

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

**TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE
MUDAS MICROPROPAGADAS E CONSERVAÇÃO IN
VITRO DE GERMOPLASMA DE SISAL (*Agave sisalana*
Perrine e híbrido 11648)**

PRISCILA TAVARES FONSECA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2021**

**TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE
GERMOPLASMA DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine e híbrido
11648)**

PRISCILA TAVARES FONSECA

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009

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 título de
Doutor em Ciências Agrárias (Área de
Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Cristina Fermino Soares

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cristina Ferreira Nepomuceno

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

FEVEREIRO - 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

F676t

Fonseca, Priscila Tavares.

Técnicas biotecnológicas para produção de mudas micropropagadas e conservação in vitro de germoplasma de sisal (*Agave sisalana* Perrine e híbrido 11648) / Priscila Tavares Fonseca. _ Cruz das Almas, Bahia, 2021.
188f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Coorientadora: Cristina Ferreira Nepomuceno.

Coorientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

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

1.Sisal – Cultivo in vitro. 2.Sisal – Micropropagação.
3.Mudas – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Título.

CDD: 633.58

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615) &
Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (Bibliotecário - CRB5/1578)
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

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

**TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE
GERMOPLASMA DE SISAL (*Agave sisalana* Perrine e híbrido
11648)**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
PRISCILA TAVARES FONSECA**

Realizada em 23 de Fevereiro de 2021

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Daniela Garcia Silveira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano- IFBAIANO
Examinador Externo

Prof. Dr^o. Eurico Eduardo Pinto de Lemos
Universidade Federal de Alagoas - UFAL
Examinador Externo

Prof. Dr^o. Neftali Ochoa Alejo
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional - Cinvestav
Examinador Externo

Prof. Dr^o. Wagner Campos Otoni
Universidade Federal de Viçosa - UFV
Examinador Externo

Aos meus pais Hermes e Cleusa

Dedico

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir e conceder a oportunidade para que pudesse vencer os obstáculos e conquistar meus objetivos.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Hermes e Cleusa, irmãos André e Daniel, e sobrinha Gabrielle pelo apoio e carinho incondicional.

Aos meus amigos, em especial Kassio, Marly, Luciana e Themis pela compreensão, carinho e contribuições.

À Dr^a. Cristina Ferreira Nepomuceno pela co-orientação, contribuições, e ensinamentos desde início da minha vida acadêmica, confiança e amizade construída.

À Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares pela orientação, confiança e apoio na realização e conclusão do trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa pela co-orientação e apoio na realização do trabalho.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, e a Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela infraestrutura concedida e, em especial a Deyse, secretaria do curso, pela atenção sempre que requisitada.

Aos colegas de pós-graduação pela parceria, contribuições e pela amizade.

A todos os funcionários e estagiários do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais e de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em especial, as técnicas Leni, Carol e Verônica pela colaboração para a conclusão do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado (DS 88882.441095/2019-01), ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa e à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação da Bahia (SECTI) convênio (SECTI-UFRB 001/2013), pelo financiamento da pesquisa.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”.

Paulo Freire

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	10
REFERENCIAL TEÓRICO	15
ARTIGO 1	
PROPAGAÇÃO CLONAL IN VITRO DE <i>Agave sisalana</i> Perr.....	50
ARTIGO 2	
MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE <i>Agave</i> híbrido 11648	109
ARTIGO 3	
CONSERVAÇÃO IN VITRO DE GERMOPLASMA DE <i>Agave sisalana</i> Perrine SOB CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO LENTO.....	156
CONSIDERAÇÕES FINAIS	194

TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE SISAL (*Agave sisalana* e híbrido 11648)

Autor: Priscila Tavares Fonseca

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO: As técnicas biotecnológicas podem contribuir para a produção de mudas e conservação de espécies de relevância econômica, a exemplo do *Agave sisalana*, conhecido como sisal. Esta é a principal cultura produtora de fibras duras no mundo. Este trabalho teve como objetivos: I) Estabelecer um protocolo de micropropagação com vistas a produção de plantas em larga escala de *Agave sisalana* e o híbrido 11648; II) avaliar a conservação in vitro do sisal com agentes promotores de crescimento mínimo. Na micropropagação de sisal foram realizadas as etapas de estabelecimento, multiplicação, subcultivo, enraizamento in vitro e aclimatização das mudas. Na conservação in vitro foram testados os agentes osmóticos sorbitol e manitol, combinados com sacarose e o inibidor de crescimento paclobutrazol. Os explantes tTCLs oriundos de rebentos e bulbilhos podem ser estabelecidos direto em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com a presença de 13,32 μ M de BAP, sendo eficiente na indução de brotos em *A. sisalana* (18,41 brotos por planta) e no híbrido 11648 (45,17 brotos por planta). Os explantes nas posições tTCLs apical (AP) e mediano (MI) foram mais responsivos para *A. sisalana* e os explantes tTCLs apical (AP) e mediano (MI₁ e MI₂) para o híbrido 11648. Nos subcultivos a indução de brotações em sisal obteve média 10 brotos por explante. No enraizamento in vitro, explantes com 30 mm de altura possibilitaram melhores respostas em ambos os genótipos. A concentração de 12 μ M de AIB favoreceu a rizogênese em *A. sisalana*, ao passo que no híbrido 11648 não foi necessário o uso de auxina. A taxa de sobrevivência das plantas de sisal foi de 100% após a aclimatização. Na conservação in vitro, o manitol a 261 mM e paclobutrazol a 15 μ M reduziram em 288,59% e 93,52% em relação ao controle o comprimento das plantas in vitro, respectivamente. A taxa de sobrevivência das plantas após 12 meses de conservação in vitro foi de 100% na aclimatização.

Palavras-chave: Sisal, Propagação in vitro, Morfogênese, Conservação in vitro, Crescimento lento.

BIOTECHNOLOGICAL TECHNIQUES FOR THE CONSERVATION OF GERMOPLOASM AND PRODUCTION OF SISAL PLANTS (*Agave sisalana* and hybrid 11648)

Author: Priscila Tavares Fonseca

Advisor: Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT: Biotechnological techniques can contribute to the production of plants and conservation of species of economic relevance such as *Agave sisalana*, known as sisal. This crop is considered the main source of stiff fiber in the world. This study aimed to: I) To establish a micropropagation protocol with a view to the production of large-scale plants of *Agave sisalana* and the hybrid 11648. II) to evaluate the in vitro conservation of sisal with promoters of minimum growth. For the micropropagation of sisal, the stages of establishment, multiplication, subculture and rooting in vitro were carried out. For in vitro conservation, the osmotic agents sorbitol or mannitol combined with sucrose and the growth inhibitor paclobutrazol were tested. The tTCL explants from offshoots and bulbils can be established directly in MS $\frac{1}{2}$ culture medium with the presence of 13.32 μ M of BAP, being efficient in the induction of shoots in *A. sisalana* (18.41 shoots for plant) and in the hybrid 11648 (45.17 shoots for plant). The explants in the apical (AP) and median (MI) positions were more responsive to *A. sisalana* and the apical (AP) and median (MI₁ and MI₂) explants for the hybrid 11648. In the subcultures, the induction of sisal sprouts obtained average 10,10 shoots per explant. For both genotypes, better in vitro rooting was achieved with 30 mm height explants. The auxin AIB at 12 μ M favored the rhizogenesis in *A. sisalana*, whereas for the 11648 hybrid it was not necessary to use the auxin. After acclimatization, the survival rate of sisal plantlets was 100%. For in vitro conservation, mannitol at 261 mM and paclobutrazol at 15 μ M promoted a growth reduction by 288.59% and 93.52%, respectively. The plant survival rate after 12 months of in vitro conservation was 100% during acclimatization.

Keywords: Sisal, In vitro propagation, Morphogenesis, In vitro conservation, slow growth.

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Agave* pertence ao grupo das monocotiledôneas e subfamília Agavoideae, que conforme a nova classificação foi incluída na família Asparagaceae (Bremer et al., 2003). No Brasil, o gênero é representado pelos genótipos *Agave sisalana*, também conhecida como sisal e o híbrido 11648, resultante do retrocruzamento entre (*A. amaniensis* Trel. & Nowell × *A. angustifolia* Haw.) × *A. amaniensis*, ambas reconhecidas pela produção de fibras duras.

O Brasil destaca-se em nível mundial como principal produtor de fibras duras de sisal, alcançando produção que variaram de 180.948 a 80.000 toneladas entre 2016 e 2018 (FAO, 2020). A Bahia configura-se como o estado com a maior produção de sisal 95,5% no Brasil (IBGE, 2020), com significativa geração de renda para os agricultores familiares (Suinaga et al., 2006; Soares et al., 2020), e por isso assume dentro do contexto social, importante papel como agente de fixação do homem no campo e na região semiárida.

Entretanto, a produção de sisal no Brasil vem diminuindo ao longo da última década, com redução de mais de 50% na produção anual da fibra. Fatores como períodos extensos de seca, o baixo nível tecnológico empregado em toda a cadeia produtiva e a elevada incidência da podridão vermelha do sisal, além dos problemas relacionados à comercialização da fibra nas regiões produtoras e à sua exportação, vem sendo apontados como os principais problemas que tem contribuído para o declínio na produção de sisal no Brasil (Soares et al., 2020).

Além disso, o manejo inadequado da cultura com mudas contaminadas e a falta de material vegetal de qualidade para o estabelecimento ou recuperação de plantios de sisal, tem aumentado a disseminação da doença, contribuindo para a diminuição contínua do plantio na região semiárida da Bahia e, em muitas áreas, já se tem observado o abandono da cultura devido à alta incidência da doença podridão vermelha.

Nesse contexto, torna-se essencial atender à demanda por plantas de alta qualidade fitossanitárias para estabelecer ou recuperar as plantações de sisal, aumentar a produtividade e reduzir os custos de produção. O uso de ferramentas biotecnológicas aplicadas à produção vegetal, como o cultivo in

vitro de células, tecidos ou órgãos vegetais, é uma alternativa complementar aos métodos convencionais de propagação de plantas (Ríos-Ramírez et al., 2018).

A cultura de tecidos vegetais, mais especificamente a técnica de micropropagação, é geralmente utilizada para designar o cultivo de diferentes células somáticas, tecidos ou órgãos das plantas, em meio de cultura definido sob condições ambientais e assépticas controladas *in vitro*, gerando novos indivíduos por divisão mitótica das células. O desenvolvimento pode ocorrer por duas vias: organogênese e embriogênese somática.

Independente da rota morfogênica para a formação de novas brotações, existe a necessidade de se estabelecer métodos *in vitro* eficientes e confiáveis de propagação. Para produção de plantas *in vitro* em grande escala, os atributos importantes são a qualidade, a relação custo-eficácia, a manutenção da fidelidade genética e o armazenamento a longo prazo, a fim de superar os problemas que enfrentam a micropropagação, como a variação somaclonal, hiperidricidade, oxidação fenólica, perda de material e qualidade das mudas (Mustafa e Taha, 2012).

Na multiplicação *in vitro*, vários cuidados são necessários para manter a homogeneidade do cultivo, devendo ser levados em conta o número e os intervalos dos subcultivos, a taxa de multiplicação e a estabilidade genética do material, evitando a variação somaclonal (Calvete et al., 2009). Em muitas espécies tem sido relatadas alterações fenotípicas após vários ciclos de multiplicação, a exemplo de *Plukenetia volubilis* (Rodrigues et al., 2014), *Ananas bracteatus* (Rodrigues et al., 2014), *Agave tequilana* (Torres-Morán et al., 2010; Díaz-Martínez et al., 2012); *Agave spp.* (De-La-Peña et al., 2012), *Heliconia bihai* (Rodrigues et al., 2008). É essencial o estudo da influência dos reguladores de crescimento vegetal em todas as fases de cultivo *in vitro*, estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimatização, na busca de um protocolo eficiente de propagação. Nessa perspectiva, a avaliação em campo para observar o desempenho das mudas produzidas após os ciclos de subcultivos é fundamental para determinar parâmetros de qualidade e aprimorar a técnica de multiplicação *in vitro* de *A. sisalana* e o híbrido 11648.

Por outro lado, a utilização de técnicas que retardam a frequência de subcultivos pode reduzir os riscos de variação somaclonal, bem como, facilitar e tornar menos dispendiosa a manutenção de culturas viáveis, por longos períodos

de tempo. Estas técnicas podem promover redução nos custos com mão de obra, meios de cultura e os riscos de contaminação relacionados à manipulação da cultura. Um método alternativo à conservação de germoplasma convencional é a conservação *in vitro*. A conservação através do cultivo *in vitro* atualmente é muito utilizada pelo sistema de crescimento lento, o qual resumidamente se baseia na redução do metabolismo, através da manipulação de temperatura, o uso de reguladores de crescimento vegetal e de agentes indutores de estresse osmótico, sem afetar a viabilidade das espécies com que se esteja trabalhando (Lemos et al., 2002).

A redução no crescimento das plantas, geralmente em cultura de tecidos vegetais é promovida pela utilização de agentes osmóticos como o sorbitol e o manitol, que agem modificando o potencial da água no meio de cultura, ou inibidores de crescimento vegetal como o paclobutrazol, que promove a inibição da atividade da ent-caureno oxidase, enzima na via biossintética do ácido giberélico (GA) que catalisa a oxidação do ent-kaureno em ácido caurenoico (Kondhare et al., 2014).

Resultados promissores foram relatados na cultura de tecidos vegetais ao adicionar sorbitol e manitol como promotores de crescimento lento em *Smallanthus sonchifolius* (Skalova et al., 2012), *Hancornia speciosa* Gomes (Santos et al., 2011), *Saccharum* spp. (Bello-Bello et al., 2014), *Syngonanthus mucugensis* (Brito et al., 2011) e *Agave* ssp. (Pérez-Molphe-Balch et al., 2012). Em contrapartida, a ação inibitória de paclobutrazol também tem se mostrado eficiente em estudos de conservação *in vitro*, com *Solanum tuberosum*, *Musa* 'Grande naine' (Albany et al., 2005), *Anadenanthera colubrina* (Nepomuceno et al., 2007), *Syringa x hyacinthiflora* (Cui et al., 2009), *Saccharum* spp. (Bello-Bello et al., 2014), sendo posteriormente retomada a taxa de multiplicação, em condições normais de crescimento.

Em vista do que foi exposto e considerando a importância econômica do gênero *Agave*, o presente trabalho teve os seguintes objetivos: I) avaliar os reguladores de crescimento vegetais, BAP e AIB, na morfogênese e ciclos de multiplicação *in vitro* de *A. sisalana* e híbrido 11648, II), e a conservação *in vitro* de *A. sisalana*, com propósito de produzir um protocolo eficiente de propagação e permitir o armazenamento de germoplasma *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albany, N.R. Comparative study of morphological parameters of Grand nain banana (*Musa* AAA) after in vitro multiplication with growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.l.], v.83, n.3, p.357-361, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-005-6307-z>.
- Bello-Bello J et al. Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación in vitro de caña de azúcar. *Agrociencia*, v.48, p.439-446, 2014.
- Bremer, B et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, [S.l.], v. 141, n. 4, p.399-436, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>.
- Brito, A.L et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação in vitro de sempre-viva. *Ciência Rural*, [S.l.], v. 41, n. 8, p.1354-1361, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782011000800010>.
- Calvete, E.O et al. Desempenho in vitro e agronômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, [S.l.], v.31, n.4, p. 943-949, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000400005>.
- Cui H.; Gu X.; Shi L. In vitro proliferation from axillary buds and ex vitro protocol for effective propagation of *Syringa × hyacinthiflora* 'Luo Lan Zi'. *Scientia Horticulturae*, [S.l.], v.121, n.2, p.186-191, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.017>.
- De-La-Peña, C et al. KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, [S.l.], v.12, n.1, p.203-203, 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-203>.
- Díaz-Martínez, M et al. Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science*, [S.l.], v.185-186, p.321-330, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.004>.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat database. 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>. Acesso em: set.2020.
- IBGE (2017) Levantamento Sistemático de Produção Agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 30:1-82

Kondhare, K.R et al. Use of the hormone-biosynthesis inhibitors fluridone and paclobutrazol to determine the effects of altered abscisic acid and gibberellin levels on pre-maturity α -amylase formation in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, [S.I.], v.60, n.1, p.210-216, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.03.001>.

Lemos, E.E.P et al. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, [S.I.], v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

Mustafa, N.; Taha, R. Influence of plant growth regulators and subculturing on in vitro multiplication of fome fig (*Ficus Carica*) cultivars. *Journal of Applied Sciences Research*, [S.I.], v.8, n.8, p. 4038-4044, 2012.

Nepomuceno, C.F et al. Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*, [S.I.], v.33, n.3, p.481-490, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622009000300010>.

Pérez-Molphe-Balch, E.; Pérez-Reyes, M.E.; Larosa-Carrillo, M. L. In vitro Conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) Under Slow Growth Conditions. *Haseltonia*, [S.I.], v. 17, p.51-57, 2012. <http://dx.doi.org/10.2985/1070-0048-17.1.6>.

Rodrigues, P.H.V. Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I Plantlets (Heliconiaceae). *Scientia Agricola*, [S.I.], v.65, p.681-684, 2008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000600017>.

Rodrigues, P.H.V.; Bordignon, S.R.; Ambrosano, G.M.B. Desempenho horticultural de plantas propagadas in vitro de *Sacha inchi*. *Ciência Rural* [S.I.], v.44, n.6, p.1050-1053, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000600016>.

Rodriguez-Ortiz, G et al. In vitro formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, [S.I.], v.30, n.1, p.49-56, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i1.1584>.

Skalova, I.; Viehmannova, I.; Vitamvas, J. In vitro Conservation of *Smallanthus sonchifolius* under Slow-Growth Conditions. *Agricultura Tropica Et Subtropica*, [S.I.], v. 45, n. 3, p.147-150, 2012. <http://dx.doi.org/10.2478/v10295-012-0024-5>.

Soares, A.C.F; Barreto-Evangelista, N.S; Marbach, P.A.S. Tópicos em Microbiologia Agrícola. Cruz das Almas: BA: EDUFRB, 2020. 276p.

Torres-Morán, M.I et al. Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.I.], v.103, n.3, p.403-409, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9777-6>.

REFERENCIAL TEÓRICO

Agavoideae

A partir das revisões sistemáticas, baseadas em análise filogenética, publicadas por Eguiarte (1995), Bogler e Simpson (1995, 1996) e Bogler et al. (2006), com base em sequências dos genes *rbcL* e enzimas de restrição do genoma do cloroplasto e do núcleo, a família Agavaceae foi recategorizada pelo sistema de classificação botânica Angiosperm Phylogeny Group II (APG II) (Bremer et al., 2003), com nova classificação taxonômica e incluída na família Asparagaceae Juss., pertencente à ordem Asparagales Bromhead. Devido à heterogeneidade em Asparagaceae, convencionou-se um sistema de subfamília, em que Agavaceae passou a ser denominada como Agavoideae e reclassificada como subfamília de Asparagaceae (Chase et al., 2009).

Agavoideae é composta por monocotiledôneas, endêmicas da América e encontram-se difundidas do sul do Canadá à Bolívia e Paraguai, incluindo as Antilhas. O México é o centro de maior riqueza e diversidade de agaves e, das 340 espécies conhecidas, 261 (76%) são encontradas no México, sendo 70% destas endêmicas (Garcia-Mendoza, 2011; García-Mendoza e Chávez-Rendón, 2013). O gênero *Agave*, constituído de 155 espécies (e mais de 200 variedades), 75% sendo nativas do México (Kulus, 2014; Qadir et al., 2017).

Agave é um gênero poliploide e pode formar séries euploides de 2x, 3x, 4x, 5x e 6x, com número cromossômico básico $n = x = 30$ (Palomino et al., 2003), que são alterações numéricas que envolvem mais de dois conjuntos cromossômicos por cariótipo (Doughty, 1936; Ruiz e Garay, 2002).

As espécies do gênero *Agave* são perenes, semixerófilas, crescem em solo com pH neutro ou levemente alcalino, necessitam de clima quente e grande luminosidade. As mesmas são adaptadas a regiões semiáridas, por serem altamente resistentes às estiagens prolongadas, apresentando estruturas peculiares de defesa contra as condições de aridez: folhas carnosas, número reduzido de estômatos, epiderme fortemente cutinizada e metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), o que permite a redução do consumo total de água e transpiração, pois a absorção de CO_2 ocorre durante a noite e a assimilação do açúcar pela fotossíntese durante o dia. O sisal utiliza essa via de metabolismo

com abertura estomática durante a noite devido à menor evapotranspiração e melhor eficiência hídrica nas baixas temperaturas noturnas (Black e Osmond, 2003; Abraham et al., 2016).

As plantas não apresentam caule (acauléscente), apenas um eixo principal (pseudocaule) de estrutura lenhosa que pode atingir até 1,2 m de comprimento e 20 cm de diâmetro, sobre o qual as folhas são inseridas (Silva et al., 2008; Zhang et al., 2014). As folhas possuem coloração verde escura, são lanceoladas, suculentas e contêm espinhos de coloração marrom escuro em sua extremidade. Podem atingir de 1,2 a 1,6 m de comprimento e 10 a 15 cm de largura na sua parte mediana, apresentando-se inseridas no pseudocaule na forma de espiral ascendente formando rosetas (Silva et al., 2008; FNAI, 2017).

No ápice do pseudocaule forma-se um pedúnculo floral de 7 - 9 m de altura, flores verde-amareladas com 7 cm de largura e hermafroditas, dispostas em cachos situados no final de cada ramo da panícula. Após a queda das flores, ocorre a emissão de pequenas plantas (bulbilhos) que se desenvolvem nas inflorescências e caem no chão após a floração, formando novas plantas (Silva et al., 2008; FNAI, 2017). É caracterizada como monocárpica, e após o aparecimento das flores o ciclo vegetativo termina. O tempo de vida útil varia de 8 a 20 anos (Tewari et al., 2014).

O fruto é uma cápsula oblonga, trilobular, com pericarpo rígido, e as sementes raramente são férteis (Martínez-Salvador et al., 2005). Estas encontram-se localizadas no interior do fruto, são delgadas, de tonalidade preta, lustrosa e de forma triangular, diferenciando-se das sementes estéreis que possuem coloração branca. Embora os dados de autocompatibilidade sejam escassos, acredita-se que a maioria das espécies sejam autocompatíveis e alguns estudos em *Agave* (Eguiarte et al., 2000; Molina-Freaner e Eguiarte, 2003) sugeriram que pode haver algumas barreiras pré-zigóticas à reprodução, embora seja difícil descartar intensa depressão endogâmica (Eguiarte et al., 2000; Slauson, 2001).

Todavia, as espécies do gênero também apresentam reprodução assexuada, propagando-se vegetativamente, como *A. tequilana*, *A. americana*, *A. fourcroydes* e *A. sisalana*. A propagação pode ser via estolões derivados do rizoma, que são emitidos pela planta-mãe (Nava-Cruz et al., 2015), que geram os rebentos, ou por bulbilhos produzidos na inflorescência, dependendo da

espécie (Lema-Ruminska e Kulus, 2014). Conforme Binh et al. (1990), os bulbilhos desenvolvem-se de meristemas axiais da inflorescência, na base das flores, e se desprendem da planta como uma forma de assegurar a propagação da espécie. No entanto, é preciso aproximadamente 20 a 30 anos de crescimento vegetativo até a planta adulta atingir o estágio reprodutivo. Os estolões derivados dos rizomas desenvolvem-se em seis anos e conservam as características genéticas da planta-mãe, que pode ser uma vantagem para a uniformidade do cultivo, mas representa grande desvantagem pela perda de variabilidade genética da espécie e por maior suscetibilidade a fatores fitossanitários (Robert e Garcia, 1985).

Os agaves têm sido uma fonte renovável de alimentos, bebidas (tequila), fibras (sisal), silagem para gado, drogas (saponinas, esteróis, esteroides alcaloides e alcaloidalaminas), plantas ornamentais (devido à sua forma distinta e cor) e seus produtos úteis (Kulus, 2014; Qadir et al., 2017). Dentre as espécies constituintes do gênero *Agave*, de relevância econômica, destacam-se: *A. utahensis*, *A. vilmoriniana*, *A. deserti*, *A. fourcroydes*, *A. lechuguilla*, *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. mapisaga* (Davis et al., 2010) e a espécie em estudo *A. sisalana* e o agave híbrido 11648, fornecedoras de fibras vegetais duras.

