo resultado foi relatado por Almeida et al. (2002) em *Ananas comosus* L. Merr, que verificam a diminuição do número de brotações ou a ausência total de brotações para concentrações maiores que 0,013 Mm de BAP. Kerbauy (2008) afirma que as citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas com a diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares. Este dado revela a forte ação do balanço auxina/citocinina insuficiente para promover a formação satisfatória de raízes juntamente com a formação de brotos.

Foi verificada a formação de raízes em todos os tratamentos estudados neste trabalho, mesmo nos tratamentos isento de fitorregulador (Tabela 3). O aumento das concentrações de BAP foi um fator limitante para o desenvolvimento das de raízes, pois, à medida que se aumentou a concentração desta citocinina, diminuiu o número médio de raízes por explantes e o comprimento das raízes (Tabela 4).

Tabela 3. Número médio de raízes por explante e comprimento de raízes de *A. sisalana* e híbrido11648 em diferentes concentrações de BAP.

BAP (mM)	Número médio de raízes por explante			
	<i>Agave sisalana</i>		Híbrido 11648	
	ANA (mM)		ANA (mM)	
	0,000	0,001	0,000	0,001
0,000	1,29aA	1,38aA	1,43aA	1,49aA
0,013	1,21aA	1,35aA	1,23aA	1,37aA
0,026	0,92bA	1,00aA	1,06bA	1,06abA
0,039	0,79bA	0,94aA	0,92bA	0,94cA
0,053	0,70bA	0,75bA	0,72cA	0,82dA
	CV=25%		CV=21%	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Normalmente o BAP tem a função de indução brotações laterais, inibindo a dominância apical e podendo comprometer o crescimento de raízes. Ben-Jaacov et al., (1991) afirmam que fatos como estes confirmam a teoria de que as

citocininas inibem ou atrasam a formação de raízes. Silva et al., (1998) obtiveram resultados semelhantes em *Ananas comosus* L. Merr e *Aechmea bambusoide* L.B. Smith e Reitz, quando ao estudarem a influência do BAP na proliferação *in vitro* dessas espécies, verificaram que o aumento nas concentrações desse regulador ocasionou redução no número de raízes.

Tabela 4. Comprimento de raízes de *A. sisalana* e híbrido11648 em diferentes concentrações de BAP.e ANA.

BAP (mM)	Comprimento de raízes			
	<i>Agave sisalana</i>		Híbrido 11648	
	ANA (mM)		ANA (mM)	
	0,000	0,001	0,000	0,001
0,000	1,06abB	1,83aA	2,92aA	2,62aA
0,013	1,07abA	1,44abB	1,28bA	2,56aA
0,026	0,40bcA	0,85bcA	0,65bcA	1,01bcA
0,039	0,18cA	0,75bcA	0,45bcA	0,56cA
0,053	0,50cA	0,10cA	0,06cA	0,32cA
	CV=7,9%		CV=10%	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Muitos estudos têm mostrado que as citocininas controlam vários aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo: divisão celular, retardamento da senescência de folhas, através da mobilização de nutrientes, dominância apical, quebra de dormência de gemas e desenvolvimento de flores. Dentre estes, o controle da divisão celular é de considerável significância para o crescimento e desenvolvimento da planta e foi graças a este efeito que se identificou esta classe de regulador.

De acordo com os resultados obtidos para o índice de capacidade de formação de brotações (Tabela 5), os tratamentos com 0,053 mM de BAP e 0,001 mM de ANA mostraram melhores resultados para os dois genótipos, sendo 0,083 para híbrido 11648 e 0,053 para *A. sisalana*, apesar disso, estes valores indicam que os explantes utilizados apresentaram baixa capacidade de formação de brotações.

Tabela 5. Porcentagem de explantes que formaram brotações (%EFB), número médio de brotações por explante (NMBE) e capacidade de formação de brotações (CFB) em explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648 e, em função de diferentes concentrações de BAP e ANA.

Genótipo	Regulador (mM)		% EFB	NMBE	CFB
	BAP	ANA			
<i>Agave sisalana</i>	0,000	0,000	0,0	0,00	0,000d
	0,013	0,000	2,2	0,10	0,002d
	0,026	0,000	2,2	0,25	0,006d
	0,039	0,000	2,2	0,80	0,018c
	0,053	0,000	2,2	1,05	0,023c
	0,000	0,001	2,2	0,05	0,001d
	0,013	0,001	2,2	0,25	0,006d
	0,026	0,001	2,2	0,35	0,008d
	0,039	0,001	4,4	0,80	0,035b
	0,053	0,001	4,4	1,20	0,053a
Híbrido 11648	0,000	0,000	2,2	0,05	0,001d
	0,013	0,000	2,2	0,25	0,006d
	0,026	0,000	2,2	0,40	0,009d
	0,039	0,000	4,4	0,95	0,042b
	0,053	0,000	4,4	1,15	0,051b
	0,000	0,001	2,2	0,15	0,003d
	0,013	0,001	4,4	0,30	0,013d
	0,026	0,001	6,6	0,45	0,030c
	0,039	0,001	4,4	1,00	0,044b
	0,053	0,001	2,2	0,05	0,001d

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Organogênese em disco de segmento de pseudocaule

Para os dois genótipos estudados foi observado a formação de brotações em todos os tratamentos (Figura 1). Dentre os dois genótipos, observa-se que o híbrido 11648 apresentou maior taxa de regeneração de brotações, com média de 8,49 e 7,93 brotações por explante para híbrido 11648 e *A. sisalana*, respectivamente (Tabela 6).

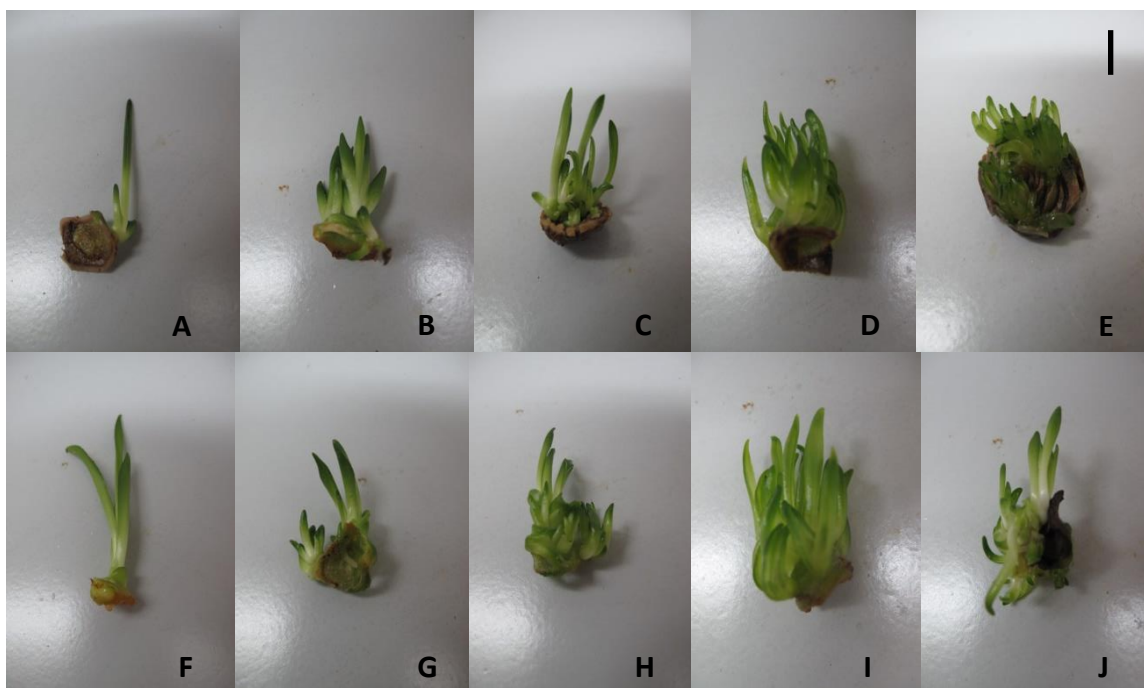


Figura 1. Brotações de híbrido 11648 cultivadas em meio MS suplementado com 0,000 (A), 0,013 (B), 0,026 (C) 0,039 (D) e 0,053 mM de BAP(E). Brotações de *Agave sisalana* cultivadas em meio MS suplementado com suplementado com 0,000 (F), 0,013 (G), 0,026 (H) 0,039 (I) e 0,053 mM de BAP(J), (Barra: 1cm).

Tabela 6. Número médio de brotações por explante em diferentes concentrações de BAP após 60 dias, em *A. sisalana* e híbrido 11648.