Agave sisalana

Agave sisalana é originária do continente norte-americano e das Ilhas Caraíbas (Silva et al., 2007). O nome “sisal” foi emprestado de uma cidade portuária em Yucatan, Maya, México, e significa “água fria” (Rosário et al., 2011). O sisal é uma espécie pentaploide, herbácea, com apenas um eixo principal, pseudocaulo curto situado no nível do solo, no qual as folhas se inserem e armazenam água e nutrientes. As folhas são longas, rígidas, convexas e de coloração verde. As folhas de *Agave sisalana* são carnosas, com células epidérmicas fortemente cutinizadas, são anfiestomáticas, apresentam estômatos tetracíticos, longas câmaras subestomáticas, que podem atingir a terceira ou quarta camada de células do mesofilo. Isso possibilita baixas taxas de transpiração, devido à baixa densidade estomática e alta resistência cuticular e subestomática. A densidade média estomática foi relatada em 11 estômatos/mm². O mesofilo é isobilateral e constitui-se de epiderme

uniestratificada, além de possuir papilas, flanges cuticulares e feixes vasculares colaterais dispostos alternadamente e acompanhados por bainha de fibras. A raiz apresenta velame, córtex com células grandes e arredondadas e três camadas de esclereídes junto à endoderme unisseriada. O rizoma é do tipo atactostelo e não apresenta endoderme (Neto e Martins, 2012). Possui comprimento médio entre 90 cm e 160 cm, embora possam alcançar até dois metros (Figura 1) (Silva et al., 2008; Botura, 2011).



Figura 1. Plantação e inflorescência de *Agave sisalana*, localizada na região sisaleira da Bahia. Fonte: Soares, A.C.F.

O sisal é uma planta de ciclo perene, que floresce apenas uma vez durante seu ciclo vegetativo e essa inflorescência permanece até a morte da planta, em média de 10 a 15 anos de ciclo (Debnath et al., 2010; Botura, 2011).

A reprodução ocorre por duas vias: sexual e assexuada. Pela via sexual, a produção de sementes viáveis é rara, sendo considerada como um clone estéril, devido às perturbações ocorridas na meiose (Brown, 2002). Segundo

Ewusie e Ghatak, (1971), a reduzida viabilidade das sementes é devido ao pareamento meiótico irregular, que pode estar associada à condição pentaploide, como confirmado por Queiroz et al. (2012) e Ramos (2014) que verificaram número cromossômico $2n = 5x = 136 - 150$ e cariótipo pentaploide $2n = 5n = 47$ cromossomos. A via assexuada ocorre por propagação vegetativa, mediante a emissão de bulbilhos e formação de estolões oriundos de rizoma.

A exploração da cultura é principalmente baseada na extração de fibras da folha de sisal, que equivalem de 4% e 5% da massa fresca, e o restante é considerado resíduo, sendo composto de água, tecido parenquimatoso, fibras curtas, polissacarídeos, compostos inorgânicos e metabólitos secundários (Sharma e Varshney, 2012; Zhang et al., 2014).

A cultura de sisal tem sido fortemente impactada pela doença conhecida como podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018), que tem contribuído para a diminuição contínua dos plantios de sisal. Uma vez infectado por *Aspergillus welwitschiae*, o pseudocaule da planta de sisal começa a apodrecer (Figura 2). Os tecidos internos da planta adquirem uma coloração parda a marrom com uma borda avermelhada, ou totalmente avermelhado. Com o progresso da doença, o pseudocaule apodrece e as folhas se tornam amareladas e murchas e, com o total apodrecimento do caule, a planta morre e tomba (Duarte et al., 2018).



Figura 2. Plantas de *Agave sisalana* infectadas por *Aspergillus welwitschiae*, apresentando o sintoma da doença: A- Planta adulta sintomática com folhas cloróticas (amarelecimento das folhas) (seta vermelha) ao lado de plantas adultas saudáveis. B- Planta adulta morta devido a infecção fúngica (seta vermelha). C- Corte detalhando da base das folhas com lesões necróticas e cor avermelhada dos tecidos; D- Visão externa do pseudocalue infectado apodrecido e tombamento. E- Visão interna do pseudocalue infectado, com coloração avermelhada típica da infecção fúngica. Fonte: Soares, A.C.F.

Agave híbrido 11648

A Agave híbrido 11648 é uma planta resultante do retrocruzamento de (*A. amaniensis* × *A. angustifolia*) × *A. amaniensis* (Dahal et al., 2003; Deng et al., 2019; Huang et al., 2019). A primeira se caracteriza por apresentar folhas grandes e de boa conformação e, a segunda, por produzir elevado número de folhas (Salgado et al., 1979). O híbrido 11648 é amplamente plantado em muitos países; é diploide e tem folhas lanceoladas verde-azuladas. O comprimento potencial das folhas atinge 120-150 cm e a largura potencial varia entre 11 a 15 cm. A planta possui um espinho marrom escuro na ponta de cada folha e ausência de espinhos nas margens das folhas (Figura 3), as quais são envoltas

em fina camada de cera. Durante seu ciclo de vida, de 8 a 13 anos, a planta produz 560-650 folhas e 4,73 - 5,96 toneladas de fibra seca por hectare/ano, dependendo das condições ambientais, manejo da lavoura e idade da planta. (Jamil et al., 2019).

O híbrido 11648 requer solos e ricos em cálcio, clima seco, com precipitações médias de 800 a 1.200 mm por ano (FUDECO, 2008). A emissão de rebentos ou filhotes, é maior no híbrido quando comparado com o *A. sisalana*. Entretanto, a emissão de pendão floral é menor no híbrido 11648 (Silva et al., 2008).

Possui produção de folhas e fibras equivalente a duas ou três vezes à do sisal comum (Salgado et al., 1979), sendo superior também na produtividade de fibras por hectare e no maior potencial de produção. No entanto, nos quesitos resistência e qualidade da fibra, ele é significativamente inferior (Silva et al., 1999).



Figura 3. Plantação de híbrido 11648, localizada em Conceição do Coité, na região sisaleira da Bahia, Brasil. Fonte: Soares, A.C.F.

A literatura descreve que o híbrido 11648 é acometido pelo fungo *Phytophthora nicotianae* (Wienk, 1968; Gao et al., 2014; Setyo-Budi et al., 2017),

causador da doença da zebra e que resulta em perdas substanciais de mudas e considerável redução de rendimento em todo o mundo (Gao et al., 2014). Entretanto, no Brasil não há descrição dessa doença. As áreas de plantação do sisal no país são afetadas pela podridão vermelha em *A. sisalana*, causadas pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018). Embora, o híbrido 11648 seja mais resistente à podridão vermelha (Moreira e Vieira, 1999), pode ser infectada pelo fungo, como ilustrado na Figura 4. Porém, um dos grandes desafios para as plantações de híbrido 11648 é a disponibilidade de mudas, pois a reprodução sexuada por sementes e assexuada por bulbilhos é rara e baixa propagação assexuada por rebentos.



Figura 4. Plantas de Agave híbrido 11648 infectada por *Aspergillus welwitschiae*, apresentando o sintoma da doença: A- Planta adulta sintomática com folhas cloróticas e murcha (seta vermelha) ao lado de plantas adultas saudáveis. B- Planta adulta morta (tombada), com pseudocaule de coloração avermelhada típica da infecção fúngica e apodrecido (seta vermelha). Fonte: Soares, A.C.F.

Importância econômica

O sisal é considerado a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo. No cenário mundial, dados mais recentes destacam o Brasil como principal produtor mundial de fibras de sisal, alcançando em 2018 produção de 80.000 toneladas (FAO, 2020). O estado da Bahia detém a maior produção de fibras de sisal cerca de 95,2% da produção brasileira (IBGE, 2020; SINDIFIBRAS, 2020), gerando renda para os agricultores familiares, e por isso assume dentro do contexto social, importante papel como agente de fixação do homem na região.

Possui perspectivas de uso e aplicabilidade em várias áreas, como artesanal, farmacêutica, automobilística, construção civil, indústrias química e cosmética e biocombustíveis. O uso da fibra destaca-se na produção de cordas, fios, tapetes, vassoura e papel (Botura et al., 2013). Na indústria da construção civil, entre as fibras vegetais que estão sendo usadas, as fibras de sisal têm um lugar proeminente por várias razões, como baixo custo, boa qualidade térmica e acústica, propriedades de isolamento, excelente resistência à tração, alta tenacidade e resistência à abrasão. Essas características possibilitam as fibras de sisal serem usadas em reforço de compósitos cimentícios, atualmente considerados um dos mais promissores materiais em tecnologias de engenharia sustentável e como reforço em compósitos com matriz polimérica, pois reduzem a propagação de fissuras, controlando sua abertura, podendo atrasar ruptura de elementos de concreto (Izquierdo et al., 2017).

O resíduo proveniente da extração de fibras do sisal ainda está largamente inexplorado, apesar de estudos indicarem para uso na indústria química e farmacêutica. Os subprodutos derivados da extração das fibras podem ser utilizados na alimentação animal de bovinos e caprinos e na indústria química no fornecimento de gorduras, cera, glicosídeo, álcool, ácidos e adubos (Godim e Souza, 2009). Substâncias como a pectina, podem ser aplicadas na indústria alimentícia, proporcionando aumento da viscosidade e desempenhando um papel de estabilizador em alimentos e bebidas. Outros compostos naturais com diversas atividades biológicas também foram quantificados, como o ácido succínico, flavonoides, saponinas e esteroides (Botura et al., 2013; Santos et al., 2015). A literatura relata vários efeitos biológicos, incluindo propriedades antimicrobianas (Jener et al., 2009), anti-inflamatórias (Dunder et al., 2010), anti-helmínticas (Domingues et al., 2010) e nematocida (Jesus et al., 2014).

Além dos compostos supracitados, estudos mostram a presença de carboidratos (Maran e Priya, 2015; Zhange et al., 2014), compostos fenólicos (Chen et al., 2009), antioxidante e surfactante (Stojiljković et al., 2016), polissacarídeos neutros (SP1 e SP2) (Zhang et al., 2013; Zhang et al., 2014), monossacarídeos como: ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose, além da presença do D-manitol (Branco et al., 2010), os quais apresentam um perfil promissor como fonte de ativos para veiculação em formulações cosméticas para cuidados da pele por possuir atividades como hidratante (Barreto, 2017).

Cultura de tecidos vegetais

A biotecnologia pode ser definida como a utilização de células e moléculas biológicas para a solução de problemas, produção de produtos e processos úteis, com potencial industrial em diversas áreas do conhecimento (Kreuzer e Massey, 2002). A biotecnologia vegetal tem auxiliado no desenvolvimento da tecnologia de melhoramento de plantas e explora, em grande parte, o DNA para selecionar algumas características (genes) de interesse, que podem contribuir para o aumento da produção e produtividade de plantas com melhor qualidade fotossanitária (Oliveira, 2012).

O sucesso da biotecnologia vegetal depende da importância fundamental de técnicas de cultura de tecidos vegetais. Entender a biologia básica de plantas é um pré-requisito para a utilização adequada do sistema vegetal ou partes do mesmo.

A cultura de tecidos é o cultivo asséptica *in vitro* de células, tecidos, órgãos ou planta inteira sob condições nutricionais e ambientais controladas, muitas vezes para produzir os clones de plantas (Hussain et al., 2012). O desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos tem como base a totipotência, em que cada célula somática vegetal possui toda a informação genética necessária para produzir uma planta perfeita (FEHÉR, 2019).

Entre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a técnica de micropropagação é a multiplicação rápida de uma planta selecionada usando técnicas de cultura *in vitro* (SINGH, 2015).

A propagação se dá por métodos de reprodução vegetativa ou assexuada. Nesse caso, as novas plantas e a planta-mãe são geneticamente idênticas entre si, uma vez que, a propagação clonal refere-se à multiplicação de cópias de plantas geneticamente idênticas (Bhatia e Sharma, 2015).

A micropropagação começa com a seleção de tecidos vegetais (explante) de uma planta saudável, planta-mãe vigorosa. Qualquer parte da planta (segmentos de folha, meristema apical, raiz) pode ser usado como explante (Hussain et al., 2012), segmentos hipocótilos, epicótilos, cotilédones, flores, folhas, grãos de pólen, embriões, óvulos, nós e gemas axilares ou apicais (Cid, 2010). Para espécies do gênero em estudo, a literatura relata que a principal fonte de explante é o pseudocaule, em segmentos na forma de cubos, discos e camadas finas de células (Thin Cell Layer; TCL) (Robert et al., 2005; Rios, 2007; Monja-Mio e Robert, 2013; Carneiro et al., 2014).

A técnica TCL é composta de explantes de tamanho pequeno que são seccionados longitudinalmente (ITCL) com 0,5 a 1 mm de largura e 5-10 mm de comprimento ou transversalmente (tTCL) (0,1-5 mm) de 5 diferentes órgãos vegetais (caules, cotilédones, embriões, folhas ou florais) (Chugh, 2009). Os micros TCLs, tem alguns micrômetros de espessura (usando um micrótomo), que pode facilmente se tornar necrótico e ser contaminado (Lee-Stadlemann et al., 1989). O traço comum entre ITCL e tTCL é sua fina espessura, um explante com um número tão pequeno de células quanto possível. As condições ideais do meio de cultura adequado para a sobrevivência de TCLs são dependentes da espécie, e exigem o teste de todas as condições do sistema de cultura in vitro (incluindo reguladores vegetais, nutrientes, luz, osmolaridade e temperatura, entre outros (Tran Thanh Van, 1980; Tran Thanh Van, 2003).

Em espécies do gênero *Agave*, a resposta do explante a estímulos externos pode ser influenciada pela incisão realizada no pseudocaule, podendo não induzir novos brotos, a qual depende da localização da região meristemática (Robert et al., 2005). O tecido meristemático indiferenciado se encontra abaixo das folhas primordiais. Entretanto, se a região do meristema é muito pequena ou o explante é cortado deixando o meristema de lado, apenas alguns explantes geram novos brotos, permitindo inferir que a não ocorrência do processo morfogênico em explantes de *Agave*, não está associada a dormência, mas sim, pela falta de tecido meristemático viável em alguns dos explantes.

O meio de cultura para inoculação do explante, depende da espécie objeto de estudo e da finalidade da cultura. Conforme García-González et al. (2010), os meios de cultura comumente utilizados são WPM (Lloyd e McCown, 1981), B5 (Gamborg et al., 1968) e MS (Murashige e Skoog, 1962), em que geralmente a sua composição é estabelecida empiricamente a partir de um caso base. Muitos estudos de cultivo de células vegetais são baseados no meio de cultura MS, universalmente usado, principalmente para espécies do gênero *Agave* (Nikam et al., 2003; Rios, 2007; Portillo et al., 2012; Monja-mio e Robert, 2013; Carneiro et al., 2014).

O meio de cultura em sua composição básica contém sais inorgânicos macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores vegetais e uma fonte de energia, usualmente a sacarose, embora outros açúcares e hidratos de carbono complexos são às vezes empregados (Read e Preece, 2014). A sacarose é a melhor fonte de carbono, pois ela tem uma natureza lábil de calor e pode ser decomposta em grande parte em *D*-glicose e *D*-frutose após autoclavados, apenas parte da sacarose é deixada, que é mais propício a absorção e utilização. Além de proporcionar esqueletos de carbono e energia necessária ao desenvolvimento da planta, em certa medida, a fonte de carbono pode regular a pressão osmótica no meio de cultura (Wang et al., 2017).

Os reguladores vegetais, a concentração e o balanço destes são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento *in vitro* (Gueye et al., 2009). As auxinas, citocininas e as giberelinas são os reguladores de crescimento de plantas mais comumente usados (Hussain et al., 2012; Read e Preece, 2014). O tipo e o concentração de hormônios usados depende principalmente da espécie da planta, do tecido ou órgão cultivado e o objetivo do experimento (Hussain et al., 2012).

As citocininas estão associadas à divisão celular, quebra de dormência apical, indução, proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias, e dentre estas pode-se citar: 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), thidiazuron (TDZ), zeatina (ZEA), meta-topolina (mT) e isopenteniladenina (2iP). Por outro lado, as auxinas possuem ação na indução, alongamento celular, na diferenciação de raízes, indução de calos e embriogênese somática, tais como: ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolil-3-acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e 2,4-diclorofenoacético (2,4-D).

Organogênese direta e indireta

As técnicas de cultura de tecidos repousam em dois processos fundamentais de morfogênese: organogênese e embriogênese somática. A organogênese *in vitro* consiste em muitos aspectos, desde a percepção de reguladores vegetais, desdiferenciação de células diferenciadas para adquirir competência organogênica, reentrada de células quiescentes no ciclo celular e a organização da divisão celular para formar primórdios e meristemas de órgãos específicos (Sugiyama, 1999). A organogênese pode ser direta, se a parte organogênica é obtida diretamente dos explantes, ou indireta, se o processo organogênico ocorre a partir de calos previamente formados nos explantes iniciais (Vijaya e Giri, 2003; García-González et al., 2010).

Em geral, três fases são reconhecíveis, para um específico balanço de reguladores vegetais no controle da organogênese. Na primeira fase, as células do explante adquirem “competência” definida como a capacidade ou não para responder aos sinais dos reguladores de crescimento vegetal, a desdiferenciação. Na fase de indução, as células competentes são canalizadas e determinadas para a formação de órgãos específicos e o balanço de reguladores vegetais citocinina e auxina exerce sua ação na indução de broto e raiz. Na última fase, a diferenciação, os sinais não são mais necessários, pois as células encontram-se determinadas para formação de brotos ou raízes (Sugiyama, 1999; Davey, 2017).

A organogênese e a regeneração de plantas podem ser restritas a tipos ou tecidos celulares específicos, como mostrado em *Arabidopsis*, células guarda estomática, células basais de tricomas e células de periciclo de raízes o que pode refletir o estado particular de competência destas células (Geier e Sangwan, 1996; Naik e Chand, 2011). O processo organogenético como supracitado é influenciado pelo tipo de explante utilizado, bem como por fatores ambientais e químicos (por exemplo, os reguladores vegetais) (Kakani et al., 2008). O achado clássico de Skoog e Miller (1957), mostrando a importância entre a relação de auxina e citocinina (CK), ainda é o princípio norteador da organogênese *in vitro*. Uma alta razão de citocinina para auxina induz a organogênese da parte aérea, enquanto a proporção baixa oposta resulta no

desenvolvimento da raiz, e uma relação intermediária de auxina/citocinina pode resultar na formação de calos (Davey, 2017).

Subcultivo in vitro

Subcultivo é a divisão asséptica de uma cultura ou parte dessa já estabelecida in vitro e sua transferência para um novo meio de cultura (Leva e Rinaldi, 2012). O período desde o início de uma cultura ou subcultivo até o momento de sua transferência é às vezes chamada de passagem. A primeira passagem é aquela em que o explante ou inóculo original é introduzido (George, 2008). A realização de subcultivos tem como objetivo a obtenção de taxas rápidas de propagação de plantas influenciando a competência para o desenvolvimento da organogênese, desencadeando alterações no crescimento e desenvolvimento de brotações (Tiwari et al., 2002; George, 2008; Moura et al., 2012). Uma outra razão para o subcultivo é o acúmulo de metabólitos tóxicos, a exaustão do meio e desidratação do meio de cultura, promovido pelo crescimento vegetal em recipiente fechado. Assim, mesmo para manter a cultura deve ser transferida para meio de cultura novo (George, 2008).

O período de incubação comumente utilizado entre os subcultivos para a maioria das espécies é de quatro semanas. Entretanto, multiplicações de cinco a dez vezes podem ser atingidas num ciclo de quatro a oito semanas (Mantell et al., 1994). Segundo George (2008), o intervalo entre os subcultivos depende da temperatura na qual a cultura cresceu: a 25 °C, o subcultivo é normalmente necessária a cada quatro a seis semanas. O tempo entre os subcultivos e indução de brotos difere entre as espécies, podendo variar de três semanas a cada subcultivo como observado para *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schard (García-Ramírez et al., 2010) e *Tecomella undulata* (Varshney e Anis, 2011), cinco semanas em *Agave* ssp. (De-La-Peña et al., 2012), duas a três semanas com regulador vegetal e quatro a cinco semanas em meio sem regulador vegetal para *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' (Díaz-Martínez et al., 2012), três semanas em genótipos de morangueiro (Fonseca et al., 2013) e em *Agave angustifolia* Haw (Duarte-Aké et al., 2016).

Embora o subcultivo possa frequentemente ser continuado por muitos meses, sem que efeitos adversos se tornem aparentes, as culturas da maioria

das células desorganizadas e de algumas estruturas organizadas podem acumular células que são geneticamente modificadas. Isso pode fazer com que as características da cultura sejam alteradas e pode significar que algumas das plantas regeneradas da cultura não serão as mesmas da planta-mãe (George, 2008).

Para os genótipos em estudo, *A. sisalana* e o híbrido nº 11648 não há relatos na literatura sobre a influência dos subcultivos na taxa de multiplicação. Entretanto, em espécies do gênero *Agave* foi observada baixa similaridade, variações fenotípicas e metilação do DNA, após ciclos de multiplicação (Torres-Morán et al., 2010; De-La-Peña et al., 2012; Díaz-Martínez et al., 2012; Duarte-Aké et al., 2016).

Conservação *in vitro* de germoplasma

Germoplasma é o recurso genético ou banco de genes, de uso imediato ou com potencial de ser usado no futuro, onde são conservados os acessos de uma espécie (Carvalho et al., 2008; Chan, 2009). Em um sentido geral, germoplasma pode representar uma espécie, população, híbrido ou cultivar. Conservação de germoplasma pode assumir muitas formas, mas geralmente é classificado como '*in situ*' em áreas naturais, gerenciadas e fazendas, ou '*ex situ*' em centros de pesquisa ou instituições públicas e privadas, sob a forma de bancos de sementes, no campo ou explantes *in vitro*. Deve ser coletado, armazenado e gerenciado de forma que mantenha sua viabilidade, a quantidade e a diversidade para seu uso pretendido (Offord, 2017).

Existem recursos genéticos para os quais o armazenamento de sementes não é apropriado ou mesmo possível. Aquelas culturas que são normalmente propagadas vegetativamente, não produzem sementes viáveis, ou que produzem sementes de vida muito curta (recalcitrantes), devem ser conservadas por outros meios. Por essa razão, muito interesse tem sido focado na aplicação de cultura de tecidos ou técnicas *in vitro*, pois a utilização da técnica permite armazenar plantas *in vitro* por curtos períodos de tempo ou mais, se o subcultivo é realizado após certos intervalos (Offord, 2017).

A conservação *in vitro* pode ser dividida em dois sistemas básicos: criopreservação e crescimento lento. A criopreservação é basicamente definida como o armazenamento de material biológico em temperatura ultrabaixa (-196 °C) em nitrogênio líquido, mantendo a viabilidade celular e a capacidade de regeneração e crescimento, após os tecidos serem recuperados por meio de protocolos para a manipulação posterior (Kaczmarczyk et al., 2013). O crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo vegetal por alterações no ambiente de cultivo, com o decréscimo na intensidade da luz, fotoperíodo, trocas gasosas e temperatura de incubação da cultura, por modificações no meio de cultura, adição de reguladores vegetais, agentes osmóticos e redução dos componentes salinos e orgânicos (Arrigoni-Blank et al., 2014).

O sistema de crescimento lento tem a vantagem de prolongar o tempo entre subcultivos, para facilitar e tornar menos dispendiosa a manutenção de culturas viáveis por longos períodos de tempo, o que pode gerar redução nos custos com a mão de obra (o tempo de trabalho), os meios de cultura e os riscos de contaminação relacionados com a manipulação da cultura. Além disso, o armazenamento a médio prazo permite prolongar os intervalos entre subcultivos sem afetar a viabilidade (Ashmore, 1997; Pérez-Molphe-Balch et al., 2012). O crescimento lento permite que o material vegetal possa ser mantido com sucesso no mesmo meio de cultura por um a cinco anos, dependendo da espécie e do método usado (Sarasan et al., 2006; Reed et al., 2011; Pérez-Molphe-Balch et al., 2012; Pacheco et al., 2016). A restrição de crescimento pode ser promovida por meio de agentes indutores de estresse osmótico como, sacarose, manitol e sorbitol, ou usando inibidores de crescimento vegetal no meio de cultura como o paclobutrazol e ancimidol, com o objetivo de manter tecidos viáveis em condições de crescimento lento.

Agentes osmóticos

A sacarose, que é conhecida por ser um fator chave na estabilização de membranas, é o carboidrato mais frequentemente relatado no contexto de resposta ao estresse. O manitol e sorbitol que são denominados como polióis e podem imitar os envelopes de água em torno de macromoléculas e servem como sequestradores de radicais livres (Steinitz, 1999; Lipavska e Konradova, 2003).

São formas reduzidas de açúcares que provavelmente estão presentes em todas as espécies de plantas (Loescher et al., 1995; Leite et al., 2008). Os poliois mais comuns são derivados de açúcares hexose, nos quais o grupo aldose ou cetose é reduzido em um grupo hidroxila. Manitol e sorbitol (ou glucitol) são os poliois equivalentes das hexoses glicose e frutose, respectivamente, e são os hexitois mais frequentes nas angiospermas (Noiraud et al., 2001; Leite et al., 2008).

O manitol é um poliol isômero de sorbitol, sua forma quimicamente reduzida da manose encontra-se em mais de 70 diferentes famílias de plantas, bem como bactérias e fungos (Williamson et al., 2002). Este açúcar é sintetizado em folhas maduras via manose-6-P pela enzima NADPH-manose-6-P-redutase (M6PR) localizada no citosol, o qual está sob regulação do desenvolvimento e responde à influência da exposição à luz (Everard et al., 1993). O manitol é o poliol mais abundante na natureza, participando da translocação e armazenamento de metabólitos e proporcionando às plantas resistência contra a salinidade e estresse osmótico (Yamamoto et al., 1997; Leite et al., 2008), e também contra invasões por patógenos (Stoop et al., 1996; Leite et al., 2008).

O sorbitol, com nome sistemático d-glucitol, é um álcool de açúcar também de 6 carbonos, o qual é sintetizado nas plantas através da redutase aldose-6-fosfato de NADPH-dependente, que converte glicose-6-fosfato a sorbitol-6-fosfato (Negm e Loescher, 1981), clivado por fosfatases endógenas não específicas para produzir o sorbitol. Os precursores necessários são citossólicos, e parece que o acúmulo de sorbitol a níveis substanciais neste compartimento torna-se tóxico, causando necrose tecidual, nanismo e defeitos de desenvolvimento (Sheveleva et al., 1998; Deguchi et al., 2004; Patrick et al., 2012).

Os carboidratos e os açúcares álcoois não possuem grupos funcionais aldeído e cetona, tornando-os adequados para uma gama de funções celulares, moléculas de transporte e de armazenamento (Merchant e Richter, 2011). Devido à sua natureza como solutos compatíveis, eles estão envolvidos no ajuste osmótico das células e, portanto, desempenham papel importante sob estresse osmótico (Brown e Simpson, 1972; Vítová et al., 2002). Segundo, Noiraud et al. (2001) e Dumschott et al. (2017), os poliois, com baixo peso molecular, alta solubilidade e não-redutibilidade, são substratos adequados para enzimas de translocação e seu acúmulo resulta em melhor tolerância ao estresse

abiótico, como verificado para as espécies *Saccharum* sp. (Marino et al., 2003); *Lycopersicon esculentum* cv. UC82B (Cortina e Culiáñez-Macià, 2005); *Malus domestica* e *Asarina scandens* (Reidel et al., 2009), na espécie em estudo *Agave sisalana* (Branco et al., 2010; Santos et al., 2015), *Oropetium thomaeum* (Zhang et al., 2018); gêneros: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* e *Juniperus* (Sarvin et al., 2018).

Na cultura de tecidos vegetais, a sacarose, sorbitol e manitol são usados em técnicas de conservação *in vitro*, como promotores de crescimento lento, a exemplo: *Smallanthus sonchifolius* (Skalova et al., 2012), *Hancornia speciosa* Gomes (Santos et al., 2011); *Saccharum* spp. (Bello-Bello et al., 2014), *Syngonanthus mucugensis* (Brito et al., 2011) e *Agave* ssp. (Balch et al., 2012). Atuam pela indução de estresse osmótico, com a adição dos osmorreguladores no meio de cultura, que modificam o potencial da água no meio de cultura, e captam o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Arrigoni-Blank et al., 2014).

Inibidor de crescimento vegetal

Paclobutrazol (PBZ) (2RS, 3RS) -1- (4-chlorofenil) -4, 4-dimetil-2- (1H 1,2,4-triazol-1-il) pentan-3-ol, é um inibidor de crescimento de plantas do grupo dos triazol, classificado como inibidor de amplo espectro de biossíntese de giberelina (GA) (Davis e Curry, 1991). A ação primária do PBZ é inibir a atividade da ent-kaureno, enzima da via biossintética de GA, que catalisa a oxidação do ent-kaureno em ácido caurenóico (Kondhare et al., 2014).

Os triazois afetam a via isoprenoide e alteram os níveis de certos hormônios vegetais por inibir a biossíntese de esterol e giberelina (Khan et al., 2009), reduzindo a evolução do etileno e aumentando os níveis de citocinina (Kamountsis e Chronopoulon-Sereli, 1999). As plantas tratadas com triazol têm um sistema de eliminação de radicais livres mais eficiente que permite desintoxicar o oxigênio ativo (Manivannan et al., 2007). Este composto pode afetar marcadamente o crescimento das plantas e desenvolvimento, alterando a taxa fotossintética e modificando os níveis de fito-hormônios (Kim et al., 2012), resultando em redução da altura da planta (Davis et al., 1988; Berova e Zlatev, 2000), aumento do teor de clorofila (Tekalign e Hammes, 2004) e maior acúmulo de carboidratos em brotos e raízes (Mehouachi et al., 1996; Todici et al., 2005).

Devido a ações inibitórias no crescimento das plantas o paclobutrazol, tem sido usado em estudos de conservação in vitro, como agente de crescimento lento em culturas *Solanum tuberosum*, 'Grande Naine' (*Musa AAA*) (Albany et al., 2005), *Anadenanthera colubrina* (Nepomuceno et al., 2007), *Syringa* × *hyacinthiflora* (Cui et al., 2009), *Saccharum* spp. (Bello-Bello et al., 2014).

A literatura científica indica a importância de paclobutrazol no controle do crescimento vegetativo (Tekalign e Hammes, 2005), pois melhora a capacidade fotossintética, o balanço hídrico das folhas (Berova e Zlatev, 2000; Jaleel et al., 2007; Mobli e Baninasab, 2008; Zheng et al., 2012), aumenta a espessura foliar e da epiderme (Sankar et al., 2013), aumenta o teor de clorofila e a taxa de sobrevivência (Cui et al., 2009), o que reflete em uma melhor eficiência do transplante de plantas micropropagadas para condições de ambiente natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albany N.R et al. Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after in vitro multiplication with growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.l.], v.83, p.357–36, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-005-6307-z>.
- Abraham, P et al. Dinâmica temporal de transcritos, proteínas e metabólitos na planta CAM Agave . *Nature Plants* 2, 16178, 2016. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.178>
- Arrigoni-Blank, M.F et al. In Vitro Conservation of sweet potato genotypes. *The Scientific World Journal*, [S.l.], v. 2014, p.1-7, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/208506>.
- Ashmore, S.E. Status Report on the Development and Application of In Vitro Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, 1997. 67p.
- Barreto, S.M. Utilização do subproduto do beneficiamento do sisal (*Agave sisalana* Perrine): desenvolvimento de nanoemulsões cosméticas e avaliação da segurança e eficácia. 2017. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- Bello-Bello J et al. Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación in vitro de caña de azúcar. *Agrociencia*, [S.l.], v.48, p.439-446, 2014.

Berova M.; Zlatev Z. Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Growth Regulation*, [S.I.], v.30, p.117–123, 2000. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006300326975>

Binh, L. T. et al. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [s.l.], v. 23, n. 1, p.67-70, out. 1990. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00116091>.

Black, C.C.; Osmond, C.B. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: working the night shift. *Photosynthesis Research*, [S.I.], v. 76, n. 1/3, p.329-341, 2003. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1024978220193>.

Bogler, D.; Pires, C.; Francisco-Ortega, J. Phylogeny of Agavaceae based on ndhF, rbcL, and its sequences. *Aliso*, [S.I.], v. 22, n.1, p.313-328, 2006. Claremont Colleges Library. <http://dx.doi.org/10.5642/aliso.20062201.26>.

Bogler, D.J.; Simpson, B.B. A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Systematic Botany*, [S.I.], v. 20, n. 2, p.191-205, 1995. <http://dx.doi.org/10.2307/2419449>.

Bogler, D.J.; Simpson, B.B. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *American Journal of Botany*, [S.I.], v. 83, n. 9, p.1225-1235, 1996. <http://dx.doi.org/10.2307/2446206>.

Botura, M.B. Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana*. 2011. 101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

Botura, M.B. et al. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, [S.I.], v. 192, n. 1-3, p.211-217, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.012>.

Branco, A et al. D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. *Industrial Crops and Products*, [S.I.], v. 32, n. 3, p.507-510, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.025>.

Bremer, B et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, [S.I.], v. 161, n. 2, p.105-121, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>.

Bremer, B et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, [S.I.], v. 141, n. 4, p.399-436, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>.

Brito, A.L et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação in vitro de sempre-viva. *Ciência Rural*, [S.I.], v. 41, n. 8, p.1354-1361, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782011000800010>.

- Brown, K. *Agave sisalana* Perrine. *Wildlands Weeks*, [S.I.], p.18-21, 2002. Disponível em: <<http://www.se-eppc.org/wildlandweeds/pdf/Summer2002-Brown-pp18-21.pdf>>. Acesso em: 22 de agosto de 2018.
- Carneiro, F.S et al. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, [S.I.], v. 44, n. 3, p.294-303, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/s1983-40632014000300005>.
- Carvalho, A.C.P et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant cell culture e micropropagation*, [S.I.], v.1, p. 22-29, 2011.
- Chase, M.W.; Reveal, J.L.; Fay, M.F. A subfamilial classification for the expanded Asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, [S.I.], v. 161, n. 2, p.132-136, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x>.
- Chen, Pi Yu et al. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules*, [S.I.], v. 14, n. 5, p.1789-1795, 2009. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14051789>.
- Cid, P.L.B. Cultivo in vitro de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303.p.
- Cortina, C.; Culiáñez-Macià, F.A. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, [S.I.], v. 169, n. 1, p.75-82, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.026>.
- Cui, H.; Gu, X.; Shi, L. In vitro proliferation from axillary buds and ex vitro protocol for effective propagation of *Syringa×hyacinthiflora* 'Luo Lan Zi'. *Scientia Horticulturae*, [S.I.], v. 121, n. 2, p. 186-191, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.017>.
- Davey, M.R. Organogenesis. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, [S.I.], p.448-454, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-394807-6.00145-3>.
- Davis T.D.; Curry E.A. Chemical regulation of vegetative growth, *Critical Reviews in Plant Sciences* [S.I.], v.10, p.151–158, 1991.
- Davis T.D.; Steffens G.L.; Sankhla N.; Triazole plant growth regulators. *In*: Janick J. (ed.). Oregon, USA: Hortic. Rev., Timber Press, 1988.
- Davis, S.C.; Dohleman, F.G.; Long, S.P. The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *Gcb Bioenergy*, [S.I.], v. 3, n. 1, p.68-78, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01077.x>.
- Debnath, M et al. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plants Research*, Nigéria, p.177-187, 2010. ISSN 1996-0875.

De-La-Peña, C et al. *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 203-203. 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-203>.

Deng G et al. Identification and expression of *SAUR* genes in the CAM plant *Agave*. *Genes (Basel)*, [S.I.], v.10, n.7, p.555, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10070555>.

Díaz-Martínez, M et al. Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science*, [S.I.], v. 185-186, p. 321-330, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.004>.

Domingues, L.F et al. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, [S.I.], v. 19, n. 4, p.270-272, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612010000400018>.

Doughty, L.R. Chromosome behaviour in relation to genetics of *Agave*. *Journal of Genetics*, [S.I.], v. 33, n. 2, p.198-205, 1936. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02982532>.

Duarte, E.A.A. et al. Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

Duarte-Aké, F et al. Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process. *Plant Cell Reports*, [S.I.], v. 35, n. 12, p. 2489-2502, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-016-2049-0>.

Dumschott, K et al. Post photosynthetic carbon partitioning to sugar alcohols and consequences for plant growth. *Phytochemistry*, [S.I.], v. 144, p.243-252, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.019>.

Eguiarte, L.E. Hutchinson. (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, [S.I.], n. 56, p.45-56, 1995. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.1463>.

Eguiarte, L.E.; Souza, V.; Silva-Montellano, A. Evolucion de la familia Agavaceae: filogenia, biologia reproductiva y genetica de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, [S.I.], v.66, p.131–150, 2000. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.1618>.

Everard, J.D.; Kann, S.C.; Loescher, W.H. Investigations into the salt tolerance of the mannitol producer celery. *Plant Physiology*. 99 S-28,1992.

Ewusie, J.Y.; Ghatak, J. Studies on reproduction and cytology of sisal (*Agave sisalana* Perrine ex engelm.). Ghana Journal of Science, [S.I.], v. 12, n. 1, p.42-50, 1971.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Sisal. Disponível em: <<http://www.naturalfibres2009.org/en/fibres/sisal.html>>. Acesso em: agosto. 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT database. 2016. <http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>. Acesso em: maio.2020.

Fehér, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. Frontiers In Plant Science, [S.L.], v. 10, p. 1-11, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>.

FNAI. Florida Natural Areas Inventory. *Agave sisalana*. Disponível: www.fnai.org. 2017. Acesso em: jul. 2020.

Fonseca, A.P da et al. Estabilidade fenotípica de genótipos de morangueiro submetidos a número variável de subcultivos in vitro. Ciência Rural, [S.I.], v. 43, n. 8, p. 1345-1350, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782013005000096>.

FUDECO. (Fundación para el Desarrollo de la Región Centro Occidental de Venezuela). Sisal H.11648. Establecimiento y plantación. Plan de desarrollo endógeno de la zona sisalera. 2007.

Gamborg, O.I.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental cell research, [S.I.], v. 50, n. 1, p.151-158, 1968. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).

Gao et al . Expression of a hevein-like gene in transgenic *Agave* hybrid n^o. 11648 enhances tolerance against zebra stripe disease. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Pctoc), [S.I.], v. 119, n. 3, p. 579-585, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0557-6>.

García-Mendoza, A. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F, v.88, p.1-95, 2011.

García-Mendoza, A.J.; Chávez-Rendón, C. *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo Striatae), una especie nueva de Oaxaca, México. Revista Mexicana de Biodiversidad, [S.I.], v. 84, n. 4, p.1070-1076, 2013. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.35241>.

García-Ramírez, Y et al. Efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos en la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Schrad. ex Wendl.. Biotecnología Vegetal, v.10, n.2. 2010. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/278>.

- Geier, T.; Sangwan, R.S. Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. *Plant Cell Reports*, [S.I.], v. 15, n. 6, p.386-390, 1996. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00232060>.
- Godim, T.; Souza, L. Caracterização de Frutos e Sementes de Sisal. Circular Técnica, 127. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. 6p.
- Gueye, B. et al. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways?. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.I.], v.98, n.1, p.47-58, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-009-9537-7>.
- Huang, X et al. De Novo Transcriptome assembly of *Agave* H11648 by Illumina sequencing and identification of cellulose synthase genes in *Agave* Species. *Genes (Basel)*, [S.I.], v.10, n.2, p.103, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10020103>.
- IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Rio de Janeiro, v.30 n.12 p.1-82, 2017.
- Izquierdo, I.S et al. Sisal fiber reinforced hollow concrete blocks for structural applications: Testing and modeling. *Construction and Building Materials*, [S.I.],v.151,p.98-112, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.06.072>.
- Jaleel, C.A et al. (2007) Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Process Biochemistry*, [S.I.], v. 42, n. 11, p. 1566-1570, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.006>.
- Jamil, A.H.; Marjani.; Yulianti, T. Sisal Fiber of *Agave* H11648 as a potential raw Material for ecofriendly textile. 3. (ed). *In: Proceeding Indonesian Textile Conference (International Conference)*, [S.I.], 12.v, 2019. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3470929>.
- Jener, D.G.S et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *African Journal of Biotechnology*, [S.I.], v. 8, n. 22, p.6181-6184, 2009. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb09.862>.
- Jesus, F.N et al. Control of the banana burrowing nematode using sisal extract. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 783–791, 2014. doi: 10.1007/s13593-014-0264-z
- Kaczmarczyk, A et al. Development of cryopreservation for *Loxocarya cinerea* - an endemic Australian plant species important for post-mining restoration. *CryoLetters*, v. 34, n. 5, p. 508-519, 2013.
- Kakani, A.; Li, G.; Peng, Z. Role of AUX1 in the control of organ identity during in vitro organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin

interaction in Arabidopsis. *Planta*, [S.I.], v. 229, n. 3, p.645-657, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-008-0846-6>.

Kamounsis A.P.; Chronopoulon-Sereli A.G. Paclobutrazol affects growth and flower bud production in gardenia under different light regimes. *HortScience*, [S.I.], v.34, p.674–5,1999.

Khan, M.S.H et al. Sterol biosynthesis inhibition by paclobutrazol induces greater aluminum (Al) sensitivity in Al-tolerant rice. *American Journal of Plant Physiology*, [S.I.], v.4, p.89–99, 2009. <http://dx.doi.org/10.3923/ajpp.2009.89.99>.

Kim, J et al. A comparative study of ethylene growth response kinetics in eudicots and monocots reveals a role for gibberellin in growth inhibition and recovery. *Plant Physiology*, [S.I.], v.160, p.1567–1580, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.205799>.

Kreuzer, H.; Massey, A. *Engenharia Genética e Biotecnologia*. 2ª ed., Editora Artmed. 2002.

Kulus, D. Micropropagation of selected Agave species. *PhD Interdisciplinary Journal*, [S.I.], p.75-84, 2014. <http://dx.doi.org/10.13140/2.1.1482.6565>.

Lee-Stadleman, O.Y et al. The formation of adventitious buds in vitro on micro-sections of hybrid Populus leaf mid veins, *Science [SI]*, 61, 263-272, 1989.

Leite, S.M.M et al. Boron influence on concentration of polyols and other sugars in Eucalyptus. *Revista Árvore*, [S.I.], v. 32, n. 5, p.815-820, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622008000500005>.

Lloyd, G.; Mccown, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, Washington, v.30, p.421-427, 1981.

Loescher, W. H. et al. Sugar alcohol metabolismo in source leaves. In: Madore, M. A.; Lucas, W. J. (Eds.). *Carbon partitioning and source-sink interactions in plants: current topics in plant physiology*. Rockville: American Society of Plant Physiologists Series, 1995. 13 v., 170-179p.

Manivannan, P et al. Propiconazole induced changes in antioxidant metabolism and drought stress amelioration in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, [S.I.], v.57, p.69–74, 2007.

Mantell, S.H.; Matthews, J.A.; Mckee, R. A. *Princípios da Biotecnologia em Plantas – uma introdução à engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: Soc. Bras. De Genética, 1994. 344p.

Maran, J.P.; Priya, B. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, [S.I.], v. 115, p.732-738, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.058>.

Marino, C.L et al. Putative metabolic pathway of mannitol and sorbitol and in sugarcane. *Scientia Agricola*, [S.I.], v. 60, n. 4, p.723-728, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162003000400017>.

Mehouachi J et al. Effects of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings, *J. Journal of Horticultural Sciences*, [S.I.], v.71, p.747–754,1996.

Mobli, M.; Baninasab, B. Effects of plant growth regulators on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of two almond rootstock seedlings. *Fruits*, [S.I.], v. 63, n. 6, p. 363-370, 2008. <http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2008032>.

Monja-Mio, K.M.; Robert, M.L. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, [S.I.], v. 49, n. 5, p.541-549, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>.

Moura, L.C.R et al. In vitro multiplication and elongation of vinhatico (*Plathyenia reticulata*). *Scientia Forestalis*, v. 40, p. 499-505. 2012.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, [S.I.], v. 15, n. 3, p.473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Naik, S.K.; Chand, P.K. Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: a review. *Plant Cell Reports*, [S.I.], v. 30, n. 5, p.707-721, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-010-0969-7>.

Negm, F.B.; Loescher, W.H. Characterization and partial purification of aldose-6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves. *Plant Physiology*, [S.I.], v.67, n. 1, p.139-142, 1981.

Nepomuceno, C.F et al. Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. *Revista Árvore*, [S.I.], v.33, n.3, p.481-490, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622009000300010>.

Nikam, T. D.; Bansude, G. M.; Kumar, K. C. Aneesh. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports*, [S.I.], v. 22, n. 3, p.188-194, 2003. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9>.

Noiraud, N.; Maurousset, L.; Lemoine, R. Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *The Plant Cell*, [S.I.], v.13, n.3, p. 695-705, 2001.

Offord, C.A. Germplasm Conservation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, [S.I.], p.281-288, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-394807-6.00046-0>.

Oliveira, A. A biotecnologia aplicada ao melhoramento genético vegetal: controvérsias e discussões. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, [S.l.], v. 10, n. 1, p.339-361, 2012. <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2012.101.339361>.

Pacheco, G et al. In vitro conservation of Passiflora —A review. Scientia Horticulturae, [S.l.], v. 211, p.305-311, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004>.

Patrick, J.W.; Botha, F.C.; Birch, R.G. Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. Plant Biotechnology Journal, [S.l.], v. 11, n. 2, p.142-156, 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12002>.

Pérez-Molphe-Balch, E.; Esparza, M.; Reyes, M. In vitro conservation of Agave spp. germplasm under slow growth conditions. Revista Fitotecnia Mexicana, [S.l.], v.35, n.4, p.279-287, 2012. ISSN: 0187-7380.

Pérez-Molphe-Balch, E.; Pérez-Reyes, M.E.; Larosa-Carrillo, M. L. In vitro conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. Haseltonia, [S.l.], v. 17, p.51-57, 2012. <http://dx.doi.org/10.2985/1070-0048-17.1.6>.

Portillo, L.; Olmedilla, A.; SantaCruz-Ruvalcaba, F. Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in Agave tequilana. Protoplasma, [S.l.], v. 249, n. 4, p.1101-1107, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-011-0354-6>.

Qadir, J.; Singh, S.; Kaloo, Z.A. A review on in vitro propagation of some medicinally important plant species of family Asparagaceae. International Journal of BioSciences & Technology, [S.l.], v.10, n.1, p.1-12, 2017.

Queiroz, S.R.O.D et al. Análise cromossômica em bulbilhos de sisal (*Agave* spp.) cultivados em diferentes municípios baianos, Brasil. Acta Botanica Brasilica, [S.l.], v. 26, n. 4, p.842-848, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062012000400013>.

Read, P.E.; Preece, J.E. Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, [S.l.], p.317-336, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00224-2>.

Reed, B.M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, [S.l.], v. 47, n. 1, p.1-4, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-010-9337-0>.

Reidel, E. J. et al. Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. Plant Physiology, [S.l.], v. 149, n. 3, p.1601-1608, 2009. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.134791>.

Rios, A.P.S. Estabelecimento, organogênese direta e aclimatização de sisal (*Agave sisalana* Perrine). 2007. f105p. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

Ríos-Ramírez, S.C et al., 2018. In vitro formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. Emirates Journal of Food and Agriculture, Vol?, 49-56. <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i1.1584>.

Robert, J.L.H-H et al. An efficient method for the micropropagation of Agave species manuel L. Ed: Victor M. Loyola-Vargas and Felipe, Vázquez-Flota. 2. ed. Plant cell culture, 2005.165p.

Robert, M.; Garcia, A. El cultivo de tejidos vegetales y su posible aplicación en el mejoramiento genético de las agaváceas. In: Cruz, C, et al. (Eds). Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves. Mérida: Centro de investigación científica de Yucatán, Merida, Yucatán México, 1985. 83-89p.

Rosário, F et al. Resíduos de sisal como reforço em compósitos de polipropileno virgem e reciclado. Polímeros, [S.I.], v. 21, n. 2, p.90-97, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282011005000021>.

Salgado, A.L.B.; Ciaramello, D.; Azzini, A. Melhoramento de Agave por hibridação. Bragantia, [S.I.], v. 38, n. 1, p. 1-6, 1979. <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87051979000100001>.

Sankar B.; Karthishwaran K.; Somasundaram R. Leaf anatomical changes in peanut plants in relation to drought stress with or without paclobutrazol and abscisic acid. Journal of Phycology, [S.I.], v.5, p.25-29, 2013.

Santos, J et al. Chemicals from *Agave sisalana* biomass: Isolation and identification. International Journal of Molecular Sciences, [S.I.], v. 16, n. 12, p.8761-8771, 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16048761>.

Santos, M.C et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação in vitro de segmentos nodais de mangabeira. Revista Ciência Agronômica, [S.I.], v. 42, n. 3, p.735-741, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-66902011000300020>.

Sarvin, B.A et al. A novel strategy for isolation and determination of sugars and sugar alcohols from conifers. Journal of Chromatography B, [S.I.], v. 1092, p.138-144, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.005>.