Genótipo	BAP (mM)					CV
	0,000	0,013	0,026	0,039	0,053	
<i>A. sisalana</i>	1,11cA	6,11bA	9,39aA	11,04aA	10,49aB	59%
Híbrido	1,09dA	6,77cA	10,03bA	10,12bA	14,48aA	43%

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O aumento das concentrações de citocinina promoveu um comportamento crescente para o número de brotos formados, pois à medida que se aumentou a concentração de BAP, aumentou o número de brotações por

explantes, sendo verificado valor máximo quando se utilizou 0,053 mM de BAP, obtendo-se ao final de 90 dias, 14,8 brotações por explantes para híbrido 11648 e 10,49 para *A. sisalana*.

Resultados semelhantes foram observados por Rosales et al., (2008) que com a combinação de 0,013 mM de BAP com 0,001mM de ANA, proporcionou um número médio de 11 brotações por explante aos 180 dias de cultivo, em plantas de *Agave cupreata* Trel. e A.Berger,. Assim como foi verificado por Braga et al. (2011) no cultivo de *Ananas comosus* var. *erectifolius*, que obtiveram 21 brotações por explante ao utilizar 0,013 mM de BAP. Entretanto, Carvalho et al. (2008) em pesquisas com esta mesma espécie, obtiveram 3,75 brotos/explante quando foi utilizado 0,017 mM de BAP, resultado inferior ao reportado neste estudo. Angeles-Espino et. al. (2012), trabalhando com *A. tequilana*, obtiveram em média 6 brotações por explante ao final de 70 dias de cultivo em meio MS suplementado com 0,043 mM de BAP, resultado este, inferior ao encontrado neste trabalho.

Para a variável comprimento das brotações, independente da espécie, as brotações que apresentaram maiores valores foram observadas no tratamento sem a adição do BAP, havendo diferença significativa, em relação aos demais tratamentos. Para as duas espécies verificou-se um comportamento decrescente, pois à medida que se aumentou a concentração de BAP, ouve uma redução da altura das brotações.

Resultados semelhantes foram observados por diversos autores como Moreira (2001) em abacaxizeiro cv. Pérola; Macêdo et al. (2003) em *Ananas comosus*; Pasqual et al., (2008) em abacaxizeiro ornamental e Nonato et al. (2009) em *Ananas erectifolius*. Silveira et al., (2009) também observaram resultado similar para *Neoglaziovia variegata*, quando foi adicionado BAP ao meio de cultura, promoveu maior número de brotações, entretanto os brotos eram pequenos e com poucas raízes formadas. O mesmo resultado foi relatado por Almeida et. al. (2002) em *Ananas comosus* (L.) Merrill) que verificam a diminuição do número ou a ausência total de raízes para concentrações maiores que 0,006 mM de BAP.

De acordo com a CFB, o melhor tratamento para o híbrido 11648 foi aquele onde o meio foi suplementado com 0,053mM de BAP, resultando o valor de 10,42, porém, para a *Agave sisalana*, os maiores índices foram observados nos

tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de BAP, sendo verificado os índices de 6,95 e 5,45, respectivamente, não sendo observado diferença estatística significativa entre eles (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de explantes que formaram brotações (%EFB), número médio de brotações por explante (NMBE) e capacidade de formação de brotações (CFB) em explantes de *A. sisalana* e híbrido 11648 em função de diferentes concentrações de BAP.

Genótipo	BAP (mM)	% de EFB	NMBE	CFB
<i>A. sisalana</i>	0,000	3,3	1,11	0,03d
	0,013	16	6,11	0,97d
	0,026	22	9,39	2,06c
	0,039	63	11,04	6,95a
	0,053	72	14,48	10,42a
Híbrido	0,000	3,3	1,09	0,03d
	0,013	42	6,77	2,84c
	0,026	45	10,03	4,51b
	0,039	56	10,12	4,55b
	0,053	72	14,48	10,42a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A combinação entre os dois valores deste índice pode fornecer uma ideia sobre a melhor condição para a regeneração de plantas. A porcentagem de explantes formando brotações representa a capacidade de resposta do tecido e o número médio de brotações por explante representa a capacidade dos explantes de produzirem brotos.

Tanto para número de raízes, quanto para comprimento de raízes, foi observada a redução dos valores quando foi adicionado BAP, independente do genótipo avaliado (Tabela 8 e 9). Este dado evidencia a forte ação do BAP na indução das brotações e um balanço auxina/citocinina insuficiente para promover a formação satisfatória de raízes juntamente com a formação de brotos.

O efeito inibitório das citocininas na rizogênese é relatado por diversos autores, em *Lens culinaris* Medik (KHAWAR et al 2004), *Cajanus cajan* (L) Hunth (EAPEN et al. 1998) entre outras espécies. Esses efeitos podem ser explicados pelo fato do BAP alterar o metabolismo de citocininas naturais, favorecendo o aumento do teor endógeno das mesmas (MOK et al., 1987). Silva et al. (2002) também relataram resultados semelhantes em abacaxizeiro, quando ao estudarem a influência do BAP na proliferação *in vitro* dessas espécies,

verificaram que o aumento nas concentrações desse regulador ocasionou redução no número de raízes.

Tabela 8. Efeito do BAP no número e comprimento médio de raízes de *A. sisalana* e híbrido 11648.

BAP (mM)	Número de raízes	
	<i>Agave sisalana</i>	Híbrido 11648
0,000	4,22aA	4,10aA
0,013	2,73bA	2,82bA
0,026	2,19bA	2,21bA
0,039	2,34bA	2,17bA
0,053	2,40bA	2,23bA
	CV=24%	CV=26%

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 9. Efeito do BAP no comprimento médio de raízes de *A. sisalana* e híbrido 11648.

BAP (mM)	Número de raízes	
	<i>Agave sisalana</i>	Híbrido 11648
0,000	3,57aA	5,93aA
0,013	2,46bA	2,67bA
0,026	2,68bA	2,50bA
0,039	2,90bA	2,78bA
0,053	2,90bA	3,12bA
	CV=25%	CV=13%

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

A indução de brotações adventícias em segmento de pseudocaule de *Agave sisalana* e híbrido 11648 foi mais eficiente nos tratamentos 0,039 e 0,053 mM de BAP, independente da adição de auxina;

Os tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de BAP mostraram maior eficiência na indução de brotações em disco de segmento caulinares de *Agave sisalana* e híbrido 11648.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. v. 26, n. 1,24: 296-300, 2002.

ANGELES-ESPINO, A.; et al. Micropropagation of *Agave* (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) through axillary buds. **Tropical and subtropical agroecosystems**. México. v.15, n. 3, 2012.

BEN-JAACOV, J.; ACKERMAN, A.; TAL, E.; JACOBS, G. Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. **HortScience**, Estados Unidos da América. v.26, n.2, p.74-75, 1991.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. DE, RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. E VALENTE, T. C. T., Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.5, p. 863-868. 2011.

CARNEIRO, F. S.; QUEIROZ, S. R. O. D. PASSOS, A. R.; NASCIMENTO, M. N.D.; SANTOS, K. S. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 294-303, jul./set. 2014.

CARVALHO, J.M.F.C., Técnicas do cultivo *in vitro* no sisal, Campina Grande: **Embrapa Algodão**, Documentos, 208, 2008.

CHEN, Y. CHEN, X., TRIGIANO, R. N. Micropropagation of *Agave americana*. **HorticScience**. Estados Unidos da América. v. 49, p. 320–327, 2014.

COUTINHO, P.L.A.; BOMTEMPO, J.V. Uso de roadmaps tecnológicos para favorecer o ambiente de inovação: uma proposta em matérias primas renováveis. In: **SIMPOI**, 2010.

DEBNATH, M.; PANDEY, M.; SHARMA, R.; THAKUR, G.S.; LAL, P. Biotechnological intervention of *Agave Sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plant Research**. Palo Alto. v. 4,p.177–187, 2010.

EAPEN, S. et al. Thidiazuron induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, n.6, p.217-220, 1998.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GARCIA-MOYAE, E.; ROMERO-MANZANARES, A. ; NODEL, P.S. Highlights for Agave productivity. **GCB Bioenergy** Malden. v. 3, p.4–14, 2011.

GARRIGA-CARABALLO, M.; et al. Management of Auxin-Cytokinin Interactions to Improve Micropropagation Protocol of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem). **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chíllan. vol.70, n.4, p. 545-551. 2010.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology. **Humana Press**, New Jersey. Springer, v.589, p.47-66, 2010.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em 09 de dezembro de 2016.

JAOUADI, M.; MASHLI, S.; SAKLI, F. A study of the physical and mechanical properties of paper made from *Agave americana* L. fibers. **Mater. Manufacturing Process**. v. 26, p. 567–572, 2011.