Setyo-Budi, U.; Marjani.; Purwati, R.D.; Murianingrum, M. Pelepasan Klon H11648 sebagai Varietas Unggul Tanaman Sisal. 2017.

Silva, O et al. Desempenho produtivo de oito genótipos de sisal. Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas. Campina Grande, v.11, n.2, p.71-75, 2007.

Silva, O.R.R.F et al. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. Circular técnico 123. Embrapa: Campina Grande, Paraíba, 2008.

Silva, O.R.R.F. et al. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. Circular Técnica 123. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 24p.

Silva, O.R.R.F.; Carvalho, O.S.; Santos, J.W.; Vieira, R.M. Estudo comparativo de algumas características de *Agave sisalana* Perrine e do híbrido 11648, na primeira colheita. Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas, [S.I.], v.3, n.2, 1999. 65-70p.

Singh, A. Micropropagation of plants. Plant biology and biotechnology, [S.L.], p. 329-346, 2015. http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_16.

Skalova, I.; Viehmannova, I.; Vitamvas, J. In vitro conservation of *Smalanthus sonchifolius* under slow-growth conditions. Agricultura Tropica Et Subtropica, [S.I.], v. 45, n. 3, p.147-150, 2012. <http://dx.doi.org/10.2478/v10295-012-0024-5>.

Skoog, F.; Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology. n.54, p.118–130, 1957.

Slauson, L. Insights on the pollination biology of Agave (Agavaceae). Haseltonia, [S.I.], v.8, p.10–23, 2001.

Steinitz, B. Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. Journal of Plant Physiology, [S.I.], v. 155, n. 1, p.1-1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0176-1617\(99\)80133-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0176-1617(99)80133-3).

Stojiljković, D.; Arsić, I.; Tadić, V. Extracts of wild apple fruit (*Malus sylvestris* (L.) Mill., Rosaceae) as a source of antioxidant substances for use in production of nutraceuticals and cosmeceuticals. Industrial Crops and Products, [S.I.], v. 80, p.165-176, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.023>.

Stoop, J.M.H.; Williamson, J.D.; Pharr, D.M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. Trends of Plant Science Review, [S.I.], v.1, n.5, p.139-144, 1996.

Sugiyama, M. Organogenesis in vitro. Current Opinion In Plant Biology, [s.l.], v. 2, n. 1, p.61-64, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266\(99\)80012-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266(99)80012-0).

Tekalign T.; Hammes P.S. Response of potato grown under non-inductive condition to paclobutrazol: shoot growth, chlorophyll content, net photosynthesis, assimilate partitioning, tuber yield, quality, and dormancy. Plant Growth Regulation, [S.I.], v.43, p.227–236, 2004.

Tekalign, T.; Hammes, P. S. Growth responses of potato (*Solanum tuberosum*) grown in a hot tropical lowland to applied paclobutrazol: 2. tuber attributes. New

Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, [S.I.], v. 33, n. 1, p. 43-51, 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.2005.9514329>.

Tiwari, S.K.; Tiwari, K.P.; Siril, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [S.I.], v. 71, n. 1, p.1-6, 2002. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1016570000846>.

Todic, S.; tesic, D.; beslic, Z. The effect of certain exogenous growth regulators on quality of grafted grapevine rooting. *Plant Growth Regulation*, [S.I.], v.45, p.121–126, 2005.

Torres-Morán, M.I et al. Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus in vitro culture. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture (Pctoc)*, [S.I.], v. 103, n. 3, p. 403-409, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9777-6>.

Tran Thanh Van, K. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers, *International Review of Cytology [SI]*, 32, 291-311, 1980.

Tran Thanh Van, K. Thin cell layer concept. In: Nhut, D.T. et al. (Ed.). *Thin cell layer culture system: regeneration and transformation application*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. 1-16p.

Varshney, A.; Anis, M. Improvement of shoot morphogenesis in vitro and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. *Acta Physiologiae Plantarum*, [S.I.], v. 34, n. 3, p. 859-867, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0883-9>.

Vitová, L et al. Mannitol utilisation by celery (*Apium graveolens*) plants grown under different conditions in vitro. **Plant Science**, [S.I.], v. 163, n. 4, p.907-916, out. 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452\(02\)00240-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452(02)00240-6).

Vijaya, L.; Giri, C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenosperma* and *A. villosa*. *Current Science*, [S.I.], v.85, n.11, p.1624-1629, 2003.

Wang, J et al. Production of active compounds in medicinal plants: From plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, [S.I.], v. 9, n. 2, p.115-125, 2017. [http://dx.doi.org/10.1016/s1674-6384\(17\)60085-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1674-6384(17)60085-6).

Williamson, J.D et al. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols - Multifunctional plant protection?. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, [S.I.], v.127, n. 4, p. 467-473, 2002.

Yamamoto, Y.T et al. Subcellular localization of celery mannitol dehydrogenase: a cytosolic metabolic enzyme in nuclei. *Plant Physiology*, [S.I.], v.155, n.4, p.1397-1403, 1997.

Zhang, M et al. Tissue culture-induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. *Plant Cell Reports*, [S.I.], v. 29, n. 1, p.51-59, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-009-0797-9>.

Zhang, Q.; Song, X.; Bartels, D. Sugar metabolism in the desiccation tolerant grass *Oropetium thomaeum* in response to environmental stresses. *Plant Science*, [S.I.], v. 270, p.30-36, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.004>.

Zhang, X.; Liu, L.; Lin, C. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. *Food Hydrocolloids*, [S.I.], v. 39, p.10-18, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.012>.

Zhang, X.; Liu, L.; Lin, C. Structural features, antioxidant and immunological activity of a new polysaccharide (SP1) from sisal residue. *International Journal of Biological Macromolecules*, [S.I.], v. 59, p.184-191, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.052>.

Zheng, R.; Wu, Y.; Xia, Y. Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium Oriental* hybrids 'Sorbonne'. *Journal Of Zhejiang University Science B*, [S.I.], v. 13, n. 2, p. 136-144, 2012. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1000425>.

ARTIGO 1

PROPAGAÇÃO CLONAL IN VITRO DE *Agave sisalana* Perr.¹

¹Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Scientia Horticulturae*, em versão na língua inglesa.

Propagação clonal *in vitro* de *Agave sisalana* Perr.

Autor: Priscila Tavares Fonseca

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

Resumo: A propagação *in vitro* de sisal é de grande valia para a multiplicação da espécie em escala comercial, produzindo mudas de boa qualidade fitossanitária. Este estudo teve o objetivo de estabelecer um protocolo de micropropagação com vistas a produção de plantas em larga escala de *A. sisalana*. Foram avaliados: 1- O estabelecimento e influência da posição de TCL (Thin Cell Layer) na multiplicação *in vitro*, empregando as concentrações 0,0; 13,32; 26,64; 39,96; 53,28 μM de BAP; 3- O subcultivo, adicionando as concentrações 6,66; 13,32; 19,98; 26,64; 39,96; 53,28 μM de BAP; 4- O enraizamento, utilizando explantes com 10 mm e 30 mm de altura, nas concentrações 0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 μM de AIB e; 5- Aclimatização. O explante a partir de rebento mostrou-se mais responsivo e a concentração de 13,32 μM de BAP (18,41 brotos por planta) foi eficiente para os dois explantes, assim como os TCLs AP (apical) e MI (mediano). Nos subcultivos a indução de brotações em sisal obteve média 10,10 brotos por explante, entretanto, induziu a formação de culturas nodulares e calos friáveis. O uso de explantes com altura superior a 30 mm de altura e 12 μM de AIB otimizaram o processo de rizogênese, promovendo 100% de sobrevivência das plantas após transferidas para casa de vegetação.

Palavras-chave: Sisal, Morfogênese, Subcultivo, Citocinina, Auxina.

In vitro clonal propagation of *Agave sisalana* Perr.

Author: Priscila Tavares Fonseca

Adviser: Ana Cristina Fermino Soares

Abstract: The in vitro propagation of sisal is of great value for the large scale multiplication of this species, with the production of plantlets with good phytosanitary quality. This study aimed to evaluate the phytohormones 6-benzylaminopurine (BAP) and indolbutyric acid (IBA) on in vitro morphogenesis in explants from offshoots and bulbils of *A. sisalana*. Six experiments were carried out: 1- Establishment and influence of the disk segment position (TCLs) for in vitro multiplication, using BAP concentrations of 0.0; 13.32; 26.64; 39.96; 53.28 μM ; 2- Subculture, with the concentrations 6.66; 13.32; 19.98; 26.64; 39.96; 53.28 μM of BAP; 4- Rooting, using 10.0 mm and 30.0 mm high explants, in concentrations 0.0; 3.0; 6.0; 9.0; 12.0 μM IBA e; 5- Acclimatization. Explant offshoots proved to be more responsive, and the concentration of 12.32 μM of BAP (18.41 shoots for plant) was efficient for both explants, as well as the TCLs AP and MI. Activated carbon reduced the proliferation of shoots. In the subcultures, the induction of shoots in sisal obtained an average of 10 shoots for explant, but it induced the formation of nodular cultures and friable calluses. The use of explants with height greater than 30 mm and the 12 μM of IBA optimized the rhizogenesis, promoting 100% plant survival after being transferred to the greenhouse.

Keywords: Sisal, Morphogenesis, Subculture, Cytokinin, Auxin.

INTRODUÇÃO

As espécies de *Agave* são amplamente cultivadas em áreas tropicais para a produção de tequila e fibras duras vegetais (Deng, 2019). *Agave sisalana* é originária do México e largamente cultivada na região semiárida do Nordeste do Brasil, principalmente para extração de fibras duras vegetais.

É uma espécie pentaploide, com ciclo de crescimento vegetativo lento, e a reprodução geralmente ocorre por via assexuada, com surgimento de bulbilhos, que são brotações emitidas na inflorescência, que ocorre uma vez na planta, após 10 a 15 anos do plantio (Debnath et al., 2010; Botura, 2011) e de rebentos que surgem a partir dos estolões oriundos do rizoma.

A cultura é suscetível ao agente patogênico *Aspergillus welwitschiae*, causador da doença podridão vermelha, que tem como consequência o apodrecimento do pseudocaule e morte da planta (Duarte et al., 2018). A disseminação da doença por mudas de sisal do tipo rebento, contaminadas pelo *A. welwitschiae*, tem culminado na diminuição contínua de plantações de sisal na região semiárida da Bahia, refletindo no declínio de 55,79% na produção de fibras de sisal, com produção de 180.948 toneladas em 2016 (IBGE, 2021) e 80.000 toneladas em 2021 (FAO, 2021).

O atual cenário na região sisaleira limita a propagação convencional da espécie cultivada, afetando toda a cadeia produtiva de sisal. O uso de ferramentas biotecnológicas, como a cultura in vitro de células, tecidos ou órgãos vegetais, é uma alternativa complementar aos métodos convencionais para a produção de mudas saudáveis. A partir da tecnologia de micropropagação é possível suprir à demanda de plantas de qualidade fitossanitária para estabelecer plantações, aumentar a produtividade e reduzir os custos de produção (Ríos-Ramírez et al., 2018). A micropropagação constitui-se em uma alternativa para solucionar a baixa disponibilidade de mudas, devido ao longo ciclo de desenvolvimento da planta e acometimento pela doença podridão vermelha.

Para que o processo de propagação in vitro ocorra de maneira satisfatória é fundamental o controle do balanço hormonal (Pasa et al., 2012), e segundo Schuch e Erig (2005), o uso de reguladores vegetais, juntamente com as

formulações básicas dos meios de cultura, é imprescindível para que se obtenha êxito na propagação de culturas *in vitro*.

O sistema de cultura de tecidos fornece todos os nutrientes, energia e água necessários para o crescimento da planta ou explante através do meio de cultura. Além disso, as condições de incubação controladas fornecem condições otimizadas de luz e temperatura para promover o crescimento (Phillips e Garda, 2019). O desenvolvimento da planta pode então ser manipulado pela adição de reguladores de crescimento vegetal em estágios específicos de crescimento ou maturação. Respostas de desenvolvimento adicionais são estimuladas através da adição de reguladores de crescimento, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno (ou, mais precisamente, antietileno) ou ácido abscísico. Para a maioria das aplicações, auxinas e citocininas são os mais importantes desses reguladores de crescimento vegetais (Phillips e Garda, 2019).

As citocininas são indispensáveis durante a fase de multiplicação, pois controlam a divisão celular e estão ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares. As auxinas estão associadas ao enraizamento e alongamento celular, estando envolvidas também no controle da divisão celular (Kerbauy, 2008).

Entretanto, as técnicas de propagação *in vitro* dependem de uma variedade de outros fatores, incluindo genótipo, fisiologia da planta, sazonalidade, fonte de luz (intensidade) e fotoperíodo (George et al., 2008). Esses fatores podem desencadear alterações no crescimento e desenvolvimento de brotações, em decorrência de variações preexistente dos explantes (Nwauzoma e Jaja, 2013), altas concentrações de regulador de crescimento vegetal (Bairu et al., 2006), número e frequência de subcultivos (Eeuwens et al., 2002), ativação de elementos transponíveis (Bairu et al., 2011) e hipo ou hipermetilação de DNA (Abdellatif et al., 2012).

As alterações incluem a incapacidade de alongamento, necrose, baixa eficiência de enraizamento, alterações fisiológicas, hiperidricidade, baixa regeneração, exsudação fenólica excessiva (Sarmast, 2018), modificações no conteúdo de pigmentação foliar (Duarte-Aké et al., 2016) e o surgimento de variações fenotípicas e epigenéticas. Em espécies de *Agave* já foi reportada a presença de folhas mais longas em *A. fourcroydes* e *A. angustifolia* (De-La-Peña et al., 2012). Em *A. tequilana* Weber var. 'Azul' notou-se variegação ou perda de

espinhos laterais nas folhas e diferenças na taxa de crescimento (Díaz-Martínez et al., 2012) e em *A. angustifolia* Haw., ocorreu a perda da capacidade fotossintética e variações no complexo estomático (Duarte-Aké et al., 2016).

No entanto, pouco se sabe sobre a micropropagação de *A. sisalana*. Os estudos sobre esta espécie geralmente se concentram na regeneração indireta via embriogênese somática (Carneiro et al., 2014). E em relação à regeneração direta, os estudos mostram baixa eficiência de regeneração utilizando segmentos de rizoma (Das, 1992; Nikam, 1997) e base de pseudocaule (Rios, 2007), se restringindo somente a fase de multiplicação. Portanto, são necessários estudos sobre o comportamento da espécie em todas as fases de propagação, para a compreensão dos fatores, condições de cultivo e reguladores vegetais no processo de morfogênese de *A. sisalana*.

O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação com vista a produção de plantas em larga escala de *A. sisalana*.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

A coleta de rebentos e bulbilhos da espécie *Agave sisalana* foi realizada na região sisaleira do semiárido baiano, localizada nos municípios de Valente (Latitude: 11° 24' 41" Sul, Longitude: 39° 27' 48" Oeste) e Conceição do Coité (Latitude: 11° 33' 41" Sul, Longitude: 39° 17' 10" Oeste)

2.2 Multiplicação in vitro de *Agave sisalana*

2.1 Estabelecimento in vitro de segmentos de pseudocaule de *A. sisalana* utilizando a técnica TCL em meio de cultura com BAP

Rebentos e bulbilhos foram desfolhados, deixando as folhas mais jovens e centrais da roseta, próximas do meristema apical, e reduzidos a segmentos de pseudocaule com cerca de 6,0 cm de altura. Em seguida foi realizada a desinfestação em câmara de fluxo laminar, com imersão em álcool 70% (2

minutos) e solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo)] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 20 minutos e submetidos a quatro lavagens em água destilada esterilizada.

Após a desinfestação procedeu-se à incisão das folhas e redução do pseudocaule utilizando a técnica TCL (Thin Cell Layer), seccionando transversalmente em segmentos finos (tTCLs) abaixo da região do meristema apical, dispostos nas posições em tTCLs apical (AP), mediano (MI₁ e MI₂) e basal (BA), com aproximadamente 0,5 mm de espessura x 0,5 cm de diâmetro. Os explantes foram inoculados em frasco borel de plástico (252 mm x 329 mm) contendo 40 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 13,32; 26,64; 39,96; 53,28 μ M), acrescido de 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 4 x 5 (tipo de explante x posição de tTCLs x concentrações de BAP) totalizando 40 tratamentos, com seis repetições, cada uma constituída por quatro unidades experimentais. Aos 60 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de contaminação (% C) e oxidação (% OX), número de brotos total por planta (T_{nb}); número de brotos nas posições de tTCLs: região apical (AP), região mediana (MI₁ e MI₂) e região basal (BA); comprimento da parte área em cm (CPA); número de folhas (NF); porcentagem de plantas hiperídricas (% H), matéria fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA).

2.2 Multiplicação in vitro com subcultivos de Agave híbrido 11648

Explantes a partir de rebentos e bulbilhos, provenientes do experimento de multiplicação, foram incisados reduzindo-se as folhas e o pseudocaule segmentado longitudinalmente em duas metades (base $\frac{1}{2}$) com aproximadamente 10,0 mm de altura. Em seguida, esses explantes, formados pelo pseudocaule segmentado, foram inoculados em frasco borel contendo 40 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ acrescido de 6,66; 13,32; 19,98; 26,64; 39,96; 53,28 μ M de BAP, suplementado com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. Foram realizados quatro ciclos de multiplicação, sendo um ciclo a cada 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 4 x 6 (tipo de explante x subcultivo x concentrações de BAP), totalizando 48 tratamentos, com três repetições, cada uma constituída por 4 unidades experimentais. A cada 60 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos (NB), número total de brotos nos subcultivos (T_{NBS}), número total de brotos ao final de cada subcultivo (T_{NB}), potencial propagativo, número de folhas (NF), porcentagem de plantas hiperídricas (%H) e comprimento da parte área em cm (CPA). O potencial propagativo foi calculado, usando a taxa de crescimento (r) entre dois subcultivos subsequentes, dada pela expressão:

$$r = \left(\sqrt[t]{Vf/Vi} - 1 \right) \times 100$$

onde, Vf - número de brotos no subcultivo subsequente; Vi - número de brotos no subcultivo anterior; t - intervalo entre os subcultivos.

2.3 Enraizamento in vitro e aclimatização de plantas de *Agave sisalana*

Brotações a partir de rebentos e bulbilhos obtidos no quarto subcultivo, com aproximadamente 10 mm e 30 mm de altura foram inoculados em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS½, suplementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 µM), acrescido com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 x 5 (tipo de explante x altura x concentrações de AIB), totalizando 20 tratamentos, com oito repetições, cada uma constituída por uma unidade experimental. Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos (NB), comprimento da parte área em cm (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR) e matéria fresca e seca da parte área e da raiz (MFPA, MSPA, MFR e MSR).

Após 45 dias, as plantas enraizadas in vitro com 100 mm de altura foram aclimatizadas, transferindo-se 20 plantas provenientes dos explantes de rebento e de bulbilho para tubetes (63 mm x 190 mm), contendo substrato: solo (latossolo

distrófico) + composto orgânico (latossolo amarelo, resíduos de podas de árvores, esterco caprino e bovino), na proporção 1:1 e mantidos em casa de vegetação com 70% de sombreamento. Após 90 dias de aclimatizadas foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

2.4 Condições experimentais

O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N, antes da autoclavagem à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos. As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica, utilizando-se frascos borel de plástico (252 mm x 329 mm) com tampas e envoltos com filme plástico de policloreto de vinila (PVC).

As condições experimentais da sala de crescimento para cultivo in vitro de *A. sisalana* foram na temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas, luz branca fluorescente e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Tukey e análise de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. Para obtenção de distribuição normal, quando necessário, os dados foram transformados utilizando a análise box-cox, a 5% de significância. Para as variáveis em que os dados não seguiram uma distribuição normal, optou-se apenas por descrever. O software RStudio (RStudio Team 2020) foi usado para realizar as análises estatísticas.

A Figura 1 ilustra o protocolo simplificado de multiplicação in vitro de sisal.

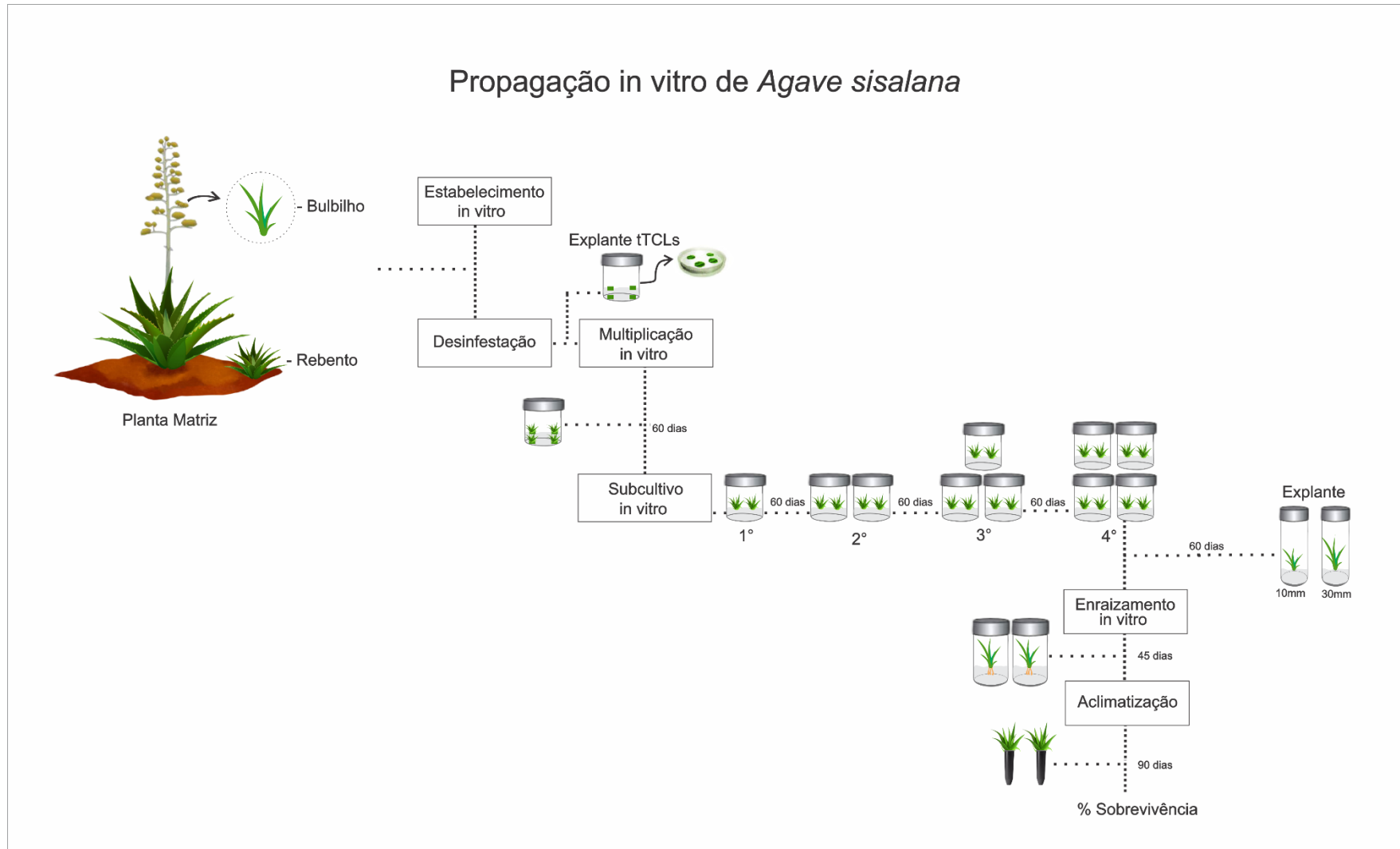


Figura 1. Organograma ilustrando a propagação in vitro de *Agave sisalana*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Multiplicação in vitro de *Agave sisalana*

3.1.1 Estabelecimento in vitro de segmentos de pseudocaule de *A. sisalana* utilizando a técnica TCL em meio de cultura com BAP

A análise de variância revelou efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) do fator isolado concentração de BAP para T_{nb} e significativo ($p \leq 0,05$) para variável % Ox. A interação tipo de explante x concentração de BAP foi altamente significativa para CPA e significativo ($p \leq 0,05$) para as variáveis MFPA e MSPA. A interação posição de tTCLs x concentração de BAP foi altamente significativa para NB. Porém, para as variáveis % C, NF e %H os fatores analisados não foram significativos.