KHAWAR, K.M. et al. Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. **Turkish Journal Botany**, Ankara. v.28, p.421-426, 2004.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p., 2008.

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

MONJA-MIO, K. M.; ROBERT, M.L. L. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**.v. 49,p.541–549, 2013.

MOREIRA M.A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola**. Lavras: UFLA. 81p. . 2001 (Tese doutorado).

MOK, M.C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, v.22, n.6, p.1194-7, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino Unido. v.15, p. 473-497,1962.

NONATO, C. V. F.; LAMEIRA, O. A.; SILVA, G. M. Efeito do BAP no subcultivo *in vitro* de brotos de curauá (*Annanas erectifolius* L. B. Smith). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATU-2009>.

OSALES, M. S. D. et al. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conser vación de espécies del gênero *Agave*. **Invest. cienc.** Barcelona, v. 41, p. 53-62, 2008.

SEAGRI. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura<http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/3_comunicacao01v9n1.pdf>. Acesso em: 13 abril 2016.

SILVA, A. B. et al. Aclimatação de brotações de abacaxi (*Ananas comusis* L.)

produzidas *in vitro*: ação de Agromix, húmus e Kelpak. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 4, n. 2, p. 107-110, 1998

SILVEIRA, D. G; AMORIM, E. P.; JESUS, O. N. DE, SOUZA, F. V. D.; PESTANA, K. N.; SANTOS, V. DE J.; SANTANA, J. R. F. DE; Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, p. 544-553, 2013.

SOMERVILLE, C.; YOUNGS, H.; TAYLOR C.; DAVIS, S.C.; LONG, S. P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science**. v. 329, p. 790–792, 2010.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. A história do sisal no Brasil. In: ANDRADE, Wilson. (Org.). **O sisal do Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS/APEX, 2008, v., p. 16-21.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 918p. 2013.

VANEGAS, P. E.; et al. Plant regeneration via organogenesis in marigold. **Plant Cellular Tissue Organ Culture**. México, v. 69, p. 279–283; 2002.

ZHANG, YAN-MEI ; LI, XIN ; CHEN, ZHI ; LI, JUN-FENG; LU, JUN-YING; ZHOU, WEN-ZHAO. Shoot organogenesis and plant regeneration in Agave hybrid, No. 11648. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam. v.161, p. 30–34, 2013.

ARTIGO 3

PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO *IN VITRO* DE SISAL HÍBRIDO 11648

PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO *IN VITRO* DE SISAL HÍBRIDO 11648

RESUMO – O sisal é um vegetal que apresenta características morfoanatômicas que contribuem para minimizar a perda de água, contudo, estas características morfoanatômicas não são suficientes para favorecer a sobrevivência de mudas micropropagadas durante a fase de aclimatização. Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas morfológicas de plantas micropropagadas do sisal híbrido 11648 durante a fase de pré-aclimatização e aclimatização. Explantes caulinares de sisal híbrido 11648 foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura MS com diferentes concentrações dos sais (50 ou 100%) e de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e vedados com tampa plástica ou fita hipoalergênica micropore®, totalizando 8 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma planta por tubo. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 60 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h. Após 45 dias foram avaliados o número de folhas, comprimento de parte aérea (cm), porcentagem de explantes enraizados (%), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), massa fresca de parte aérea (g), massa fresca de raiz (g), massa seca da parte aérea (g), massa seca de raiz (g) área foliar (cm²) e porcentagem sobrevivência (%). A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose combinada com a concentração de 50% de sais do meio MS favoreceu o crescimento e porcentagem de sobrevivência de plantas do híbrido 11648, independente do tipo de vedação.

Palavras chave: Meio de cultura, Sacarose, Vedação.

IN VITRO PRE-ACCLIMATIZATION OF SISAL HYBRID 11648

ABSTRACT - The *Agave sisalana* is a species whose morphological and anatomical features that contribute to minimize water loss, however, these morphoanatomic characteristics are not sufficient to promote the survival of plantlets during the acclimatization phase. This study aimed to evaluate the morphological responses of micropropagated plants of the hybrid sisal 11648 during the pre-acclimatization and acclimatization. Explants hybrid sisal stem 11648 were transferred to test tubes containing MS media with different concentrations of salts ($\frac{1}{2}$ MS or MS) and sucrose (15 to 30 gL⁻¹) and sealed with a plastic cap or tape hypoallergenic micropore® totaling 8 treatments. Each treatment consisted of 20 repetitions, each repetition consisted of one plant per tube. The cultures were maintained in a growth chamber with temperature of 25 ± 2 ° C, photon flux density 60 μmol m⁻²-s⁻¹ and photoperiod of 16 h. After 45 days were evaluated the number of leaves, length of area, percentage of rooted explants, number of roots, the greater root length, fresh weight of aerial part, fresh weight of root, shoot dry weight, root dry weight leaf and survival area. The concentration of 30 gL⁻¹ sucrose combined with the 50% concentration of MS salts medium favored the growth and survival of the hybrid plants 11648, regardless of the type of seal.

Keywords: Culture media, Sucrose, Fencing.

INTRODUÇÃO

O sisal possui mecanismo fotossintético CAM, pois, apresenta características morfoanatômicas que contribuem para minimizar a perda de água, como a presença de cutícula e folhas modificadas de modo a diminuir a área foliar (CUSHMAN, 2001). Contudo, estas características morfoanatômicas não são suficientes para favorecer a sobrevivência de mudas micropropagadas durante a fase de aclimatização.

De acordo com Srinivasa-Rao et al. (2000), a área foliar e os estômatos são as principais estruturas responsáveis pela manutenção das atividades fotossintéticas, e, após a transferência das plântulas do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* podem ocorrer alterações na morfoanatomia dessas estruturas.

Um dos fatores mais limitantes da micropropagação é a fase de aclimatização. A pré-aclimatização é uma estratégia para reduzir o tempo de aclimatização, é a passagem das plantas por um período de rustificação que consiste no cultivo *in vitro* em condições que visem estimular a transição de heterotrofismo para o autotrofismo (SILVEIRA, 2013). Dentre os mecanismos que visam o controle ambiental *in vitro*, a utilização de sacarose, concentrações de sais e tipo vedação de tubos são estratégias bastante discutidas.

Segundo Kozai (1991), a utilização de sacarose na fase de pré-aclimatização pode limitar o desenvolvimento da capacidade fotoautotrófica das plantas cultivadas *in vitro*, podendo levar a um crescimento reduzido e consequente morte das mudas.

De acordo com Santana et al. (2008) o uso de tampa plástica ou de tampão de algodão favorece trocas gasosas com o ambiente *ex vitro*, estimulando a mudança do modo de crescimento heterotrófico para fotoautotrófico durante a fase de enraizamento, facilitando e diminuindo o tempo de aclimatização.

A composição do meio de cultura pode ser um fator limitante nos processos fisiológicos. Koroch et al., (1997) sugerem que modificações nas concentrações de sacarose e na composição do sais do meio de cultura podem influenciar no metabolismo do carbono e nitrogênio, que são fatores limitantes nos mecanismo de adaptação fisiológica.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas da pré-aclimatização *in vitro* de brotações do sisal híbrido 11648 em diferentes condições de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Como explantes, foram utilizadas brotações de sisal híbrido 11648 com 3,0 cm de altura. Os explantes foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com diferentes concentrações dos sais ($\frac{1}{2}$ MS ou MS) e de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e vedados com tampa plástica (TP) ou fita hipoalergênica micropore[®] 3M (FT). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 60 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2 (concentrações de sais do MS, concentrações de sacarose e tipo de vedação) totalizando 8 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições, sendo que cada repetição composta por uma planta por tubo.

Para as avaliações morfofisiológicas, foram avaliados o número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), porcentagem de explantes enraizados (PE), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), massa fresca de parte aérea (MFA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSA), massa seca de raiz (MSR) e área foliar (AF) e porcentagem de sobrevivência (%).

O NF e NR foram avaliados através da contagem manual. O CPA e CMR foram medidos com o auxílio de régua graduada. As MSA e MSR foram mensuradas através de balança analítica de precisão. Para mensuração das massas secas, as amostras permaneceram em estufa de circulação forçada de ar por 72 horas, a 70 °C até peso constante. A AF foi obtida através do Scanner foliar CI-202 Portable Laser Leaf Area Meter CID Bio-science.

Para avaliação da porcentagem de sobrevivência, após 45 dias, 5 plântulas de cada tratamento foram removidas das condições *in vitro* e tiveram suas raízes lavadas com água destilada para a remoção dos resíduos do meio de cultura, em seguida foram transferidos para bandejas de polipropileno de 200 células, com dimensões de 5x5x9cm, contendo substrato comercial West Garden[®] terra vegetal, onde permaneceram por 45 dias. Após este período, foi avaliada a taxa de sobrevivência de plantas.

As análises dos dados foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da tabela 1, pode-se observar que as maiores médias para o número de folhas, altura de parte aérea e área foliar foram encontradas para os tratamentos com 30 g L⁻¹ de sacarose quando se utilizou fita hipoalergênica micropore®, para a vedação dos tubos. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Santana et al. (2008) que obteve melhores resultados para o crescimento *in vitro* de brotações de *Annona glabra* L. cultivadas em tubos vedados com tampão de algodão. Nepomuceno et al (2009), trabalhando com plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil*, relatam que obtiveram médias 2,25 vezes maior para o número de folhas quando os tubos de ensaio foram fechados com tampa plástica em relação aos tubos que foram vedados com tampa e filme de PVC.

Os resultados obtidos deixam claro que o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose associada ao tipo sistema de vedação com fita micropore® foi fundamental para o crescimento da parte aérea, independente das concentrações de sais do meio de cultura MS. Provavelmente, a vedação dos tubos de ensaio com fita micropore®, proporcionou maior troca gasosa com o meio, agindo de forma positiva para o crescimento de plântulas *in vitro*.

Braga (2011) comparando o sistema de vedação convencional e o ventilado no cultivo *in vitro* de crisântemo, (*Dendrathera glandiflora* cv. Rage), relatam que obtiveram resultados superiores para comprimento da parte aérea, quando as brotações foram cultivadas em tubos com meio de cultura MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e fechados com tampa com ventilação.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1990) a vedação total dos recipientes pode favorecer o acúmulo de gases liberados pela cultura, levando à saturação do ambiente *in vitro* pelo vapor de água, causando posteriormente a diminuição da taxa de transpiração, podendo causar deficiências de minerais nas culturas.

Tabela 1. Número de folhas (NF), altura da parte aérea (ALT) e área foliar (AF) de plantas de híbrido 11648 em função de diferentes condições de cultivo.

Tratamentos	NF	ALT (cm)	AF (cm ²)
Tampa+30g de sacarose+MS	4,4b	4,5b	10,10a
Tampa+30g de sacarose+½MS	3,9b	4,1b	8,94a
Tampa+15g de sacarose+MS	3,7b	5,1b	4,90b
Tampa+15g de sacarose+½MS	2,6c	2,9c	4,69b
Fita+30g de sacarose+MS	6,3a	7,1a	11,75a
Fita+30 g de sacarose+½MS	6,5a	8,3a	10,40a
Fita+15g de sacarose+MS	4,1b	5,3b	5,75b
Fita+15g de sacarose+½MS	3,2b	3,8b	6,05b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para a variável área foliar, todos os tratamentos com 30 g L⁻¹ de sacarose foram estatisticamente superiores aos demais. Skrebsky et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes no cultivo *Pfaffia glomerata* (Spreng.) quando utilizaram concentrações de sacarose maiores que 65 g L⁻¹. Faria et al. (2004) em seus trabalhos com *Dendrobium nobile* Lindl. também verificaram que concentrações mais altas que 59 g L⁻¹ de sacarose influenciaram o crescimento e o acúmulo de biomassa em plântulas cultivadas *in vitro*. Lima et. al. (2000), afirmam que as características genéticas e as condições internas das células podem ser influenciadas pelas fontes de carbono, os quais são vitais para o crescimento e desenvolvimento da área foliar. Provavelmente a sacarose não seja somente utilizada como fonte de carbono pelas plantas *in vitro*, mas esteja ligada ao controle de expressão gênica que regulam o crescimento e desenvolvimento de órgãos. Assim, para a realização da fotossíntese, é necessário obter energia por meio de uma fonte de carbono para que ocorram crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (Fumagali et al, 2008)

Em todos os tratamentos foi verificada a formação de raízes, porém, não houve diferença estatística significativa entre as médias para esta variável (Tabela 2). Estes resultados corroboram Barboza et al., (2004), que, ao trabalhar com o híbrido de abacaxi PExSC-52 em diferentes meios de cultura, tiveram resultados satisfatórios para enraizamento *in vitro* sem que houvesse a necessidade de variação da composição do meio de cultura ou nem a adição de auxinas. Segundo este mesmo autor, algumas espécies possuem a capacidade de produção endógena de auxinas suficiente para induzir o enraizamento. As partes

aéreas são fontes de intensa produção de auxina que, ao serem translocadas para a base, estimulam a formação de raízes (BARCELLO COLL et al., 1988).

Tabela 2. Porcentagem de explantes enraizados (% EE), número médio de raízes (NMR) e comprimento da maior raiz (CMR) de plantas de híbrido 11648 em função de diferentes condições de cultivo.

Tratamentos	%EE	NMR	CMR
Tampa+30g de sacarose+MS	83	8,4b	3,4b
Tampa+30g de sacarose+½MS	89	7,1b	6,1a
Tampa+15g de sacarose+MS	98	5,6c	4,1b
Tampa+15g de sacarose+½MS	100	4,9c	6,8a
Fita+30g de sacarose+MS	81	11a	3,9b
Fita+30 g de sacarose+½MS	87	8,4b	7,0a
Fita+15g de sacarose+MS	88	6,1b	4,8b
Fita+15g de sacarose+½MS	97	5,3c	7,3a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O tratamento com 30 g L⁻¹ sacarose, meio de cultura MS completo no qual se utilizou fita micropore[®] na vedação dos tubos foi estatisticamente superior aos demais, apresentando média de 11 raízes formadas por explante. Este resultado sugere que a interação entre as concentrações mais altas de sacarose e sais do meio de cultura MS juntamente com o sistema de vedação com fita micropore[®], foi favorável para a formação de raízes. Segundo Silveira et al. (2013), a ausência da fonte de carbono pode comprometer a formação e o desenvolvimento do sistema radicular. Estes autores relataram em seus estudos com caroá (*Neoglaziovia variegata*) que a utilização da composição original do meio de cultura MS, associada à utilização de tampões de algodão para a vedação dos tubos foram fundamentais para respostas morfofisiológicas das plântulas micropropagadas de caroá durante a fase de pré-aclimatização *in vitro*.

As maiores médias para comprimento de raízes foram obtidas para os tratamentos cuja composição de sais do meio de cultura MS foi reduzida para 50% da composição original, independente da concentração de sacarose e do tipo de vedação dos tubos (Tabela 2).

Chaves et al. (2004), utilizando diferentes concentrações dos sais do meio MS no enraizamento *in vitro* de explantes de marmeleiro, relatam que a redução dos sais do meio de cultura MS para 75% da sua composição original favoreceu o

enraizamento. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os encontrados por Pereira et al. (1999), que, no cultivo *in vitro* de explantes de morangueiro obteve o maior percentual de explantes enraizados e maior comprimento de raízes quando a concentração dos sais do meio de cultura foi reduzida para 50%.

Segundo Alhama et al. (1998), o crescimento de raízes *in vitro* em meio de cultura MS com a redução de sais e suprimentos limitados de nutrientes como o nitrogênio, podem desencadear o acúmulo de amido nas plantas. O amido acumulado é apontado como indicador das reservas de carboidratos para o posterior crescimento e desenvolvimento de órgãos, incluindo às brotações e raízes.

De acordo com Van Der Werf (1996), a disponibilidade do nitrogênio favorece a alocação de biomassa para raiz e parte aérea. Este autor relata que no cultivo *in vitro* de plântulas de *Allium porrum* L. quando transferidas para meio com a redução da disponibilidade de nutricional, aumentaram rapidamente a taxa de enraizamento.

Os tratamentos com 30 g L⁻¹ de sacarose favoreceram as variáveis peso de matéria fresca e peso de matéria seca, independente da concentração de sais do meio MS e do tipo de vedação dos tubos, sendo estes, estatisticamente superiores aos demais (Tabela 3). Estes resultados corroboram (FILA et al., 2008), que, avaliando diferentes concentrações de sacarose sobre as características morfológicas de plantas micropropagadas de porta-enxertos de videira (*Vitis vinífera* Chasselas x *Vitis berlandieri*, Mill. De Gr.), observaram maior incremento de matéria fresca e seca nos tratamentos com 37,5 g L⁻¹ de sacarose. De acordo com Wainwright (1989), a adição de sacarose nas concentrações entre 20 e 40 g L⁻¹ ao meio de cultura podem otimizar a atividade nutricional através da assimilação de carbono para as culturas *in vitro*. Assim, sugere-se que o desenvolvimento do aparelho fotossintético de plântulas de sisal híbrido 11648 *in vitro* seja dependente da concentração de sacarose no meio de cultura.