A propagação in vitro depende de várias etapas, incluindo a obtenção de culturas livres de agentes patogênicos como bactérias e fungos. Para a cultura de *A. sisalana*, na fase de estabelecimento, a variável contaminação não foi significativa, observando-se baixa taxa de contaminação 6,66% em segmentos tTCLs independentemente do tipo de explante rebento ou bulbilho.

Os resultados foram promissores, demonstrando que o estabelecimento de *A. sisalana* pode ser realizado sem a adição de compostos químicos, fungicidas ou antibióticos e, direto em meio de multiplicação divergindo de outros estudos com a espécie em estudo. Binh (1990) obteve 10 % de contaminação, utilizando álcool etílico 70% e 0,05% de cloreto de mercúrio; Das (1992) reduziu a contaminação aplicando 5% Teepol (British Drug House) com 0,1% de cloreto de mercúrio. Rios (2007) obteve redução da contaminação com o uso de fungicida derosol® (0,4%) + cloranfenicol (1 mL L⁻¹), em explante base de pseudocaule. Porém, em sementes e rizomas de *Agave tequilana* Weber a desinfestação foi realizada usando álcool etílico 96% e hipoclorito de sódio a 3% (v / v) (Portillo et al., 2007). Um dos fatores que influenciou na indução de brotos foi a oxidação, que aumentou em razão das concentrações de BAP, independentemente do tipo de explante. Na concentração de 39,96 µM de BAP houve maior porcentagem de oxidação (62,50%) em segmentos tTCLs, diferindo somente do controle, que apresentou menor oxidação (16,67%) (Figura 3).

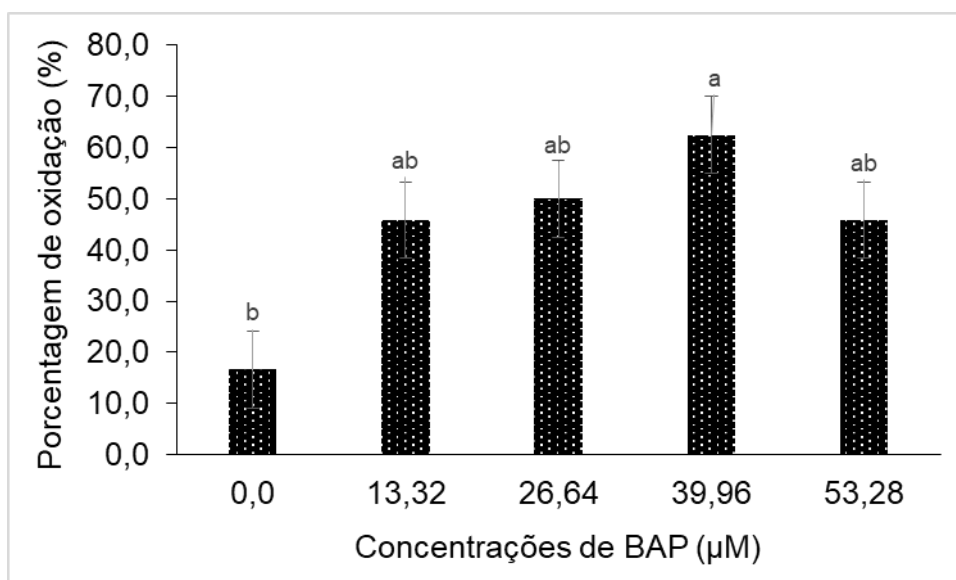


Figura 3. Porcentagem de oxidação em segmentos tTCLs a partir de pseudocaule de plantas de *A. sisalana* cultivados com diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS½. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os explantes oxidados tornaram-se escuros ou apresentaram coloração branca, sendo pouco responsivos ou sem nenhuma resposta para induzir novas brotações. Loyola-Vargas e Vázquez-Flota (2006) para a espécie em estudo, relataram que o manuseio severo de tecidos durante a incisão e o efeito de altas concentrações de produtos químicos na desinfestação em agaves produz o escurecimento dos tecidos, devido à produção e acumulação de compostos fenólicos.

A emissão de brotos em segmentos de tTCLs começou a ser visualizada a partir do décimo quinto dia de cultivo *in vitro* e os tecidos viáveis em geral entumeceram e apresentaram coloração verde clara. O número de brotos por planta em segmentos tTCLs obteve maior indução, na concentração de 53,28 µM de BAP, obtendo média de 23,58 brotos por planta, não diferindo da concentração de 13,28 µM de BAP (18,41 brotos por planta) (Figura 4).

A maior indução de brotações em níveis distais de concentrações de BAP pode estar correlacionada a ação sinérgica entre as concentrações exógenas de citocininas e endógenas dos reguladores vegetais citocinina/auxina nas células competentes para morfogênese. A eficiência da citocinina BAP na proliferação

de brotos na *A. sisalana* corrobora a hipótese das citocininas serem imprescindíveis na fase de multiplicação, pois promovem a quebra da dominância apical e a indução da proliferação de gemas adventícias (Hu e Wang, 1983).

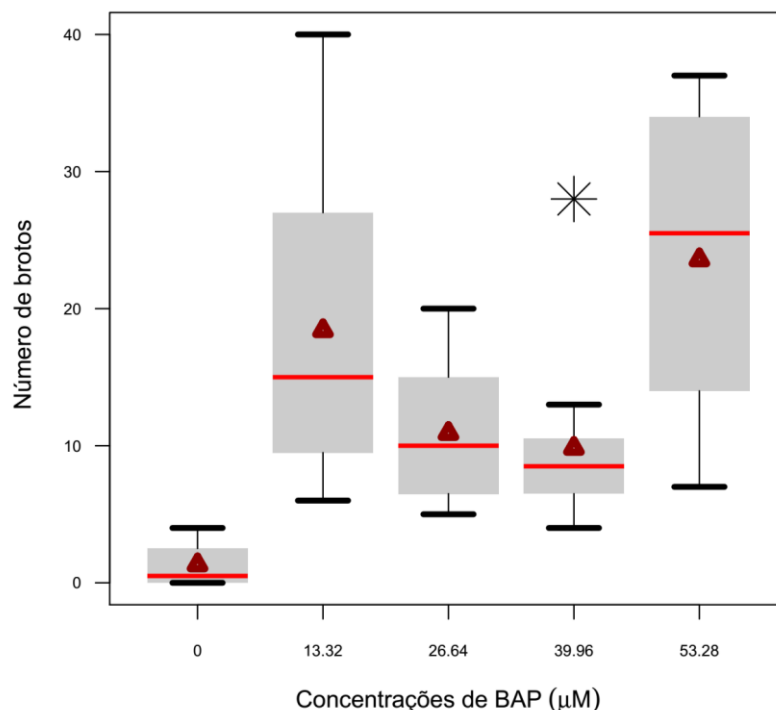


Figura 4. Número total de brotos por planta em segmentos tTCLs a partir de pseudocaule de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS½ com diferentes concentrações de BAP.

Os dados deste estudo com tTCLs são superiores aos descritos para a espécie em estudo realizado por Das (1992), que obteve 12 brotos em explantes de segmentos de rizoma, com 4,4 µM de BAP. Nikam (1997) obteve a indução de 5 brotos em explante de rizoma, com 2,32 µM de cinetina. Em *A. sisalana*, Rios (2007) usou explante base ½ de pseudocaule e obteve 10,78 brotos com a concentração de 44,4 µM de BAP.

Em *A. americana* com explante base de pseudocaule, a resposta foi similar aos resultados deste trabalho, na concentração de 13,32 µM de BAP, obteve indução de 18,5 brotos (Chen et al., 2014). Ríos-Ramírez et al. (2018) obtiveram altas taxas de multiplicação (32,7 brotos) para segmentos de pseudocaule de *Agave angustifolia*, utilizando 6,6 µM de BAP combinado com

4,92 μM de AIB, em plantas anteriormente fertirrigadas em casa de vegetação. A comparação com os resultados para *A. sisalana* e outras espécies do gênero *Agave* demonstra a eficiência de tTCLs para a multiplicação *in vitro*.

Ao analisar as respostas da posição de segmentos tTCLs verificou-se que houve variação entre as concentrações de BAP, entretanto percebeu-se que os tTCLs próximos ao meristema apical apresentaram melhor potencial para indução de brotos, independente dos tipos de explante rebento ou bulbilho (Tabela 3).

Em relação ao comportamento da posição dos segmentos de tTCLs em função das concentrações de BAP, com 13,28 μM de BAP, os tTCLs AP e MI₁ demonstraram maior potencial para indução de brotos (10,33; 9,33 por explante), respectivamente. Na concentração de 26,64 μM de BAP, os tTCLs MI₁ induziram o maior número de brotos (4,75 por explante), não diferindo estatisticamente de tTCLs AP e tTCLs MI₂. Comportamento similar foi observado para concentração de 39,96 μM de BAP, apresentando maior número de brotos nos tTCLs MI₁ (5,25 por explante) e tTCLs AP (3,83 por explante). Para a concentração de 53,28 μM de BAP, a maior indução de brotos (16,58 por explante) foi verificada nos tTCLs MI₁ (Tabela 3). Os tTCLs BA apresentaram indução de brotações insatisfatória nas concentrações avaliadas.

Tabela 3. Número de brotos em função da posição de tTCLs de plantas de *A. sisalana*: região apical (AP), região mediana (MI₁ e MI₂) e região basal (BA), cultivadas em meio MS^{1/2} com diferentes concentrações de BAP.

BAP (μM)	Número de brotos			
	AP	MI ₁	MI ₂	BA
0,0	1,17 aC	0,17 aD	0,0 aA	0,0 aA
13,32	10,33 aA	9,33 aB	0,33 bA	0,0 bA
26,64	4,17 aBC	4,75 abC	1,75 abA	0,25 bA
39,96	3,83 abBC	5,25 aBC	0,75 bA	0,0 bA
53,28	6,08 bB	16,58 aA	0,92 cA	0,0 cA
CV (%)	114,82			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A indução ou a inibição dos processos morfogênicos *in vitro* dependem do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas (Monfort et al., 2012), e da capacidade das células em reagirem a sinais específicos (George, 2008). Observou-se maior competência celular de tTCLs AP e MI₁, possivelmente por conterem maior quantidade de tecido meristemático em relação a tTCLs BA. Essa variação na resposta morfogênica em tTCLs de *A. sisalana* também foi reportada por Monja-Mio e Robert (2013), na indução de embriões somáticos de *Agave fourcroydes* ao utilizar como explante tTCLs e verificaram a melhor resposta em tTCLs AP e MI, assim como na espécie em estudo.

A maior parte de tecido meristemático em espécies de *Agave* localiza-se abaixo da base das folhas primordiais, induzindo a maioria dos brotos e, a segunda camada com menor indução (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006). Monja-Mio e Robert, (2013) concluíram nos estudos de histologia de tTCLs em *Agave fourcroydes*, que a resposta observada em tTCLs justifica-se por estes serem formados por diferentes camadas histogênicas constituídas por células de tecidos: epidérmico, parênquima, vascular e meristemático, mas em proporções diferentes, dependendo da região do pseudocaule. As camadas apicais contêm mais tecido meristemático do que as camadas basais, que são derivadas dos meristemas primários procâmbio e protoderme (Monja-Mio e Robert, 2013).

Entretanto, no presente estudo observou-se que a capacidade de respostas de tTCLs AP e MI₁ em *A. sisalana* também é dependente da interação com as concentrações de BAP, sendo um fator determinante na indução, formação e proliferação de brotos.

A caracterização das diferentes respostas morfogênicas em *A. sisalana* é de extrema relevância, pois permite otimizar o protocolo de micropropagação, buscando um sistema eficiente de multiplicação, e aumentando as chances de uniformização das respostas para produção de mudas. A Figura 5, mostra explantes de *A. sisalana* a partir de bulbilhos e rebentos, após o processo de multiplicação *in vitro*.

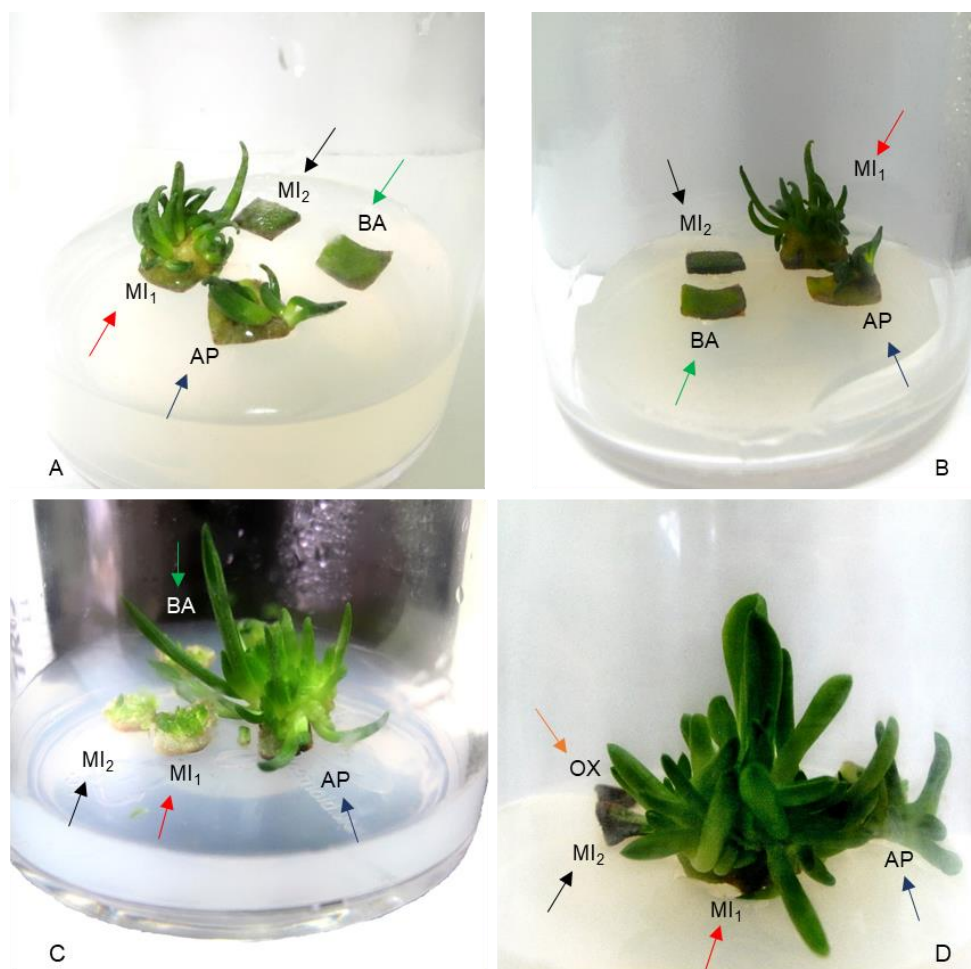


Figura 5. Multiplicação in vitro de *Agave sisalana* utilizando segmentos de pseudocaule (tTCLs) em meio de cultura MS½, com diferentes concentrações de BAP. As setas indicando a posição de segmentos tTCLs: apical (AP) (seta azul), mediana (MI₁ e MI₂) (seta vermelha) e basal (BA) (seta preta e verde). Explante a partir de bulbilho em meio de cultura com 13,28 µM de BAP (A) e 53,28 µM de BAP (B); C – Explante a partir de rebento, em meio de cultura com 13,28 µM de BAP (C) e 53,28 µM de BAP com explante oxidado (OX) (seta laranja) (D).

Em relação ao número de folhas, as médias não diferiram estatisticamente entre si, com 2,25 folhas por explante. As folhas visualmente eram lanceoladas, apresentavam coloração verde clara, sem anomalias, e não ocorreu indução de plantas hiperídricas, em nenhum dos tratamentos. Os resultados são semelhantes aos reportados por Rios (2007) em que não houve

diferença para número de folhas em plantas oriundas de bulbilhos de *A. sisalana*, entre os tratamentos, e foi observada a emissão de 2 a 3 folhas por explante. Entretanto, em *A. angustifolia* a concentração até 17,76 μM de BAP proporcionou aumento do número de folhas (44,4 folhas por planta) (Ríos-Ramírez et al., 2017).

O maior comprimento da parte aérea foi verificado para o explante a partir de bulbilho (24,75 mm), em comparação ao proveniente de rebento (0,33 mm), no tratamento controle. Os tratamentos com as concentrações de BAP não mostraram diferença significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Médias do comprimento da parte aérea em explantes a partir de rebento e bulbilho de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de BAP.

Explante	BAP (μM)	Comprimento da parte aérea (mm)				
		0,0	13,32	26,64	39,96	53,28
Rebento	0,33 bB	14,50 aA	10,58 abA	17,33 aA	16,75 aA	
Bulbilho	24,75 aA	12,16 aA	9,33 aA	10,50 aA	12,83 aA	
CV (%)	53,84					

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Entretanto, estes dados divergem ao estudo de Rios (2007) em *A. sisalana*, o qual observou maior altura das brotações para o explante base em meio de cultura contendo somente 1,34 μM de ANA (103,7 mm) e base $\frac{1}{2}$ (63,8 mm) na concentração de 44,4 μM de BAP combinado com 5,37 μM de ANA. Em *A. americana* Chen et al. (2014) reportaram que o aumento das concentrações de BAP (2,2 μM) reduziu o comprimento dos brotos.

As citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações, até determinada concentração, a partir da qual, ocorre diminuição da altura em virtude de possível efeito fitotóxico da citocinina (Reis et al., 2008). Pois as citocininas induzem a divisão celular e proliferação de brotos, mas dependendo da sua concentração, pode inibir o efeito da auxina que induz o alongamento das células vegetais (Taiz e Zeiger, 2004). Porém, os explantes de *A. sisalana* apresentaram comportamentos distintos, em função das

concentrações de BAP, mas não foi observado efeito fitotóxico para altura das brotações.

Ao comparar os explantes, constatou-se que o acúmulo de matéria fresca foi superior para explantes provenientes de rebentos, em todos os tratamentos, em relação aos explantes de bulbilhos (Tabela 5). Em contrapartida, o acúmulo de matéria seca obteve comportamentos distintos, com explantes provenientes de rebentos apresentando valores superiores (0,084; 0,065 mg), somente nas concentrações de 13,32 e 26,64 μM de BAP, em relação aos explantes provenientes de bulbilhos (0,035; 0,037 mg) (Tabela 5).

Tabela 5. Matéria fresca da parte área e seca de plantas em explantes a partir de rebento e bulbilho de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de BAP.

Explante	BAP (μM)			
	13,32	26,64	39,96	53,28
	Matéria fresca da parte área (mg)			
Rebento	0,947 bA	0,691 cA	1,270 aA	0,901 bcA
Bulbilho	0,269 bB	0,303 cB	0,495 aB	0,335 bcB
CV (%)	19,66			
	Matéria seca da parte área (mg)			
Rebento	0,084 aA	0,065 bA	0,061 bA	0,067 abA
Bulbilho	0,035 bB	0,037 abB	0,052 abA	0,055 aA
CV (%)	19,66			

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em outras espécies de *Agave* foram reportadas respostas diferentes para acúmulo de biomassa. Em *A. americana* concentrações baixas de BAP (8,8 μM) causaram o aumento no acúmulo de matéria fresca (17,0 mg) (Chen et al., 2014), entretanto, para *A. fourcroydes* houve redução na matéria fresca (264,11 mg) ao utilizar 3,33 μM de BAP combinado com 4,92 μM de AIB (Caraballo et al., 2010).

Os reguladores vegetais alteram o balanço entre citocininas e auxinas e, dessa forma, podem estimular tanto o desenvolvimento do sistema radicular,

quanto da parte aérea, sendo a parte aérea estimulada quando o gradiente de citocinina for superior ao de auxina (Fagan, 2015).

Os resultados evidenciaram que os explantes provenientes de rebento e bulbilho induziram respostas semelhantes para indução de brotos ao adicionar BAP no meio de cultura. O uso tTCLs mostrou ser eficiente e potencializou a indução de brotos, sendo indicado os segmentos na posição AP e MI, pois apresentaram maior potencial morfogênico. Recomenda-se a concentração de 13,32 μM de BAP para multiplicação *in vitro* de *A. sisalana*.

3.1.2 Multiplicação *in vitro* com subcultivos de *Agave sisalana*

As interações explante x concentração de BAP e concentração de BAP x subcultivo foram significativas para NB ($p \leq 0,01$) e para CPA ($p \leq 0,05$). Para NF a interação explante x subcultivo mostrou efeito significativo ($p \leq 0,05$).

As multiplicações sucessivas podem influenciar no processo de organogênese e muitas vezes causar alterações genéticas no processo de formação e crescimento da planta. Isto ocorre devido à interação de fatores exógenos e endógenos, que ocorre em decorrência ao efeito acumulativo de regulador vegetal. Em *A. sisalana*, as plantas advindas da fase de multiplicação e, após expostos a quatro consecutivas multiplicações, não expressaram variações morfológicas visíveis, com efeitos positivos para incremento de número de brotos e diferenças na capacidade organogênica entre os explantes, a partir de rebento e bulbilho.

O explante proveniente de rebento permitiu maior indução de brotos (7,18; 10,10; 9,40 brotos por explante) nas concentrações de 6,66, 13,32 e 39,96 μM de BAP, em comparação ao explante a partir de bulbilho (5,83; 7,94; 6,10 por explante), respectivamente (Figura 6). Para a espécie *A. angustifolia*, também foi observado que a indução de brotos variou em detrimento aos fenótipos; o V (5827) apresentou mais brotações em comparação ao G (4959) e A (4226) ao final de cinco subcultivos (Duarte-Aké et al., 2016).

As diferenças entre os explantes pode ser um indicativo de maior plasticidade fenotípica para explante oriundo de rebento, nas condições de cultivo, e nas respostas de diferenciação e morfogênese induzidas pelos reguladores vegetais. Conforme Brum et al. (2002), a multiplicação de brotações

pode estar relacionada à influência da variação genética da planta matriz e do regulador vegetal utilizado para o auxílio na divisão celular e na quebra de dormência das gemas adventícias, até então inibidas pela dominância apical.

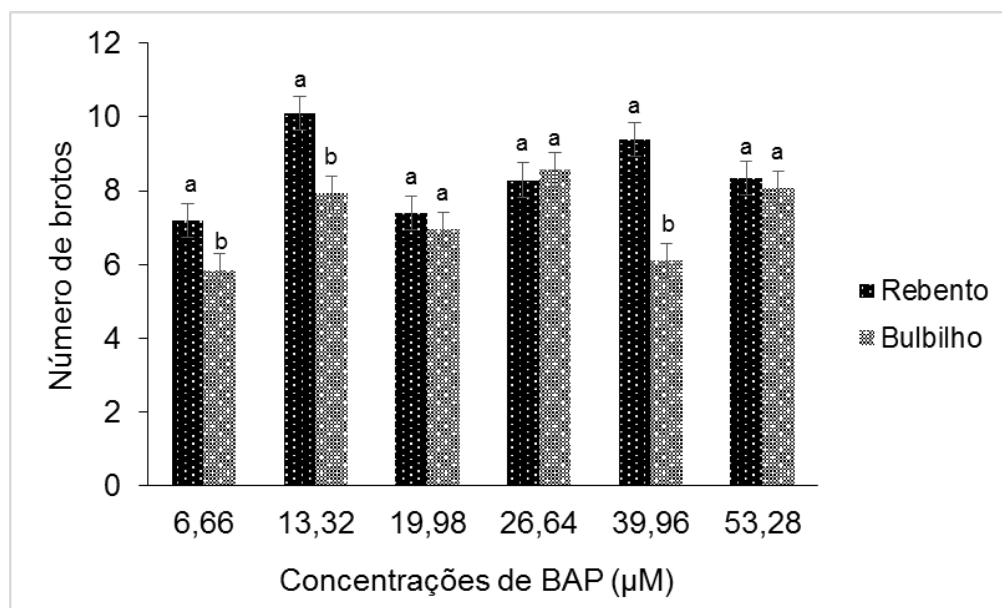


Figura 6. Número de brotos em plantas de *A. sisalana* em função dos explantes a partir de rebento e bulbilho cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A multiplicação de *A. sisalana* mostrou correlação entre concentrações de BAP e subcultivos, verificando resposta satisfatória para número de brotos, com aumento progressivo em função dos subcultivos. A indução de brotos foi proporcional ao aumento do número de transferências para meio de cultura de multiplicação, em todos os tratamentos (Figura 7). Esse comportamento indica que a renovação do meio de cultura otimiza a proliferação de brotos em *A. sisalana*, não afetando a competência morfogênica.

A indução de brotos em *A. sisalana* parece ser fortemente influenciada por concentrações exógenas de regulador vegetal, atuando em sinergismo com níveis endógenos, semelhante ao constatado na fase de multiplicação. A indução ou a inibição dos processos morfogenéticos *in vitro* dependem do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas (Monfort et al. 2012).