Tabela 3. Peso da matéria fresca (PMF) e peso da matéria seca (PMS) em plantas de híbrido 11648 em função de diferentes condições de cultivo.

Tratamentos	PMF (g)	PMS (g)
Tampa+30g de sacarose+MS	2,01a	0,12a
Tampa+30g de sacarose+½MS	1,95a	0,11a
Tampa+15g de sacarose+MS	0,98b	0,06b
Tampa+15g de sacarose+½MS	0,74b	0,04b
Fita+30g de sacarose+MS	2,34a	0,13a
Fita+30 g de sacarose+½MS	2,08a	0,14a
Fita+15g de sacarose+MS	1,09b	0,08b
Fita+15g de sacarose+½MS	1,21b	0,07b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Plântulas do híbrido 11648 oriundas dos meios com 30 g L⁻¹ de sacarose, independente da concentração de sais, apresentaram taxas de sobrevivência em torno de 90%, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos, que apresentaram porcentagem de sobrevivência em torno de 55 a 68% (Tabela 4).

Tabela 4. Peso da matéria fresca (PMF) e peso da matéria seca (PMS) em plantas de híbrido 11648 em função de diferentes condições de cultivo.

Tratamentos	Sobrevivência (%)
Tampa+30g de sacarose+MS	95a
Tampa+30g de sacarose+½MS	93a
Tampa+15g de sacarose+MS	68b
Tampa+15g de sacarose+½MS	65b
Fita+30g de sacarose+MS	91a
Fita+30 g de sacarose+½MS	83a
Fita+15g de sacarose+MS	62b
Fita+15g de sacarose+½MS	55b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com Arigita et al. (2002) a eliminação total da sacarose no meio de cultura favoreceu a mortalidade de até 60% de mudas micropropagadas de *Actinidia deliciosa* (A.Chev.). O aumento das taxas de mortalidade de plantas oriundas de meio pode está relacionada à taxa de transpiração, que é relativamente elevada em meios com a ausência de sacarose (POSPÍŠILOVÁ et al., 1998). Kumar et al. (2009), observaram um aumento significativo nas taxas de sobrevivência de plântulas de tangerina 'Kinnow' (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tenore) quando cultivadas *in vitro* em meio MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) com adição de sacarose. Provavelmente, o resultado positivo

nas taxas de sobrevivência na fase de aclimatização está relacionado com um aumento nas fontes de carbono e nutrientes durante o cultivo *in vitro*.

CONCLUSÕES

A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose combinada com a concentração de 50% de sais do meio MS favoreceu o crescimento e a sobrevivência de plantas do híbrido 11648, independente do tipo de vedação dos tubos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAMA, J.; LOPES-RUIZ, A. DIEZ, J. GARCIA-FERNANDEZ, J. M. Nitrogen availability on intracellular amino acids and ammonium pools in the green alga *monophidium braunii*. **Journal of Plant Physiology**. v. 153, p. 529 - 533, 1998.

ARIGITA, L., GONZÁLEZ, A., TAMÉS, R.S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 166-173, 2002.

BARCELÓ COLL, J.; NICOLÁS RODRIGO, G.; SABATER GARCÍA, B.; SÁNCHEZ TÁMES, R. **Fisiologia vegetal**. 6ª ed. Madri: Pirâmide, p. 662, 1988.

BARBOZA, S.B.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.725-733, 2004.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. DE, RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. E VALENTE, T. C. T., Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.5, p. 863-868. 2011.

CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A. C. Efeito do meio de cultura e concentrações de auxinas no enraizamento *in vitro* de *Prunus cerasifera* cv. MR. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 2, n. 1, p. 43-47, 2006.

CUSHMAN, J. C. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiolog**, v. 127, p. 1430-1449, 2001.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA V.R.O.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v.22, p. 780-783, 2004.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photoeynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured *grapevine* rootstock in relation to acclimatisation. **Physiology Plantae**, v, 102, p. 41 -418, 2008.

FUMAGALI, Elisângela et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.18, n.4, pp.627-641. 2008.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP, EMBRAPA-CNPH, p. 99-169. 1990.

KOROCH, A. R., JULIANI, J. R. H. H.; JULIANI, H. R.; TRIPPI, V. S.; Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 213-217. 1997.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, T.H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. 484p.

KUMAR; L.S; JENA, S.N. NAIR, K.N. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in Northeast India. **Scientia Horticulturae** p. 350-359. 2009.

LIMA, J. D.; DAMATTA, F. M.; MOSQUIM, P. R. Growth attributes, xylem sap composition, and photosynthesis in *common bean* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23. p.937-947, 2000.

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

MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, Riverside. **Proceedings**. Riverside. University of California, v. 3, p. 1155-1161. 1969.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. DE S.; QUEIROZ, S. R. DE O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. DE; Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul, **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, p. 481-490, 2009.

PEREIRA, J. E. S. BIANCHI, V. J.; DUTRA, L. F. E FORTES, G. R. de L.; Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 17-20, 1999.

SANTANA, J. R. F. PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. de; Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SILVEIRA, D. G; AMORIM, E. P.; JESUS, O. N. DE, SOUZA, F. V. D.; PESTANA, K. N.; SANTOS, V. DE J.; SANTANA, J. R. F. DE; Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica** (UFC. Online), v. 44, p. 544-553, 2013.

SRINIVASA-RAO, N. K.; BHATT, R. M.; SADASCHIVA, A. T. Tolerance to water stress in tomato cultivars. **Photosynthetica**, v, 38, p. 465 - 467, 2000.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substrato na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) cv. Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p. 1416-1423, 2006.

VAN DER WERF, A. Growth analysis and photoassimilate partitioning. IN: ZAMSKI, E.; SHAFFER, A. A. **Photoassimilats distribution in plants and crops: source-sink relationships**. Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA. p. 1- 20, 1996.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J.; Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. **Science Horticulture**, v. 38, p.261 – 267, 1989.

ARTIGO 4

**ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Agave sisalana* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS**

ACLIMATIZAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Agave sisalana* EM DIFERENTES SUBSTRATOS

RESUMO - Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo, em vista da grande importância econômica do sisal, torna-se necessário cada vez mais o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam protocolos para otimizar a propagação dessa espécie. Dentre os fatores que podem ser citados para viabilizar a propagação de sisal podemos citar os substratos. Assim, este teve como objetivo determinar um substrato adequado para o bom desenvolvimento de mudas micropropagadas de *A. sisalana*. Para a instalação do experimento, utilizou-se mudas micropropagadas de *A. sisalana* com aproximadamente 3,0 cm de altura. Foram retiradas dos tubos de ensaio e lavadas em água corrente para a eliminação do meio de cultura das raízes. Em seguida as mudas foram transferidas para bandejas de polipropileno contendo substratos constituídos de diferentes proporções de solo, substrato comercial West Garden[®] terra vegetal, esterco e fibra de coco. Após 150 dias foram avaliadas a altura de planta (cm), área foliar por planta (cm²), massa fresca (g), número de folhas, diâmetro basal (cm), diâmetro da roseta (cm), comprimento da maior raiz (cm) e número de raízes. Dentre as composições estudadas, o substrato composto com 50% solo + 50% de esterco foi a que apresentou melhores resultados para o crescimento de mudas micropropagadas de *A. sisalana*.

Palavras chave: Asparagaceae, Análise de crescimento, Micropropagação.

ACCLIMATIZATION AND GROWTH OF *Agave sisalana* IN DIFFERENT SUBSTRATES

ABSTRACT- currently, Brazil is the world's largest producer and exporter of sisal, In view of the great economic importance of sisal, increasingly it is necessary to develop research to establish protocols to optimize the spread of this species. Among the factors that can be cited to facilitate the spread of sisal can cite substrates. So this was to determine a suitable substrate for the proper development of plantlets of *A.sisalana*. For the installation of the experiment, we used plantlets *A.sisalana* approximately 3 cm were removed from the test tubes and washed in running water to the held of the culture medium, then the seedlings were transferred to polypropylene trays containing substrates made of different proportions of soil, commercial substrate West Garden[®] topsoil, manure and coconut fiber. After 150 days after were evaluated plant height, leaf area per plant, fresh weight, number of leaves, basal diameter, rosette diameter, the largest root length and number of roots. Among the compositions studied, the substrate compound with 50% soil + 50% manure showed the best results for the growth of plantlets of *A.sisalana*.

Keywords: Asparagaceae, Growth analysis, Micropropagation.

INTRODUÇÃO

O sisal é adaptado a viver em condições semiáridas, é originário da América Central, onde se concentra a maior diversidade de espécies na zona de transição árida e semi-árida do México Central (CARVALHO et al., 2008). Do México, o sisal foi levado para outras partes do mundo, passando a ser comercialmente cultivado. Atualmente está expandido em muitos países como: Colômbia, Bolívia, Brasil, Espanha, Equador, Peru e Venezuela. Várias espécies são de interesse econômico, por seu valor ornamental e por ser fonte de matéria prima para subprodutos de interesse comercial (DEVESA, 1997).

A propagação convencional do sisal ocorre 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, além disso, plantas propagadas por bulbilhos apresentam uma alta variabilidade genética, o que torna inviável para a produção em larga escala (CARVALHO et al., 2006).

Em vista da importância econômica desta espécie, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam protocolos para realizar propagação rápida e maciça, ampliando a técnica de cultivo *in vitro* (CARVALHO et al., 2008).

A cultura de tecidos surge como uma alternativa para propagação de espécies de interesse econômico. Esta técnica oferece várias vantagens, como a produção em grande escala de plantas em curto período de tempo, além de plantas livres de fungos e bactérias (MERCIER; NIEVOLA, 2003).

A etapa mais crítica durante o processo de micropropagação é a aclimatização. Esta etapa consiste na transferência das plantas da condição *in vitro* para um ambiente de cultivo *ex vitro*. A transferência para um ambiente não controlado, séptico e com baixa umidade, pode favorecer a morte de plantas e período prolongado de aclimatização (GIRARDE et al., 2007). Portanto, a aclimatização é uma etapa que representa em muitos casos, o principal gargalo na micropropagação de muitas espécies.

Vários fatores podem influenciar a aclimatização e desenvolvimento de plantas micropropagadas, entre eles o tipo de substrato. Os substratos influenciam as respostas das plantas na fase de aclimatização através de um

controle mais rígido da nutrição mineral e da irrigação, e da redução de problemas relacionados com salinização, incidência de pragas e doenças e contaminações diversas. Assim, os substratos devem ser formulados visando à praticidade, para que favoreçam a produção mais econômica e eficiente.

O presente trabalho objetivou verificar a melhor combinação de substratos para o crescimento de mudas micropropagadas de *Agave sisalana*, por meio de avaliações das variáveis morfológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a instalação do experimento, utilizou-se brotações de *Agave sisalana* com aproximadamente 3 cm de altura, propagadas a partir de disco de segmento caulinar.

As plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e lavadas em água corrente para a retirada do meio de cultura, em seguida foram transferidas para bandejas contendo substrato comercial West Garden[®], onde permaneceram por 30 dias, após este período, as plantas foram transferidas para bandejas de polipropileno de 50 células, com dimensões de 5 x 5 x 9 cm contendo substratos constituídos de diferentes proporções de solo, substrato comercial West Garden[®], terra vegetal, esterco e fibra de coco, conforme discriminado na tabela 1, onde permaneceram por mais 150 dias.

Tabela 1. Composição dos substratos utilizados no experimento para avaliação da aclimatização de brotações de *Agave sisalana*.

Substrato	Solo (%)	West Garden (%)	Esterco (%)	Fibra de coco (%)
1	100	-	-	-
2	50	50	-	-
3	50	30	20	-
4	50	10	20	20
5	50	20	10	20
6	50	-	50	-
7	70	10	20	-
8	70	10	10	10
9	70	-	20	10
10	50	-	-	50
11	50	10	20	10

O experimento foi montado com parcelas subdivididas no tempo, com delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, onde cada planta

correspondeu a uma unidade experimental. O experimento foi mantido por 150 dias em casa de vegetação com interceptação luminosa de 50%, sendo que nos primeiros 30 dias as bandejas ficaram cobertas com polietileno transparente (150 μm).

A irrigação das plantas foi realizada por meio de aspersor manual, com vazão média de 60 L/H/m² durante 2 minutos. Nos primeiros 30 dias as mudas foram submetidas a duas irrigações diárias com intervalo de 8 horas entre cada irrigação, sendo mantida apenas uma irrigação a partir do 30^o dia.

A cada 30 dias após o transplântio foram avaliados: altura de planta, em centímetros (ALT), área foliar por planta, em cm² (AFO), massa fresca, em gramas (MFA), número de folhas (NF), diâmetro basal, em centímetros (DB), diâmetro da roseta, em centímetros (DR), comprimento da maior raiz, em centímetros (CMR) e número de raízes (NR) e porcentagem de sobrevivência, em porcentagem (%) totalizando 150 dias. A partir dessas informações, foram calculadas características morfofisiológicas, como, taxa de crescimento absoluto da massa fresca (TCAMF) através da Equação 1 e razão de área foliar (RAF) pela Equação 2; expressões descritas por Benincasa (2003).

$$\text{Equação 1: } TCAMF = \frac{M_2 - M_1}{T_2 - T_1}$$

em que:

M é a massa fresca em g, mensurada entre dois tempos (T) consecutivos de avaliações, em mês, ficando a unidade de TCAMF em g mês⁻¹.

$$\text{Equação 2: } RAF = \frac{AFO}{MFT}$$

em que:

AFO é a área foliar em cm² e MF a massa fresca total em gramas (g) ficando unidade de RAF em cm²g⁻¹.

As variáveis analisadas foram submetidas à análise de variância com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas micropropagadas de *Agave sisalana* apresentaram taxas de sobrevivência, variando de 79 a 91 % entre os tratamentos estudados neste trabalho (Tabela 2). Segundo Alves (2004), espécies que possuem metabolismo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), como as agaves, apresentam adaptações para evitar perda de água, assim, essas adaptações podem favorecer também a aclimatização e a sobrevivência de plantas micropropagadas.

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência de plantas micropropagadas de *Agave sisalana* em função de diferentes substratos.

Substrato	Porcentagem de sobrevivência (%)
1	80
2	87
3	91
4	90
5	87
6	82
7	82
8	89
9	84
10	79
11	81

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para todas as variáveis analisadas neste trabalho, os tratamentos 4, 6 e 8 apresentaram melhores resultados, sendo estes, estatisticamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 3). Segundo Silva et al., (1998) a utilização de húmus em mistura com substrato comercial agromix (1:1) favoreceu a melhor resposta para abacaxi (*Ananas comosus* L.) quando utilizado como substrato para aclimatização e desenvolvimento de plantas vindas de cultivo *in vitro*. Salvador (2000) e Silva (2001) estudando o efeito de substrato sobre a indução floral em gloxínia, relataram que obtiveram ótimos resultados em cultivo convencional em estufa, utilizando substrato composto de vermiculita, húmus e perlita na proporção (1:2:0,5). Iuchi (1994), trabalhando com rainha do abismo (*Sinnigia leuctricha*), relata que obteve melhor desenvolvimento das plantas com a utilização de areia e húmus nas proporções de 2:1 ou 1:2. Entretanto, Hoffmann (1999), estudando diversos substratos para a aclimatização do porta-enxerto de macieira

Marubakaido, verificou que o uso do substrato comercial Plantmax promoveu melhores resultados.

Tabela 3. Valores médios de altura da planta (AP), comprimento de raiz (CR), número de folhas (NF), matéria fresca (MF), diâmetro basal (DB), diâmetro da roseta (DR), comprimento da maior raiz (CMR) e número de raízes (NR) em plantas de *Agave sisalana* em função de diferentes substratos aos 150 dias.

Substrato	Variáveis							
	AP (cm)	NF (u)	MF (g)	DB (cm)	CR (cm)	AF (cm ²)	CMR (cm)	NR (u)
1	8,32d	5,8a	4,78d	0,9c	4,1c	30,2c	3,43b	12,2a
2	11,32c	5,7a	7,01c	1,25a	7,5c	63,2b	4,82a	11,6a
3	9,04d	6,1a	5,65d	1,12b	6,8c	51,4b	4,58a	14,2a
4	16,71a	6,0a	11,89a	1,49a	11,8a	71,9a	5,23a	13,8a
5	14,87a	5,7a	9,82b	1,09b	12,4a	68,3a	4,87a	14,8a
6	14,32a	6,5a	12,01a	1,75a	11,9a	73,9a	5,52a	12,9a
7	13,01b	6,2a	12,25a	1,40a	9,8b	69,5a	4,38a	12,7a
8	13,05a	5,9a	13,05a	1,48a	11,2a	77,3a	5,12a	11,5a
9	13,35b	6,4a	11,78a	1,65a	10,1a	68,3a	4,87a	14,2a
10	12,01c	5,7a	9,78b	1,53a	8,7b	59,2b	5,32a	13,2a
11	13,08b	6,1a	8,94b	1,63a	9,2b	62,7b	4,55a	11,8a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com Paul et. al., (1976), na tentativa de se obter um substrato com teor de matéria orgânica, possibilitando o fornecimento de água e oxigênio de maneira adequada, pelo ajuste dos constituintes do substrato, diversos materiais podem ser empregados, dentre eles, solo, areia, turfa, serragem, casca de arroz carbonizada, húmus, resíduos orgânicos, entre outros.