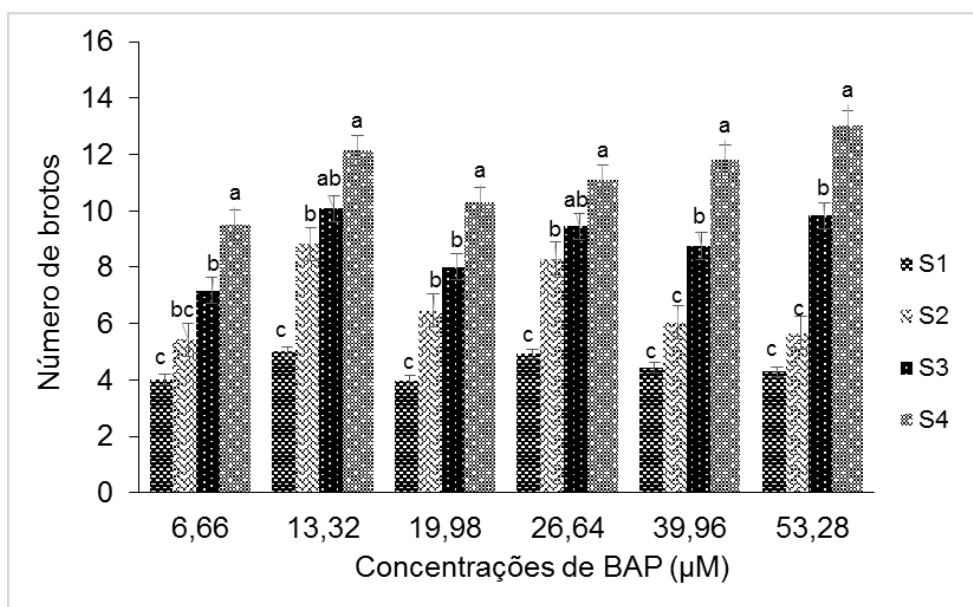


Figura 7. Número de brotos de plantas de *A. sisalana* em função dos subcultivos em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. S1 – primeiro subcultivo; S2 – segundo subcultivo; S3 – terceiro subcultivo; e S4 – quarto subcultivo.

Os dados deste estudo para o subcultivo são semelhantes aos descritos em *Agave angustifolia*, com acréscimo na proliferação de brotos, com o aumento nos subcultivos, obtendo a média de 7,96 brotos por explante na quinta transferência (Duarte-Aké et al., 2016). Em acessos de germoplasma de abacaxi, o número de brotos aumentou com o número de transferências, sugerindo um aumento na multiplicação com o tempo (Silva et al., 2016). Varshney e Anis (2011) obtiveram número máximo por explante (43 brotos) em *Tecomella undulata*, após quatro transferência para meio de cultura de multiplicação.

A Tabela 6 mostra os valores referentes ao somatório de número de brotos em cada subcultivo (NBs) número de brotos totais (T_{NB}) e crescimento geométrico, após quatro ciclos de multiplicação dos explantes provenientes de rebento e bulbilho.

Em relação ao número de brotos produzidos em cada subcultivo e o total de brotos no final do processo, para o explante a partir de rebento, BAP a 13,32

μM produziu o maior número de brotos em cada subcultivo, obtendo no final do último subcultivo o total de 485 brotos. Esse aumento corresponde a 3.941,67%, em relação ao número de brotos iniciais (12 brotos). Porém, ao analisar a taxa de crescimento geométrico nas concentrações de BAP, verificou-se baixa taxa de crescimento entre os subcultivos, na maioria das concentrações (Tabela 6). O explante a partir de bulbilho obteve resposta distinta ao explante proveniente de rebento, induzindo maior número de brotos na concentração de 26,64 μM de BAP, totalizando ao final de quatro subcultivo, a produção de 412 brotos, correspondente ao aumento de 3.333,33% em relação ao número de brotos iniciais (12 brotos).

Os dois tipos de explantes a partir de rebento e bulbilho apresentaram baixa taxa de crescimento entre as transferências na maioria das concentrações, evidenciado pelo crescimento geométrico (Tabela 6). Resultados similares foram obtidos em acessos de germoplasma de abacaxi para a maioria dos acessos, a taxa de crescimento geométrico diminuiu conforme o aumento do número de subcultivo o que segundo os autores pode indicar perda de potencial propagativo (Silva et al., 2016).

O crescimento geométrico refere-se a taxa de crescimento por unidade de tempo, possibilitando estimar o ritmo de crescimento populacional e calcular o tempo necessário para se atingir determinado volume de população.

No primeiro e segundo subcultivos foi possível visualizar as emissões de brotações originadas via organogênese direta (Figura 8A e 8B). Entretanto, quando transferidos para o terceiro subcultivo, a base das plantas formou um aglomerado de células, com aspecto globular, textura friável a semi-compacta e coloração esverdeada e branco, características de culturas nodulares (Figura 9C e 9A a 9C). Após transferidas para novo meio de cultura, estas induziram brotações, podendo ser um indicativo de que são constituídas por células meristemáticas. Sistemas similares ao descrito em *A. sisalana* foram verificados nesta mesma espécie por Das, (1992), em *A. americana* por Chen et al., (2014), *Aechmea setigera* (Fermino Junior et al., 2014), *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* e *Vriesea reitzii* (Pescador et al., 2015).

Observou-se também a formação de estruturas semelhantes a calos embriogênicos e friáveis (Figura 9F), com indução de estruturas análogas a embriões somáticos em estágio globular (Figura 9F). Essas estruturas são

similares às observadas em *A. tequilana* (Portillo et al., 2007), *A. sisalana* (Carneiro et al., 2014), *A. angustifolia* (Reyes-Díaz et al., 2017) e *A. americana* (Lecona-Guzmán e Reyes-Zambrano, 2017). Entretanto, para confirmação, se faz necessário a análise histológica das estruturas, para verificar a existência de características que fundamentem a formação de células friáveis, cultura nodulares e embriogênicas.

A formação de brotos adventícios (Figura 9B, 9D e 9F) foi observada no subcultivo quatro. Conforme George et al. (2008), brotos adventícios, particularmente aqueles que surgem indiretamente do calo, não são desejáveis, pois brotos que se originam de gemas são geneticamente idênticos à planta-mãe, ao passo que há uma probabilidade de que plantas regeneradas de calo possa diferir em uma ou mais características, ou seja, a obtenção de brotos via organogênese indireta, pode resultar em variação somaclonal.

Entretanto, nos subcultivos não foram identificadas variantes somaclonais in vitro em sisal, quanto às características morfológicamente visíveis. A presença de variação somaclonal não é desejável quando o objetivo é a propagação comercial de clones de genótipos com características selecionadas. Por isso é necessário avaliar a estabilidade de plantas micropropagadas de *A. sisalana*.

Não houve variação expressiva na emissão de folhas. O número de folhas foi superior no explante a partir de bulbilho (3,33), em relação ao explante proveniente de rebento (2,27), somente no segundo subcultivo (S₂), não sendo observado diferença nos demais subcultivos (Figura 10). Isso indica que o número de subcultivos não inibiu a emissão de folhas em explantes de *A. sisalana*.

Em explantes de *A. sisalana* não foram verificadas diferenças estruturais e perda de vigor, observando visualmente plantas bem formadas com parte aérea sem formação de raízes e folhas normais com formato lanceolada típico da espécie e coloração variando entre as tonalidades verde claro e escura. As diferenças aparentes na cor das plantas são devido à distribuição de cloroplastos nas folhas e à presença variável de outros pigmentos associados, como os carotenoides, os quais sempre acompanham as clorofilas (Von Elbe, 2000).

Tabela 6. Número de brotos iniciais (NB_i), número total de brotos nos subcultivos (T_{NBS}), número de brotos total ao final de cada subcultivo (T_{NB}) e crescimento geométrico de plantas de *A. sisalana* cultivadas em meio de cultura MS½, com diferentes concentrações de BAP e subcultivos.

BAP (µM)	NB _i	Número de brotos (T _{NBS})					Crescimento geométrico		
		S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	T _{NB}	S ₁ - S ₂	S ₃ - S ₂	S ₄ - S ₃
Explante a partir de Rebento									
6,66	12	53,0	73,0	98,0	121,0	345,0	0,54	0,49	0,35
13,32	12	79,0	115,0	135,0	156,0	485,0	0,63	0,27	0,24
19,98	12	58,0	89,0	95,0	115,0	357,0	0,72	0,11	0,11
26,64	12	72,0	90,0	105,0	131,0	398,0	0,37	0,26	0,37
39,96	12	77,0	90,0	125,0	159,0	451,0	0,26	0,55	0,40
53,28	12	58,0	80,0	111,0	152,0	401,0	0,54	0,55	0,53
Explante proveniente de Bulbilho									
6,66	12	43,0	57,0	74,0	106,0	280,0	0,47	0,44	0,60
13,32	12	41,0	97,0	107,0	136,0	381,0	1,45	0,16	0,40
19,98	12	37,0	68,0	97,0	132,0	334,0	1,02	0,59	0,51
26,64	12	46,0	109,0	122,0	135,0	412,0	1,45	0,19	0,17
39,96	12	29,0	55,0	85,0	124,0	293,0	1,07	0,73	0,63
53,28	12	45,0	56,0	125,0	161,0	387,0	0,37	1,35	0,42



Figura 8. Brotações adventícias originadas de explante a partir de rebento (A) e bulbilho (B). Brotações com folhas em senescência (seta vermelha) e ramificação com aglomerado de células com indução de brotos (seta preta) (C); Brotações hiperídricas (D) cultivadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de BAP (F).

Algumas folhas apresentaram início de processo de senescência (Figura 8C), possivelmente pelo aumento de etileno no ambiente de cultivo ou aos fatores de estresse no cultivo *in vitro* prolongado que podem levar as microplantas à senescência, reduzindo e ou alterando seu potencial morfogênico (Graner et al., 2019).

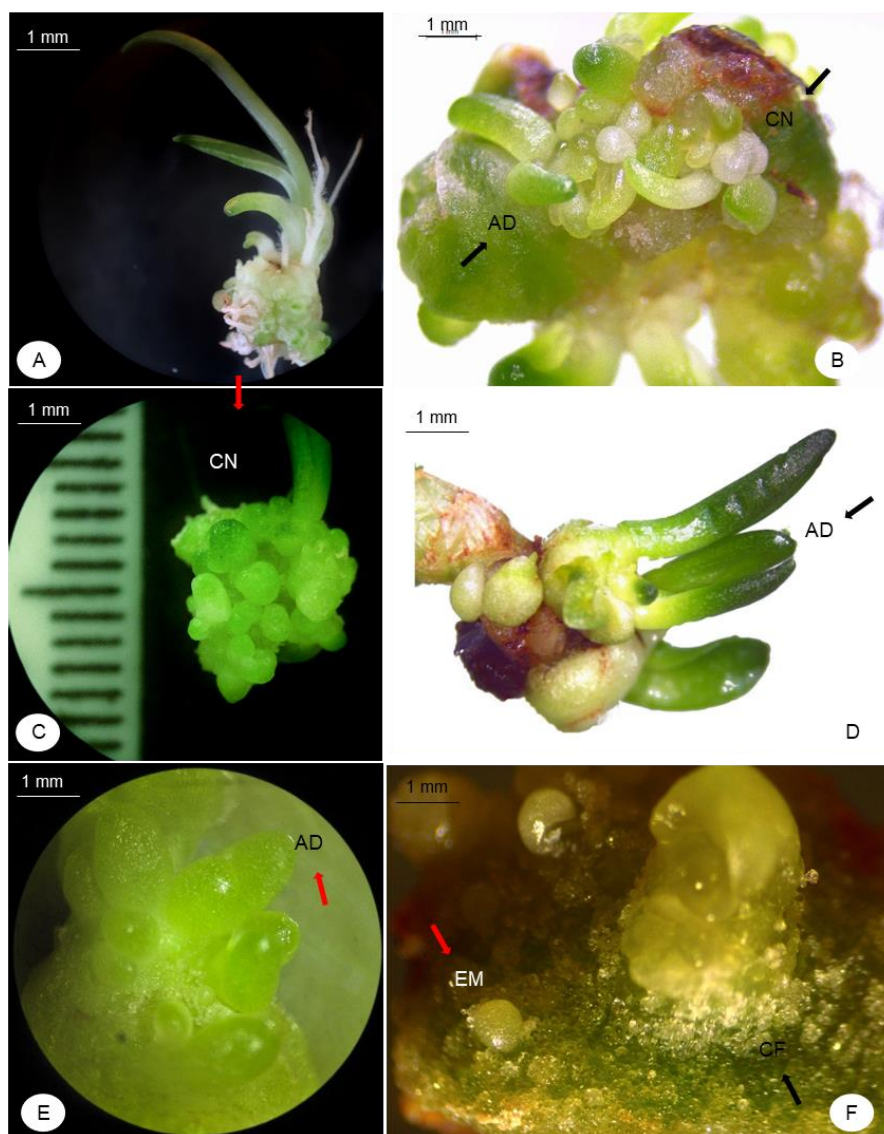


Figura 9. Início de formação de culturas nodulares na base de brotações (A). Explante com formação de brotações adventícias via organogênese indireta (AD) e cultura nodulares (CN) (B); Cultura nodulares (C); brotações adventícias de cultura nodulares (AD) (D); brotações adventícias via organogênese direta (AD) (E); Explante com estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos (EM) e calos friáveis (CF) em explantes de *A. sisalana* submetidos a diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$.

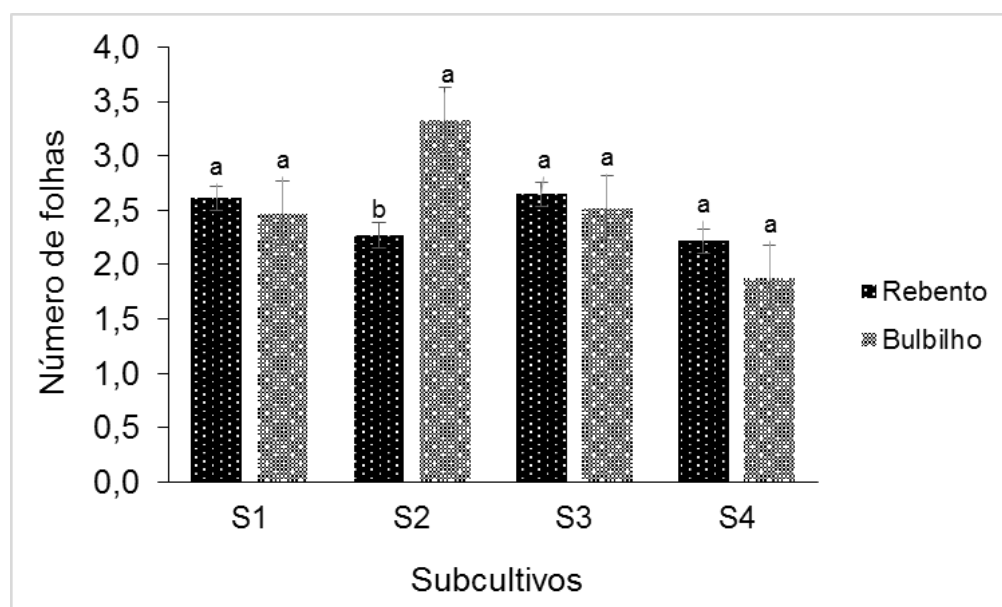


Figura 10. Número de folhas de plantas de *A. sisalana* em função dos subcultivos em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ acrescido de regulador vegetal BAP. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. S1 – primeiro subcultivo; S2 – segundo subcultivo; S3 – terceiro subcultivo; e S4 – subcultivo quatro.

Na etapa inicial da multiplicação não ocorreu a presença de plantas hiperidricas, contudo ocorreu a partir dos subcultivos sucessivos. A taxa de plantas com hiperidricidade foi em média de 20,83%, independente do período de subcultivo. Os brotos com hiperidricidade exibiram folhas verde clara e escura, aparência vítrea, túrgidas e frágeis, características morfológicas típicas de plantas com hiperidricidade (Figura 8D). Esses brotos apresentaram hiperidricidade de leve a severa. As plantas com hiperidricidade leve possuíam potencial morfogênico e continuaram a se propagar ao transferi-las para outro meio de cultura, ao contrário das plantas com hiperidricidade severa. Conforme, Nikam et al., (2019) *A. sisalana* é caracterizada como uma planta suscetível ao excesso de água, o que sugere que o ambiente de cultivo com alta umidade relativa possa contribuir para o surgimento deste fenômeno. Contudo, não se pode descartar a hipótese que este esteja associado a fatores como alta concentração de regulador vegetal, excesso de sais minerais (fonte de nitrogênio, cloreto etc.), estresse oxidativo devido à ineficiente difusão dos gases e baixa densidade de fluxo de fótons. É necessário investigar as

possíveis causas dessa anomalia em *A. sisalana*, uma vez que pode inviabilizar o explante para fases posteriores devido à má formação das brotações.

Durante o período de subcultivo ocorreu redução expressiva na altura dos brotos. Notou-se decréscimo no comprimento das brotações para o explante proveniente de rebento em detrimento das concentrações de BAP, representado pela equação linear (Figura 11).

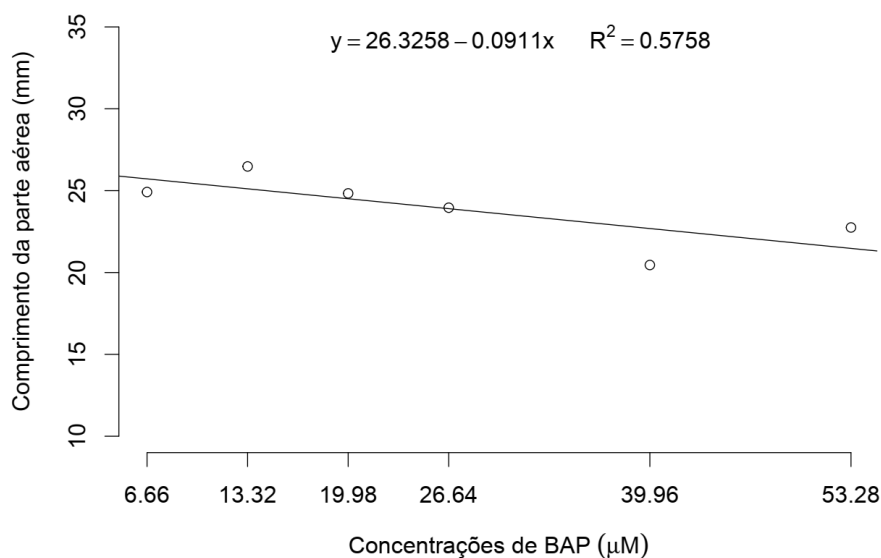


Figura 11. Comprimento da parte aérea para explante oriundos de rebento de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS½, com diferentes concentrações de BAP.

Ao contrário, explantes a partir de bulbilho não apresentaram diferença significativa para altura das brotações nas concentrações avaliadas. O explante proveniente de rebento mostrou decréscimo na altura das brotações com o aumento do número de subcultivos, observando redução 51,83% em relação ao primeiro subcultivo. Esse comportamento foi similar para explantes a partir de bulbilho, apresentando redução de 38,78 % (Figura 12).

É provável que a redução no comprimento da parte aérea esteja associado ao efeito fitotóxico do regulador vegetal. Os resultados corroboram os dados da literatura de que a citocinina induz divisão celular e proliferação de brotos, e que, dependendo da sua concentração, pode inibir o efeito da auxina que induz o alongamento das células vegetais (Taiz e Zeiger, 2004).

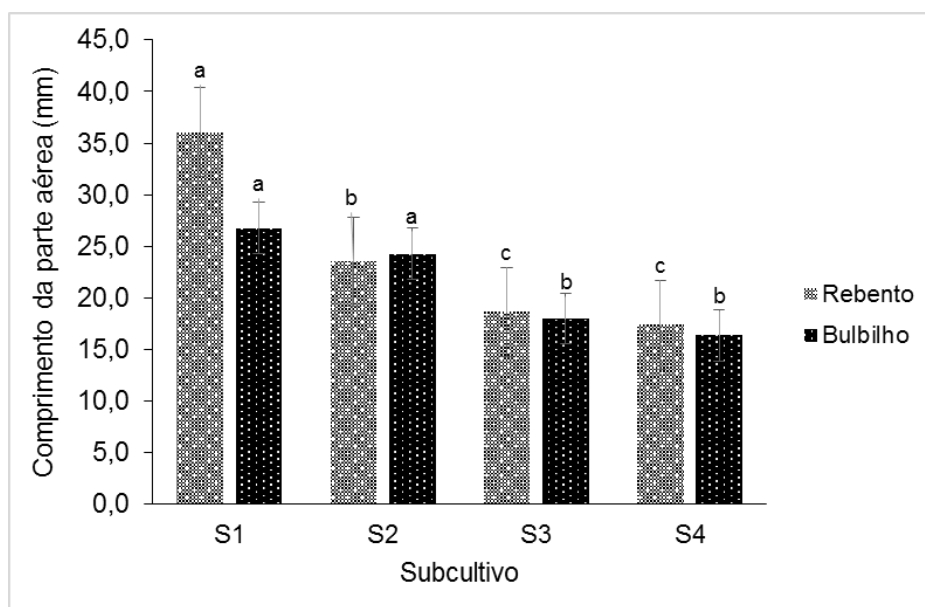


Figura 12. Comprimento da parte aérea de explante oriundos de rebento e bulbilho de plantas de *A. sisalana* submetidos a quatro subcultivos em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ acrescido de BAP. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. S1 – primeiro subcultivo; S2 – segundo subcultivo; S3 – terceiro subcultivo; e S4 – subcultivo quatro.

Pode-se concluir que o explante a partir de rebentos induziu maior número de brotos, quando comparado ao explante proveniente de bulbilho. A concentração de $13,28 \mu M$ de BAP é a mais indicada para o subcultivo, sendo necessário analisar a estabilidade genética das plantas.

3.1.3 Enraizamento in vitro e aclimatização de plantas de *Agave sisalana*

A interação tipo de explante x altura inicial das brotações mostrou efeito significativo ($p \leq 0,05$) para NB, CPA e MFR e a interação tipo de explante x concentração de AIB foi significativa ($p \leq 0,01$) para CPA e MSR. A altura inicial das brotações foi significativa ($p \leq 0,05$) para NF e CR. Para as variáveis NR e MFPA, os três fatores altura inicial das brotações, tipo de explante e concentração de AIB foram significativos ($p \leq 0,01$) e MSPA somente para tipo de explante e altura inicial das brotações.

Os brotos, após quatro subcultivos em meio de cultura com BAP, foram transferidos para meio enriquecido com auxina, para induzir o enraizamento. Os efeitos dos reguladores vegetais utilizados na fase de multiplicação podem interferir na rizogênese, por isso o uso de auxina sintética visa acelerar a formação de raízes e aumentar a taxa de enraizamento (Santos et al., 2010).

A taxa de enraizamento não variou para os fatores analisados, obtendo 100% de indução de raízes. Porém, o tipo de explante e o tamanho inicial das brotações foram os fatores de maior influência no processo de rizogênese.

Os níveis de AIB no meio de cultura não favoreceu a indução de brotações, supostamente porque estas atuam inibindo a formação de brotos laterais pela manutenção da dominância apical, estando envolvida nos processos de diferenciação e alongamento celular. A emissão de brotos também não foi observada em meio isento de regulador vegetal, indicando que pode ter ocorrido equilíbrio entre os níveis endógenos citocinina/auxina não favorável à indução de novas brotações.

O número de folhas foi influenciado significativamente pelo tamanho dos brotos iniciais. Os brotos maiores, com 30 mm de altura, obtiveram média de 5,99 folhas/explante e brotos com altura inicial de 10 mm emitiram 4,56 folhas/explante (Figura 13). As folhas possuíam aspecto vigoroso com tonalidade verde, variando entre verde claro e escuro e sem expressão de senescência foliar. O número e o vigor das folhas são dados importantes para o processo de rizogênese e sobrevivência das plantas após transplante para condições *ex vitro*, pois as folhas jovens são os principais sítios de síntese de auxina e responsáveis pela partição de fotoassimilados resultantes da fotossíntese (Taiz et al., 2017), determinantes para o crescimento da planta.