Skrebsky et al., (2006), ao selecionarem substratos para a aclimatização de plantas de *Pfaffia glomerata* produzidas *in vitro*, concluíram que a combinação de substrato comercial e solo (50% + 50%), proporcionaram maior crescimento às plantas durante a última fase de aclimatização, em cultivo sob sombrite. Segundo os autores, o uso isolado do substrato comercial aumentou a sobrevivência das plantas cultivadas em campo, devido esse substrato possuir os maiores valores de capacidade de retenção de água, de água facilmente disponível e de água disponível.

Esses resultados evidenciam a necessidade de se ter proporções adequadas de componentes no substrato, principalmente de matéria orgânica, para o crescimento de plantas micropropagadas de *Agave sisalana*, visto que o substrato exerce influência significativa sobre esta variável. Na Figura 1 pode ser visualizado o melhor desenvolvimento da parte aérea apresentado pelas plantas do tratamentos estudados.

Para as variáveis comprimento da maior raiz e número de raízes, os substratos utilizados neste trabalho não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si. Assim, para esta variável, a escolha do substrato pode ser realizada em função da disponibilidade. Segundo Barcello Coll et. al. (1988) algumas espécies vegetais apresentam intensa produção de auxinas na parte aérea e que ao serem translocadas para a base da planta podem estimular a rizogênese.

Apesar de mudas micropropagadas de *Agave sisalana* apresentarem fácil enraizamento durante a condição *in vitro*, é importante oferecer condições que favoreçam o desenvolvimento das raízes na fase de aclimatização, visto que as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais quando transplantadas e por isso novas raízes devem ser formadas.

O cálculo da taxa de crescimento absoluto da massa fresca é uma variável capaz de mensurar a velocidade de crescimento e incremento de matéria fresca ao longo do tempo. Através da tabela 5, verifica-se, que, para todos os tratamentos estudados neste trabalho, o incremento de massa fresca foi baixo nos primeiros 60 dias após a transferência das plantas para os substratos. Este comportamento é relatado por Barreiro Neto et al. (2002), segundo este autor, mudas oriundas do cultivo *in vitro* podem permanecer por até 6 meses em adaptação ao meio *ex vitro* e só a partir daí iniciarem algum incremento de matéria fresca.

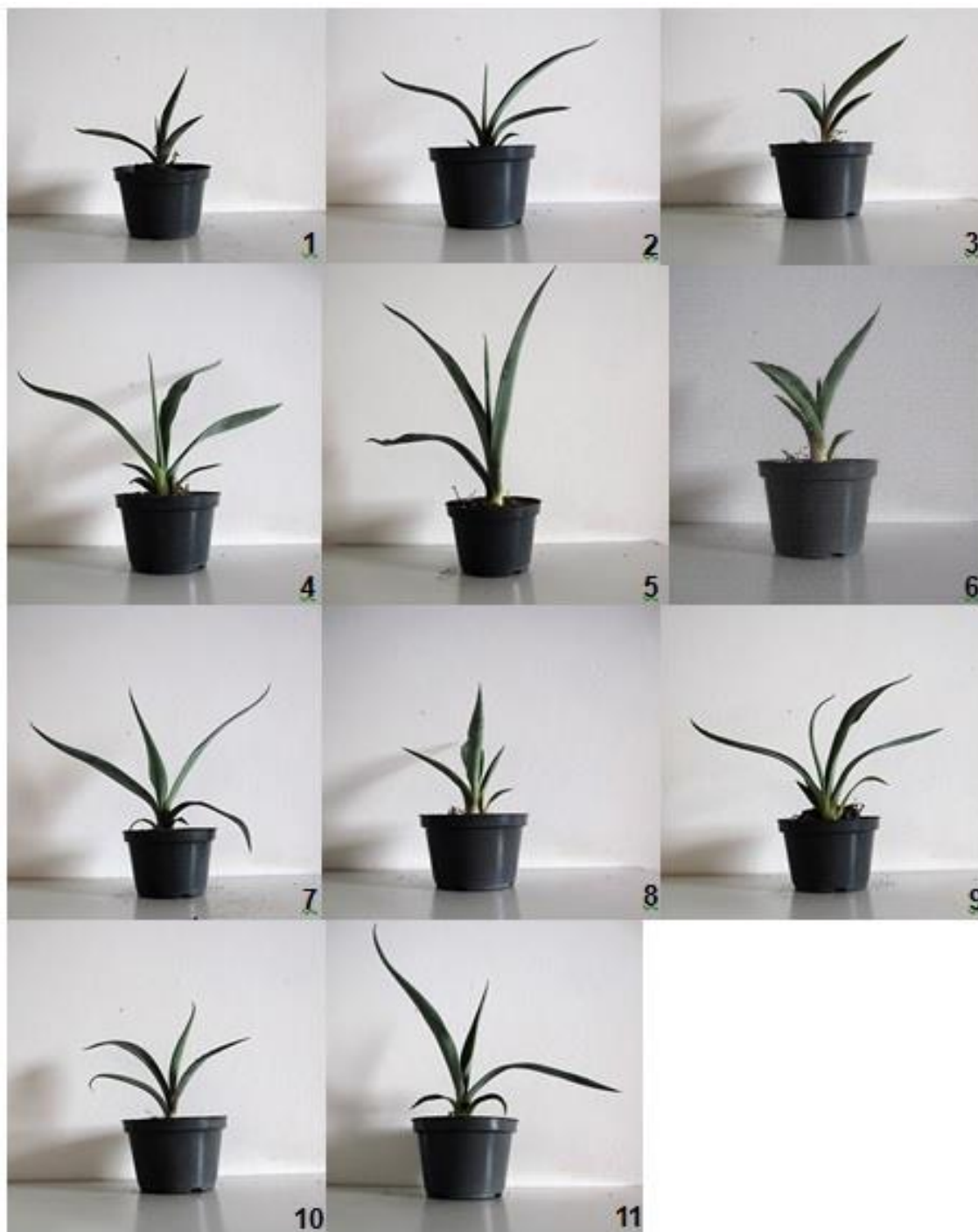


Figura 1. Aspecto visual das mudas de *Agave sisalana* cultivadas em diferentes composições do substrato: 1). (100% S); 2). (50% S + 50% WG); 3). (50% S + 30% WG + 20% E); 4) (50% T + 10% WG + 20% E + 20% FC); 5). (50% S + 20% WG + 10% E + 20% FC); 6). (50% S + 50% E); 7).(70% S + 10% WG + 20% E); 8). (70% S + 10% WG + 10% E + 10% FC); 9). (70% S + 20% E + 10% FC); 10). (50% S + 50% FC); 11). (50% S + 10% WG + 20% E + 10% FC), em que S (Solo), WG (Substrato comercial West Garden), E (Esterco) e FC (Fibra de coco).

Tabela 5. Incremento de matéria fresca (g mês^{-1}) em cinco períodos de avaliação, em função de diferentes substratos.

Substrato	Período de avaliação (dias)				
	30	60	90	120	150
1	0,0a	0,1a	0,50c	0,50c	0,70c
2	0,2a	0,4a	1,09b	1,60a	1,88b
3	0,1a	0,3a	0,70c	0,90c	1,09c
4	0,0a	0,2a	1,29a	2,80a	3,90a
5	0,2a	0,2a	1,24a	1,70a	2,78b
6	0,3a	0,5a	1,71a	2,50a	3,30b
7	0,2a	0,3a	1,45a	2,60a	4,00a
8	0,3a	0,5a	1,45a	3,00a	3,80a
9	0,2a	0,5a	1,70a	2,34	3,34a
10	0,0a	0,8a	1,50a	1,80a	1,98b
11	0,0a	0,5a	0,90b	1,50a	3,20b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Neste trabalho, a TCAMF apresentou um comportamento crescente ao longo do tempo. Barroso et al. (2003), que também verificaram este comportamento em seus trabalhos de aclimatização de plantas de abacaxi das variedades Pérola e Smooth Cayenne oriundas do cultivo *in vitro*, esses autores relatam o crescimento exponencial para as variáveis analisadas em seus trabalhos de aclimatização, utilizando vermiculita e areia como substrato.

Barboza et al. (2006) relata que morossidade durante o início de aclimatização e incremento de massa fresca se deve ao fato das plantas apresentarem estruturas morfoanatômicas como frequência estomática, espessamento da cutícula e parede da epiderme, formato e sinuosidade das paredes do parênquima aquífero ainda pouco adaptadas para crescerem e se desenvolverem.