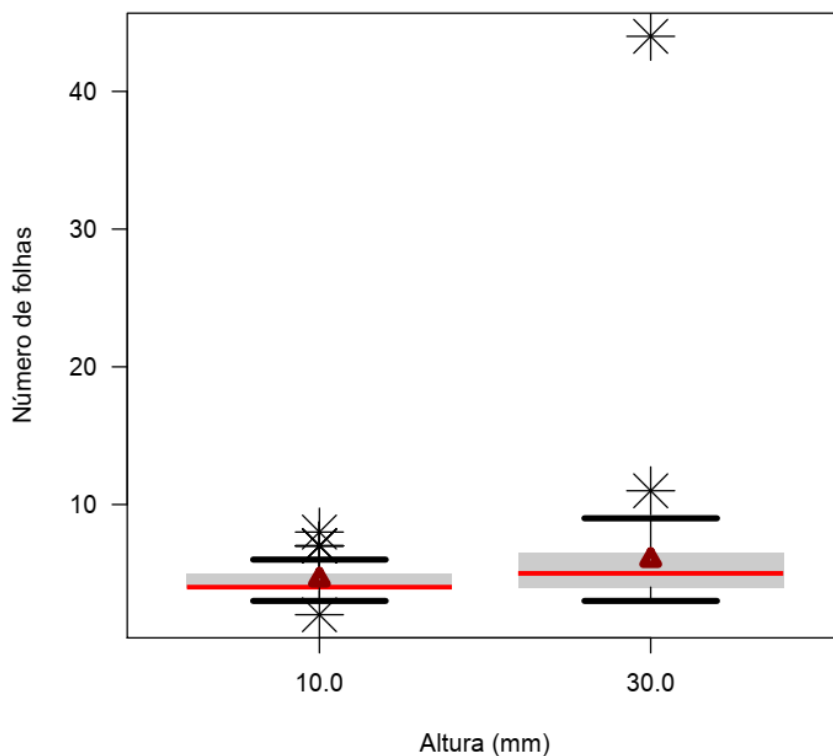


Figura 13. Número de folhas de plantas de *A. sisalana* em função do tamanho dos brotos iniciais cultivados em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

A adição de AIB foi benéfica para o crescimento das plantas, assim como o tamanho inicial das brotações. Em contrapartida, o tipo de explante mostrou pouca influência no comprimento das plantas, pois somente a concentração de $6\ \mu\text{M}$ de AIB exibiu diferença, na qual explante a partir de bulbilho (97,93 mm) obteve melhor desempenho em relação a explante proveniente de rebento (82,75 mm) (Figura 14).

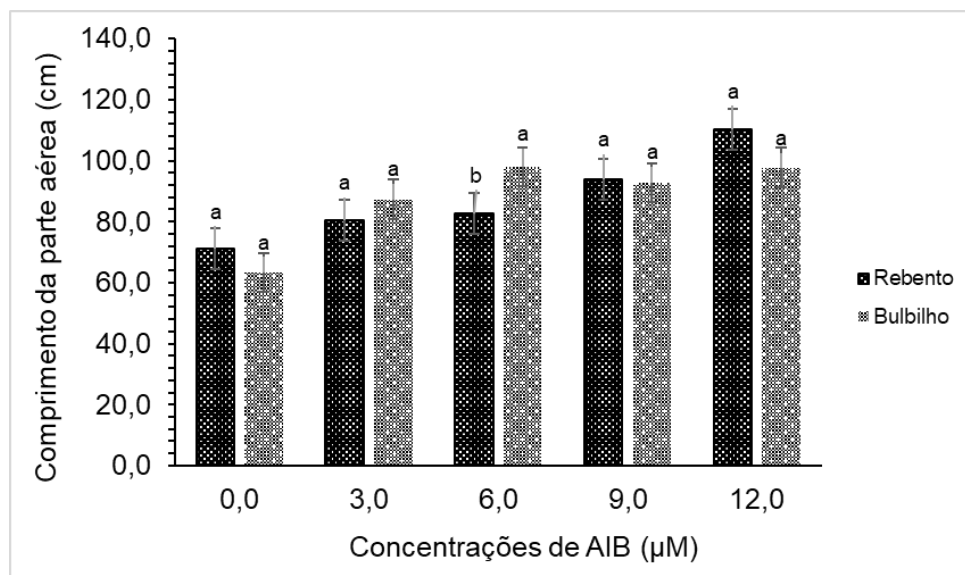


Figura 14. Comprimento da parte aérea de explantes oriundos de rebento e bulbilho de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro do tratamento ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao analisá-los de forma individual, observou-se acréscimo no comprimento da parte aérea, linearmente ao aumento dos níveis de AIB, constatando acréscimo superior a 54% em relação ao meio de cultura isento de AIB (Figura 15 e 16). As auxinas estão envolvidas com a divisão, alongamento e diferenciação das células vegetais (Taiz e Zeiger, 2004), porém altas concentrações de auxinas podem produzir efeitos antagônicos inibindo o crescimento tanto da parte aérea como das raízes.

Entretanto, em *A. sisalana* as altas concentrações de AIB contribuíram positivamente para o crescimento das brotações. Os resultados estão de acordo aos observados em espécies de Agave. Em brotações de *A. Americana* var. *oaxaquensis*, o aumento das concentrações proporcionou melhores resultados para comprimento da parte aérea (114 mm) em meio de cultura com 7,38 μM de AIB (Luna et al., 2013). Em *A. marmorata*, o maior comprimento das brotações (27 mm) foi obtido com 57 μM de AIA (Jiménez e La O, 2018).

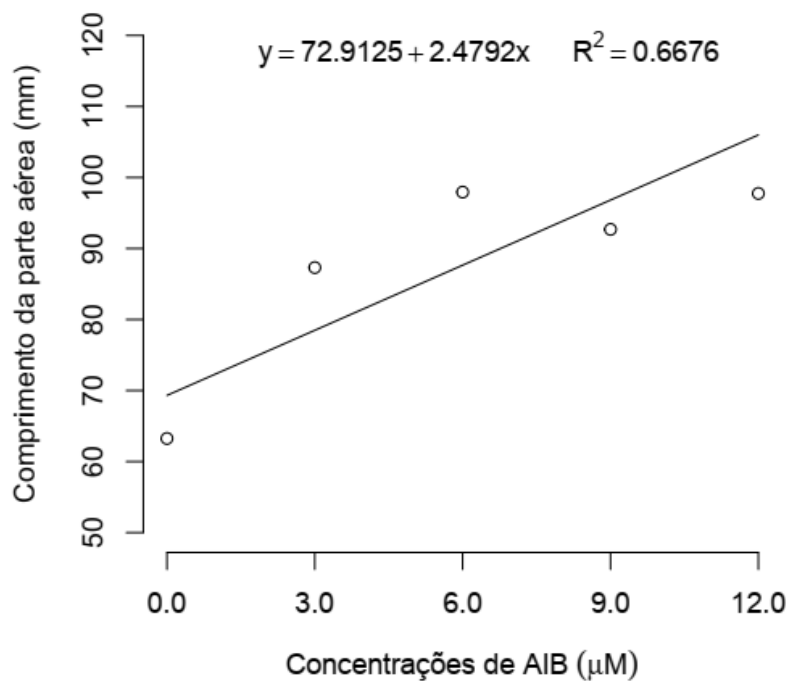


Figura 15. Comprimento da parte aérea de explante oriundos de bulbilho de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

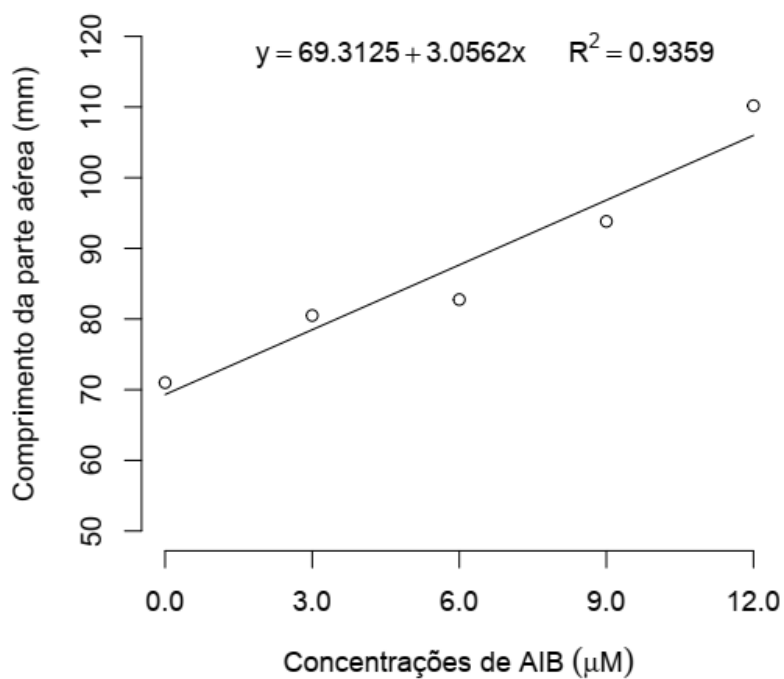


Figura 16. Comprimento da parte aérea de explante oriundos de rebento de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

Os explantes com altura inicial de 30 mm promoveu melhor crescimento das plantas. Em explante de rebento, brotos com altura inicial de 30 mm, a média foi de 101,8 mm de altura e brotos com altura inicial de 10 mm atingiram altura de 73,5 mm. De forma análoga, explantes provenientes de bulbilhos com altura inicial de 30 mm de altura obtiveram plantas com 108,8 mm de comprimento e, em contrapartida, brotos com comprimento inicial de 10 mm apresentaram redução no crescimento, alcançando 66,78 mm de altura (Figura 17).

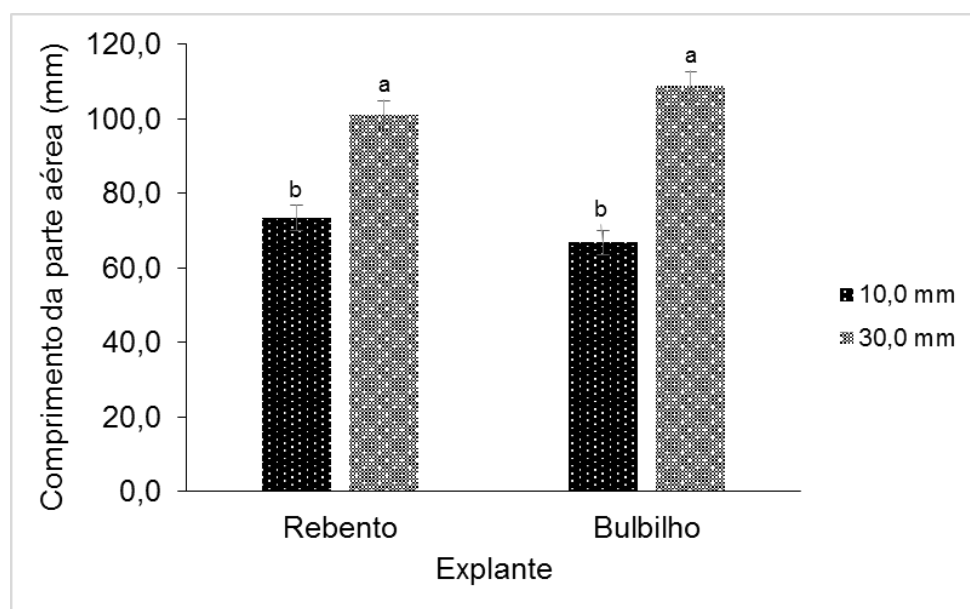


Figura 17. Comprimento da parte aérea de explante oriundos de rebento e bulbilho em função da altura inicial das brotações de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As respostas geradas pelo uso de plantas com tamanhos diferentes na espécie em estudo, talvez estejam relacionadas com sua condição nutricional, sendo a quantidade de reservas variável de acordo com o comprimento utilizado, pois podem apresentar maior teor de carboidratos e de auxinas endógenas (Mayer et al., 2002; Pizzatto et al., 2011) essencial para crescimento da parte aérea e raiz.

Os resultados de matéria fresca e seca da parte aérea confirmam a hipótese de que altas concentrações de AIB não prejudicaram o desenvolvimento da espécie in vitro. A matéria fresca da parte aérea aumentou linearmente em razão das

concentrações de AIB (Figura 18). Contudo, ao comparar os explantes verifica-se que os explantes de rebento obtiveram acúmulo de biomassa (0,887 g) superior aos explantes de bulbilhos (0,674 g) (Figura 19). O acúmulo de matéria fresca também foi determinado pela altura dos brotos iniciais. As brotações com tamanhos de 30 mm (1,053 g) obtiveram acréscimo de matéria fresca maior do que brotos com 10 mm de altura (0,502 g) (Figura 20).

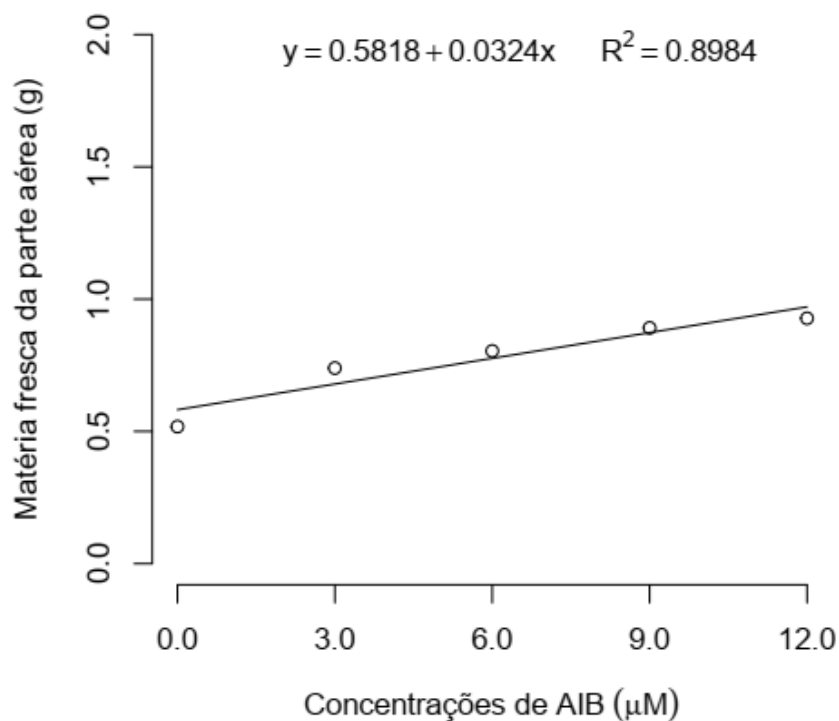


Figura 18. Matéria fresca da parte aérea de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS½, com diferentes concentrações de AIB.

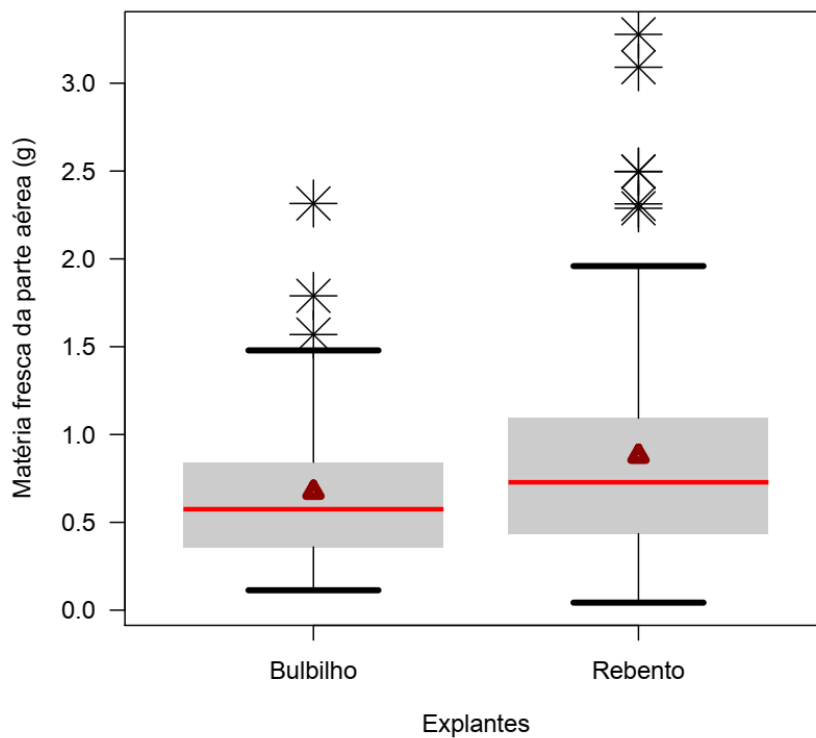


Figura 19. Matéria fresca da parte aérea em explantes originários de rebento e bulbilho de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

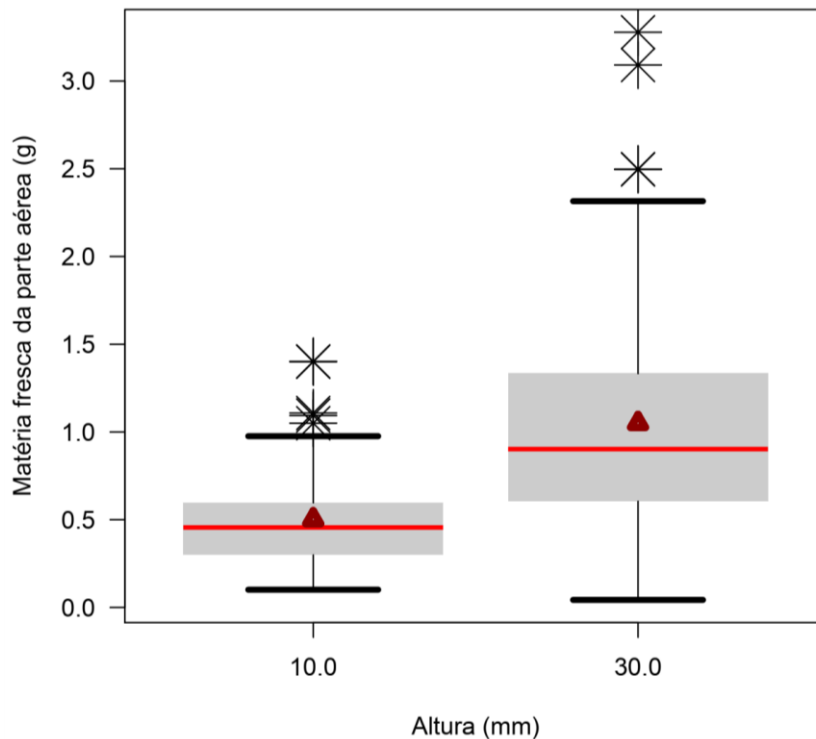


Figura 20. Matéria fresca da parte aérea de plantas de *A. sisalana* em função da altura inicial das brotações cultivadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

A matéria seca da parte aérea corrobora os dados obtidos para matéria fresca, exceto para o fator concentração de AIB, pois não apresentou diferença significativa, indicando que o aumento das concentrações de AIB não incrementaram o acúmulo de biomassa seca. O acúmulo de matéria seca variou com o tipo de explante, verificando maior acréscimo de biomassa em explante oriundo rebento (0,064 g) e menor acúmulo em explante proveniente de bulbilho (0,0418 g) (Figura 21). Em relação à altura inicial das brotações, o tamanho de 30 mm de altura possibilitou acúmulo de matéria seca superior (0,073 g) em relação as brotações com 10 mm de altura (0,033 g) (Figura 22).

Plantas bem desenvolvidas podem garantir o sucesso da fase de aclimatização. As variáveis de crescimento mostraram que para *A. sisalana* o tamanho das brotações iniciais e tipo de explante influenciaram na assimilação de carbono pelas plantas, indicando que explante a partir de rebento com altura inicial de 30 mm têm mais chances de sobreviver e apresentar melhor desempenho após transplantadas para condições ex vitro.

Embora em meio isento de regulador vegetal, a espécie tenha mostrado bons resultados para a rizogênese, a adição de AIB maximizou as respostas, demonstrando ser eficiente para o enraizamento, principalmente pela não indução de calos na base das brotações mesmo utilizando altas concentrações deste regulador vegetal.

A emissão de raízes ocorreu em todas as concentrações de AIB e em meio isento de regulador vegetal, com emissão diretamente proporcional ao aumento das concentrações, representado pelo modelo linear (Figura 23).

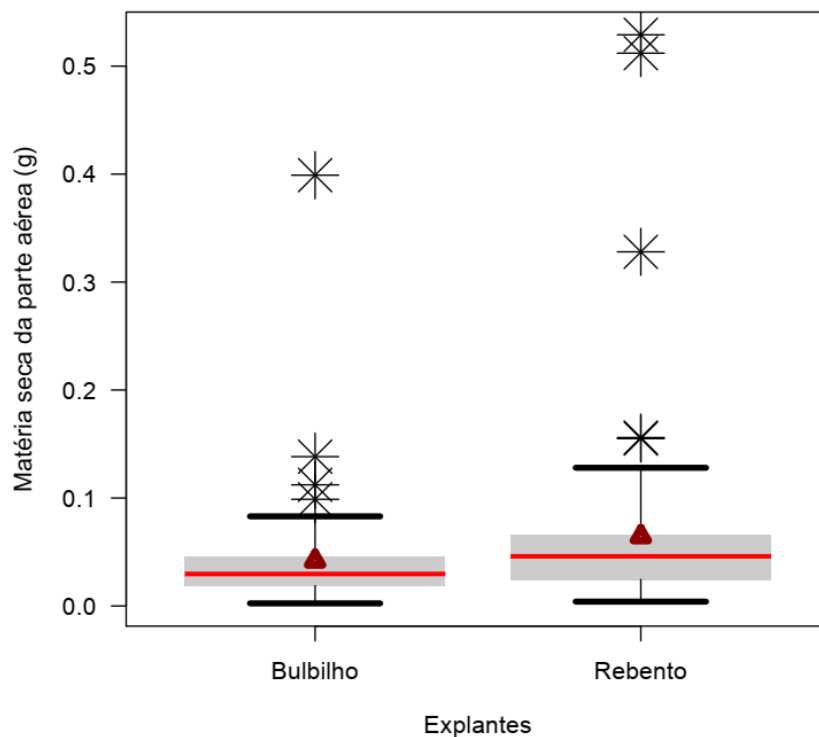


Figura 21. Matéria seca da parte aérea de explantes oriundos de bulbilho e rebento de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

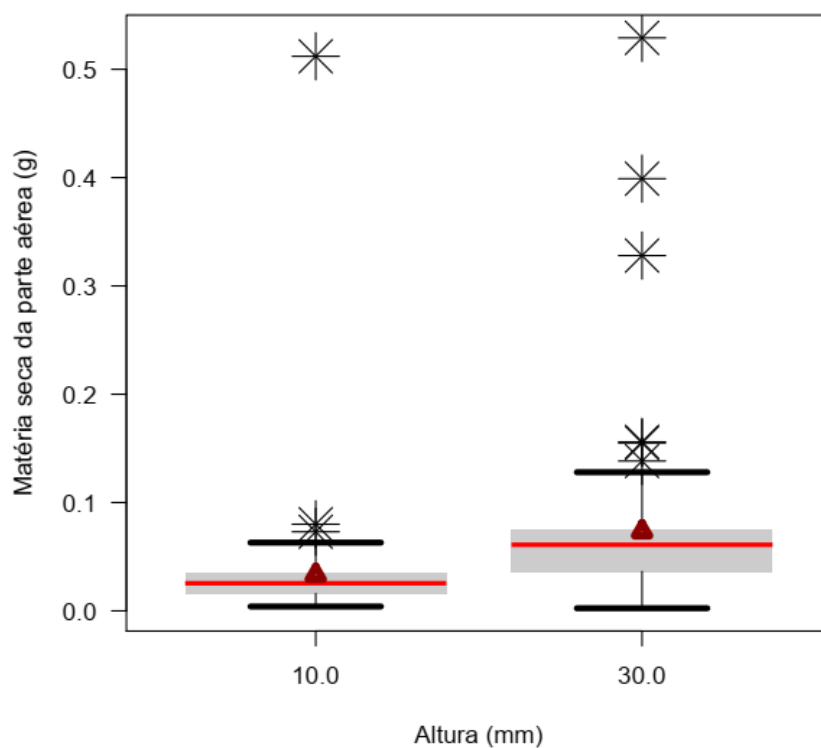


Figura 22. Matéria seca da parte aérea de plantas de *A. sisalana* em função da altura inicial das brotações cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

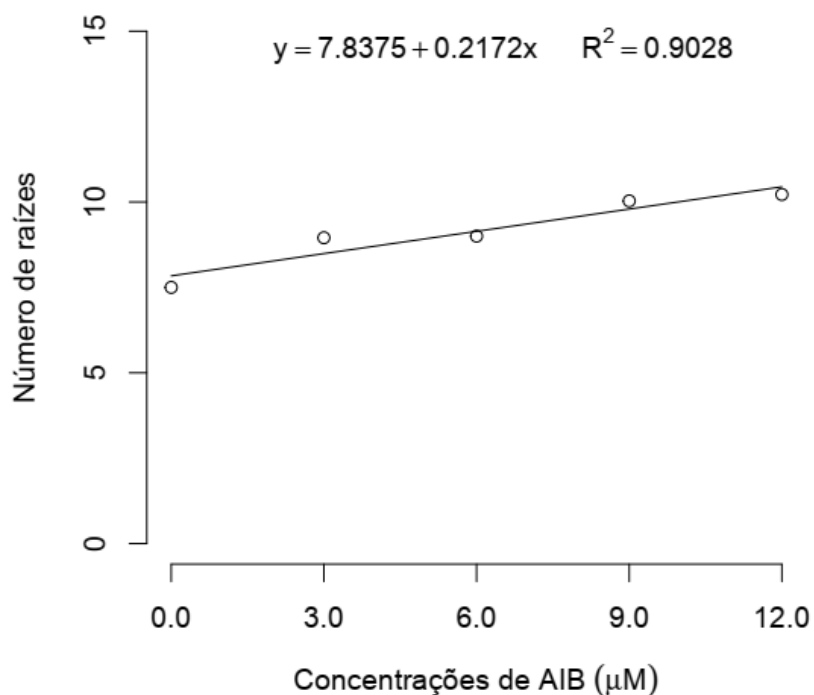


Figura 23. Número de raízes de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS½, com diferentes concentrações de AIB.