A razão de área foliar (RAF) é um componente fisiológico que representada a relação entre a área responsável pela fotossíntese e a biomassa produzida pela planta. Não foi verificada diferença estatística para a RAF entre os tratamentos, ao longo do período de avaliação (Tabela 6). Após 150 dias após a transferência para a condição *ex vitro*, o valor de RAF variou de 5,49 até 7,57 $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$, e, somente após este período é que iniciou a expansão foliar de forma considerável.

Segundo Otoni e Campostrini (1996), as plantas sob a condição *in vitro* apresentam pouco incremento de biomassa após a transferência para substrato

quando comparadas àquelas desenvolvidas em campo. Estes autores relatam que, em geral, estas plantas possuem algumas estruturas como área foliar e camada de cera na epiderme das folhas ainda pouco desenvolvidas, refletindo em baixa resistência mecânica dos tecidos de sustentação das plantas e consequentemente na expansão foliar.

Tabela 6. Razão de área foliar ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) em cinco períodos de avaliação, em função de diferentes substratos.

Substrato	Período de avaliação (dias)				
	30	60	90	120	150
1	1,62	2,68	3,55	5,52	5,49
2	1,54	2,33	5,90	6,49	6,65
3	1,32	2,15	3,23	6,21	7,57
4	1,62	2,92	6,45	7,42	6,05
5	1,54	3,05	7,28	7,32	6,96
6	1,75	2,98	6,36	7,03	6,15
7	1,54	2,71	7,29	6,75	5,67
8	1,50	3,00	6,77	7,09	6,06
9	1,79	2,84	5,28	6,90	5,80
10	1,62	2,33	4,93	5,58	6,05
11	1,62	2,26	7,02	7,92	6,40

Pospisilova et al. (1999) relatam que as principais alterações morfofisiológicas na fase de aclimatização referem-se ao espessamento da lâmina foliar, número de cloroplastos e diferenciação do mesófilo. E que as plantas apresentam aparelho fotossintético pouco eficiente nesta fase, o que acarreta no retardo do desenvolvimento da cutícula, da cera epicuticular e de estômatos funcionais em plantas cultivadas *in vitro* resultando em elevadas taxas de transpiração.

CONCLUSÕES

Os substratos 4, 6 e 8 apresentaram melhores resultados para a aclimatização e crescimento de brotações *Agave sisalana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOZA, S. B. S. C.; RIBEIRO, D. G.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C.; Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.
- BARCELÓ COLL, J.; NICOLÁS RODRIGO, G.; SABATER GARCÍA, B.; SÁNCHEZ TÁMES, R. **Fisiologia vegetal**. 6.ed. Madri: Pirámide, 662p. 1988.
- BARROSO, P. A. V.; MOURA, G. E. D. D.; BRITO, L. K. F.; MARTINS, C. P.; MACEDO, C. E. C.; LOPES, D. B.; ALLOUFA, M. A. I.. Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande: PB, v. 7, n. 3, p. 473-477, 2003.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP. 41 p. 2003.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimação de plantas: abordagens recentes**. In: TORRES, A. C.; LACORTE, C. (Eds.) Brasília: CNPH/Embrapa, ABCTP, p.2-12. 1996.
- CARVALHO, J.M.F.C., **Multiplicação *in vitro* de sisal**, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.
- CARVALHO, J.M.F.C., **Técnicas do cultivo *in vitro* no sisal**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos, 208, 2008.
- DEVESA, J. Plantas con semillas, familia Agavaceae. In: IZCO, J., E. BARRENO, M.; COSTA, Y. J. (Ed.). **Botânica Interamericana**. Madri: McGraw-Hill, 781 p. 1997.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GIRARDI, C.G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Aclimatização e desenvolvimento em campo de gengibre advindos de mudas micropropagadas e tipo convencional. **Revista Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.205-11, 2007.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.

MEDINA, J. C. **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do estado de São Paulo, 1054. 286 p.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**., v.30, p.247-249, 1992.

PAUL, J. L.; LEE, C. I. Relation between growth of Chrysantemum and aeration of conterainer media. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 101, p. 500-503, 1976.

POSPÍŠILOVÁ, J.; WILHELMOVÁ, N.; SYNKOVÁ, H.; Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affectes by application of abscisic acid. **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.322, p.863-869, 1998.

SANCHES POTES, A. et al. Manuales para educación agropecuária: **cultivos de fibras**. México: Trillas, p. 84, 1991.

SALVADOR, E. D. **Caracterização física e formulação de substratos para o cultivo de algumas plantas ornamentais**. 2000. 148 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2000.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423. 2006.

SILVA, A. B. **Multiplicação *in vitro* e aclimatização de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.)** 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; MACIEL, A. L. R.; ALVES, J. M. C.; PEREIRA, A. B. Aclimação de brotações de abacaxi (*Ananas comusis* L.) produzidas *in vitro*: ação de Agromix, húmus e Kelpak. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 4, n. 2, p. 107-110, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da grande importância econômica do sisal, sua propagação e cultivo apresentam limitações quanto à aquisição de mudas sadias pelos produtores. A cultura de tecidos pode ser uma ferramenta de grande potencial para o estabelecimento *in vitro* de espécies com importância econômica e fornecimento de mudas de qualidade. O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma espécie vegetal que se adaptou bem às condições edafoclimáticas do semi-árido nordestino, e atualmente sua fibra é muito utilizada na indústria automobilística para o preenchimento de estofados, construção civil, polpa e mucilagem para papel e alimentação animal.

O trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de desinfestação e micropropagação de *Agave sisalana* e do híbrido 11648 verificando 1) efeito de diferentes concentrações de fungicida e antibiótico no estabelecimento *in vitro*, 2) a resposta morfogênica em função de diferentes concentrações de auxinas, citocininas e tipos de explantes, 3) efeito diferentes concentrações sais de meio MS, sacarose e tipo de vedação de tubos sobre a resposta morfogênicas *in vitro* e 4) diferentes combinações de substratos na aclimatização e crescimento de plantas micropropagadas de *Agave sisalana*.

Este trabalho destaca-se por ser o primeiro a avaliar diferentes concentrações de fungicida e antibiótico, visando a desinfestação de explantes e sisal, bem como, o estudo de diferentes formulações de substratos para a aclimatização e crescimento de plantas propagadas *in vitro* de *Agave sisalana* e híbrido 11648.

Como resultado, neste trabalho foi verificado que o uso de carbendazim a 0,2% por 20 minutos e a concentração de 100 mgL⁻¹ de cloranfenicol adicionado ao meio de cultura foi eficaz para a desinfestação de explantes de *Agave sisalana* e híbrido 11648.

Os tratamentos com 0,039 e 0,053 mM de benzilaminopurina mostraram maior eficiência na indução de brotações em disco de segmento caulinares de *Agave sisalana* e híbrido 11648.

A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose combinada com a concentração de 50% de sais do meio MS favoreceu o crescimento e a sobrevivência de plantas do híbrido 11648, independente do tipo de vedação.

Dentre as composições estudadas, o substrato composto por 50% solo + 50% de esterco apresentou melhores resultados para o crescimento de mudas micropropagadas de *Agave sisalana*.

Os resultados encontrados foram satisfatórios, porém, recomenda-se a realização de futuros trabalhos. Ao longo do período de realização desta pesquisa, foram realizadas várias viagens de coletas, e foi percebido, que, a taxa de desinfestação de explantes mostrava relação com a época de coleta. Em geral, as melhores taxas de desinfestação foram observadas quando se coletou plantas nos meses entre dezembro e março, que são os que apresentam temperaturas mais altas e menor incidência de chuvas.

Nos experimentos de organogênese, foi notado que, em geral, a melhor região de coleta de explantes, são aquelas que apresentam o tecidos mais fibrosos e próximos ao sistema radicular da planta, comportamento que provavelmente pode está relacionado com o fato das *Agaves* se propagarem também através de estolhos, assim, possivelmente, nessa região encontra-se tecidos com capacidade de regeneração, portanto, experimentos com outras fontes de explantes e estudos anatômicos são recomendados.

Apesar de o sisal ter se adaptado bem ao semiárido brasileiro, região com predominância de solos com baixo teor de matéria orgânica, longos períodos de estiagem e baixa pluviosidade, neste trabalho, foi verificado que as mudas de sisal apresentaram adaptação àqueles substratos com maior teor de matéria orgânica, que são justamente aqueles que apresentam maior capacidade de retenção de água.

Espera-se que os resultados obtidos nesta pesquisa sirvam de suporte para a realização de novos trabalhos, de forma a aperfeiçoar a propagação de mudas de sisal e que auxiliem no desenvolvimento e fortalecimento desta cultura na região do nordeste brasileiro.