Notou-se que explantes a partir de rebento emitiram maior número de raízes (10 raízes por broto), em oposição a explante proveniente de bulbilho (8,28 raízes por broto) (Figura 24). Comportamento semelhante foi observado para a altura inicial do explante. Brotos com tamanho superior a 30 mm induziram número de raízes superior (10,38 raízes por broto) aos que possuíam 10 mm de comprimento inicial (7,9 raízes por broto) (Figura 25). Esses resultados estão em conformidade aos obtidos por Rios (2007), em que a porcentagem de enraizamento em explante a partir de bulbilhos de *A. sisalana* não foi afetada pela adição de AIB, no entanto, o maior número de raízes foi obtido na ausência deste (16,92 raízes por broto). Luna et al. (2013) chegaram à conclusão que, a adição de 2,49 µM ou 4,92 µM de AIB ao meio de cultivo estimulou maior número de raízes (8,25 por broto) em brotações de *A. americana* var. *oaxaquensis*. Em *A. marmorata* os autores verificaram maior número de raízes (3,95) ao adicionar 57 µM de AIA (Jiménez e La O, 2018).

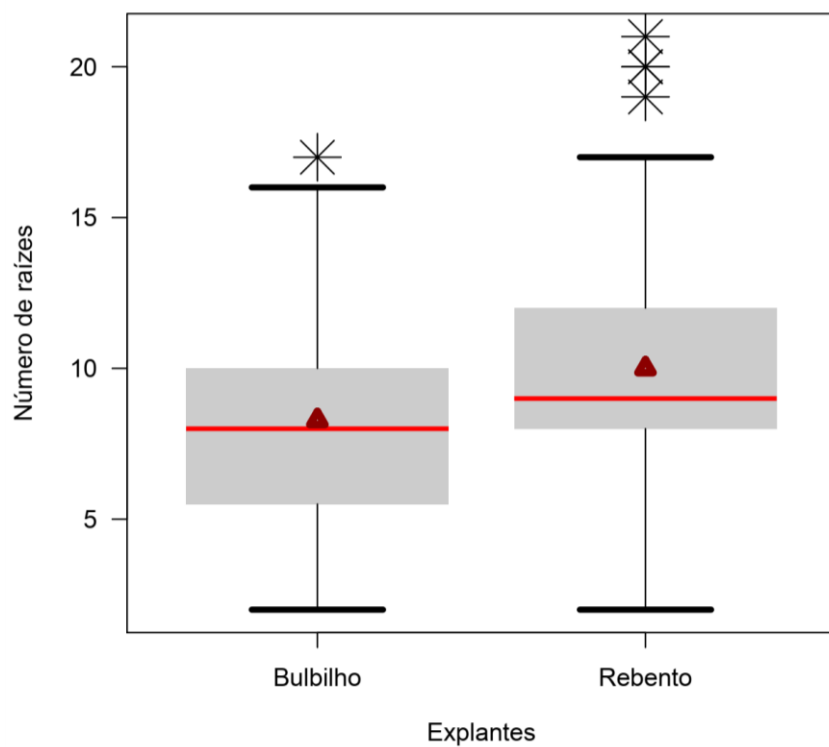


Figura 24. Número de raízes em explantes a partir de bulbilho e rebento de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

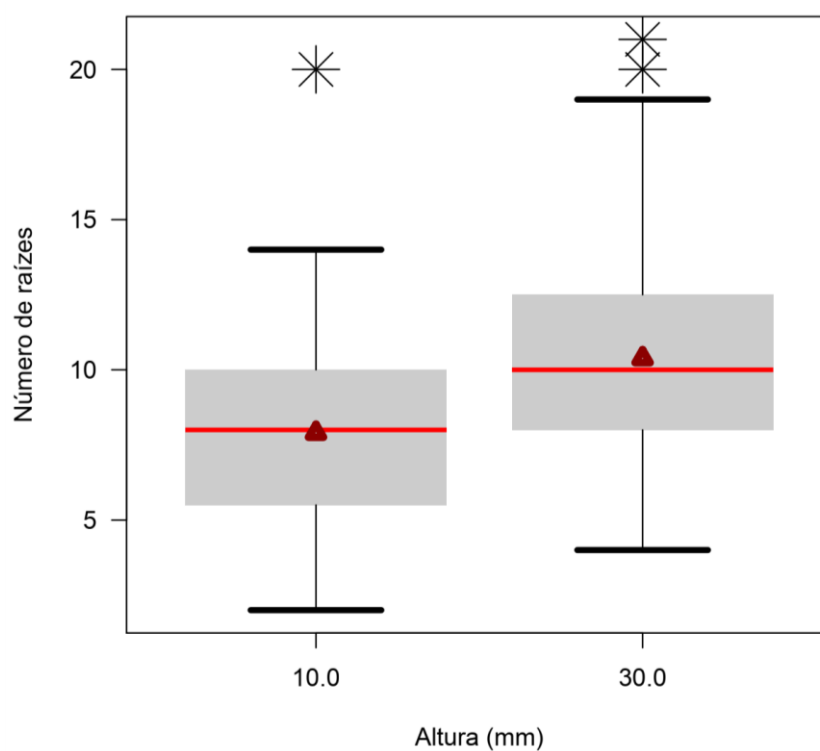


Figura 25. Número de raízes em explantes de plantas de *A. sisalana* em função da altura inicial das brotações cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

Os tipos de explantes e as concentrações de AIB não interferiram no comprimento da raiz, sendo observado diferença somente para fator altura inicial das brotações. Plantas com tamanho inicial de 30 mm promoveram maior comprimento das raízes (48,6 mm), em relação as brotações com altura inicial de 10 mm (35,6 mm) (Figura 26).

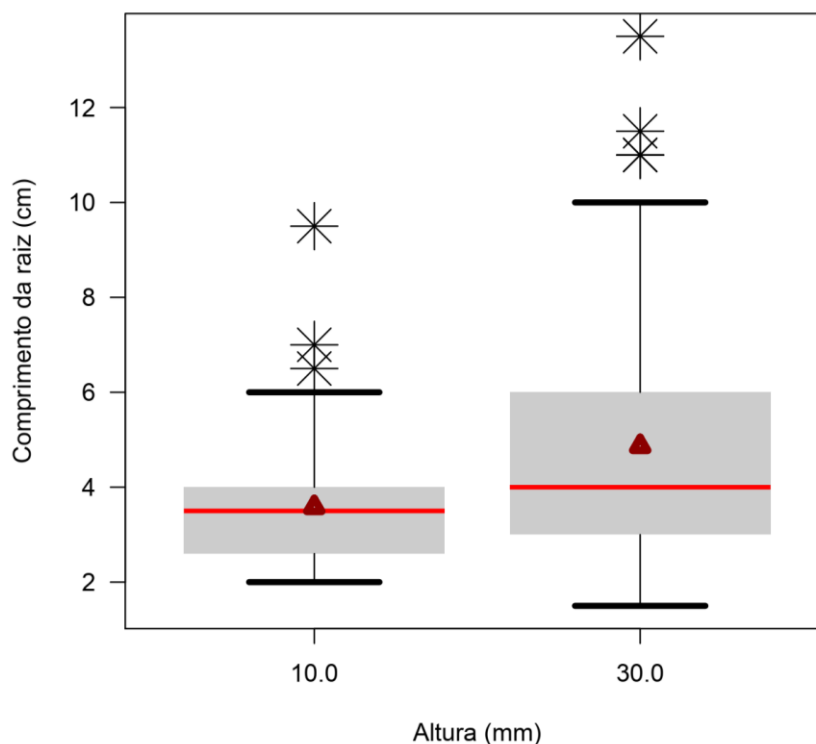


Figura 26. Comprimento da raiz em explantes de plantas de *A. sisalana* em função da altura inicial das brotações cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

Em outros estudos com espécies de Agave, após multiplicação e transferidos para meio de cultura de enraizamento, obtiveram resultados superiores aos obtidos para *A. sisalana* após subcultivo. O comprimento da raiz em explantes provenientes de bulbilhos de *A. sisalana* foi maior (8,28 cm) em meio de cultura isento de AIB (Rios, 2007). Em *A. americana* var. *oaxacensis* o maior comprimento das raízes (9,57 cm) foi notado ao acrescentar no meio de cultura 7,38 μ M de AIB (Luna et al., 2013). Plantas de *A. marmorata* verificaram maior comprimento das raízes (8,2 cm e 9,3 cm) determinada pela adição de 17,1 μ M e 57 μ M de IAA (Jiménez e La O, 2018).

Notou-se que o acréscimo de matéria fresca da raiz foi proporcional ao aumento das concentrações de AIB, simulado pelo modelo linear (Figura 27). Na concentração de 12 μM de AIB, obteve média de 0,367 g e na ausência de regulador vegetal 0,240 g de matéria fresca da raiz.

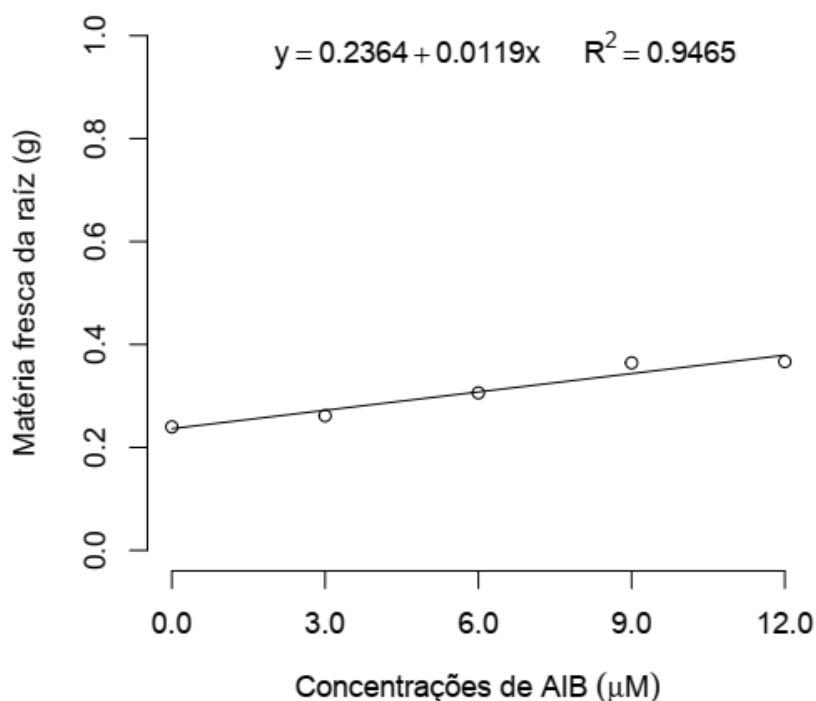


Figura 27. Matéria fresca da raiz de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

O explante de rebento apresentou melhor acréscimo de biomassa fresca de raiz, independentemente do tamanho inicial das brotações, em relação a explante proveniente de bulbilho. Plantas com tamanho iniciais de 10 mm exibiram média de 0,274 g para explante a partir de rebento e 0,174 g de matéria fresca de raiz para explante de bulbilho (Figura 28). Brotações com tamanho iniciais de 30 mm obtiveram acúmulo de 0,500 g nos explantes provenientes de rebento e 0,281 g de matéria fresca para explantes de bulbilho. Os explantes de rebento e bulbilho exibiram maior acúmulo de matéria fresca de raiz (0,550; 0,281 g), respectivamente, quando utilizado brotos com 30 mm de comprimento (Figura 29).

Ao avaliar matéria seca da raiz, os resultados anteriores foram confirmados, pois brotações com tamanho inicial de 30 mm e explante proveniente de rebento exibiram melhor enraizamento. Ao comparar os explantes, somente nas

concentrações de 3 e 6 μM de AIB, a média para matéria seca da raiz não diferiu. Entretanto, nos demais tratamentos o explante de rebento apresentou maior acúmulo de matéria seca (Figura 30). O explante a partir de bulbilho não diferiu para matéria seca em razão das concentrações avaliadas, com acréscimo de 0,0218 g de biomassa seca. Em contrapartida, explante proveniente de rebento apresentou comportamento crescente em função das concentrações, representada pela equação linear (Figura 31). Independentemente do tipo de explante, brotações com tamanhos iniciais de 10 mm obtiveram menor acúmulo de matéria seca (0,0204 g) e brotações com tamanhos iniciais de 30 mm verificou-se maior acúmulo de matéria seca (0,0350 g) (Figura 32).

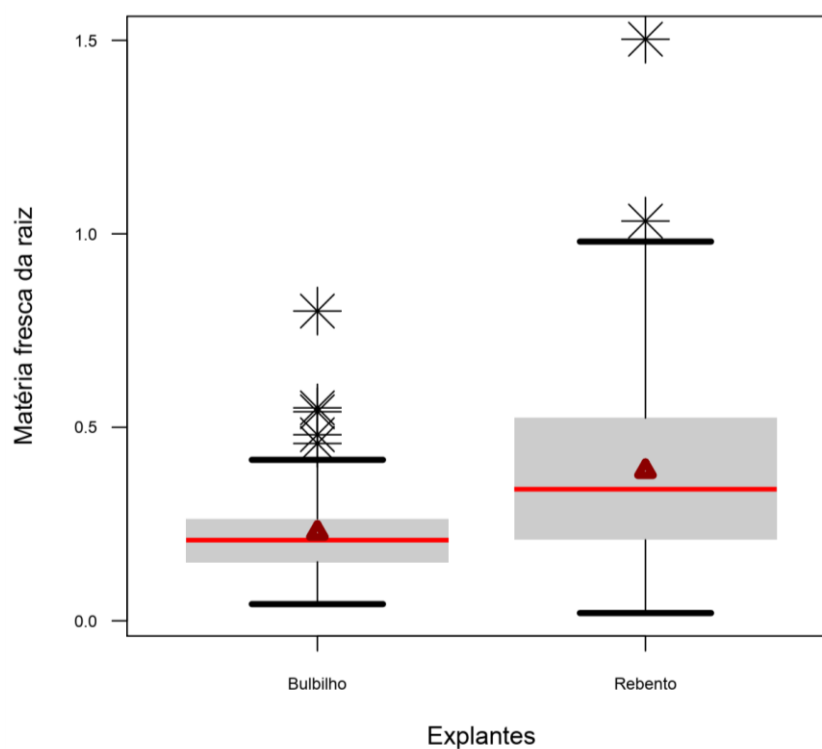


Figura 28. Matéria fresca da raiz de explante a partir de bulbilho e rebento de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

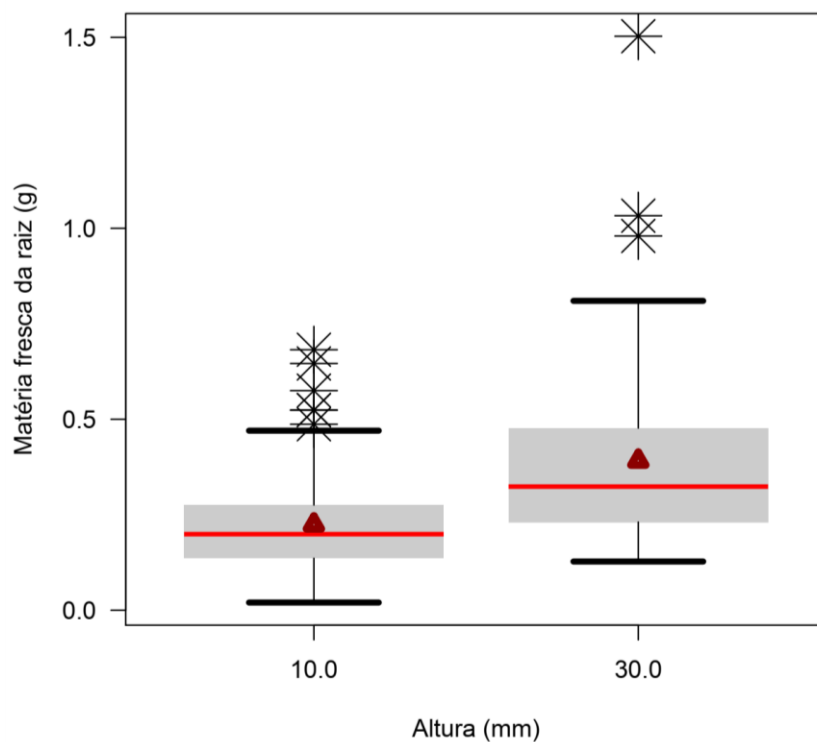


Figura 29 Matéria fresca da raiz de plantas de *A. sisalana* em função da altura inicial das brotações cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

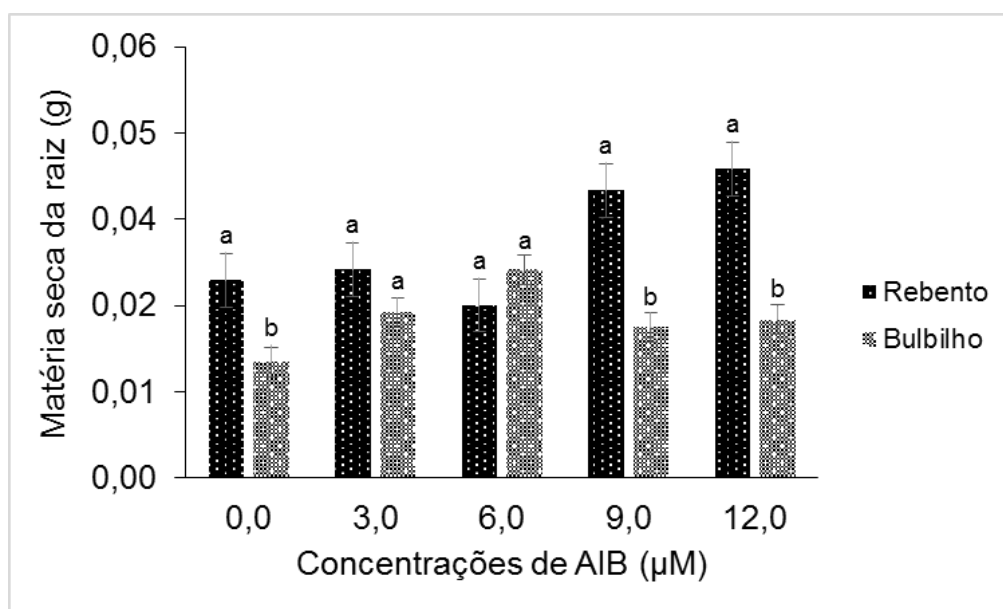


Figura 30. Matéria seca da raiz de explantes oriundos de rebento e bulbilho de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

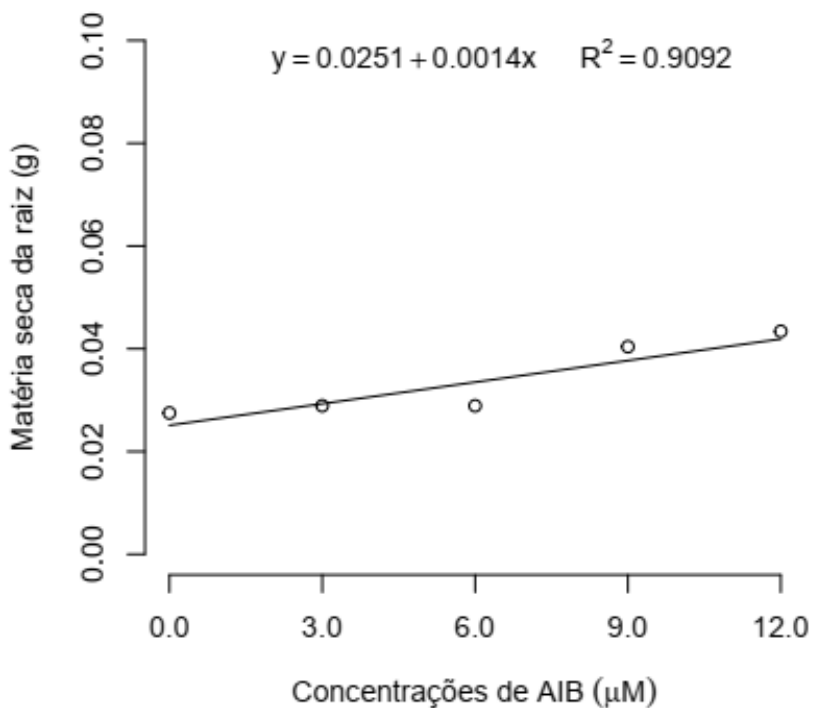


Figura 31. Matéria seca da raiz de explante a partir de rebento de plantas de *A. sisalana* cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

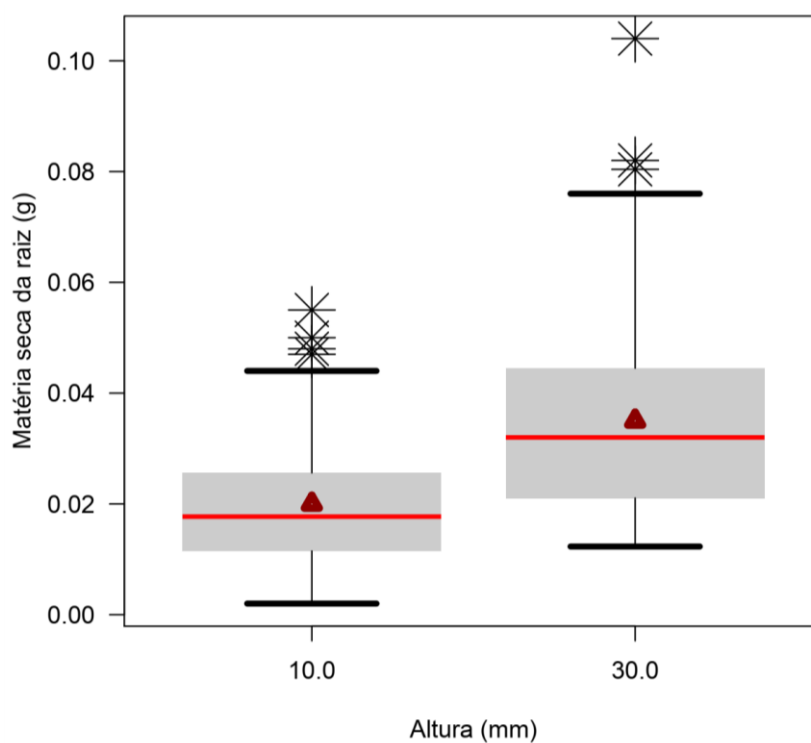


Figura 32. Matéria seca da raiz de plantas de *A. sisalana* em função da altura inicial das brotações cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de AIB.

Os fatores com maior influência na promoção de rizogênese em *A. sisalana*, foram tipo de explante e tamanho inicial das brotações. O explante proveniente de rebento obteve melhores resultados nas variáveis avaliadas e a utilização de brotos com tamanhos maiores potencializou a resposta, promovendo melhor crescimento da parte aérea e raiz na concentração de 12 μ M de AIB. As Figuras 33A e B, mostram brotações de explantes a partir de rebento e bulbilho em meio de enraizamento.

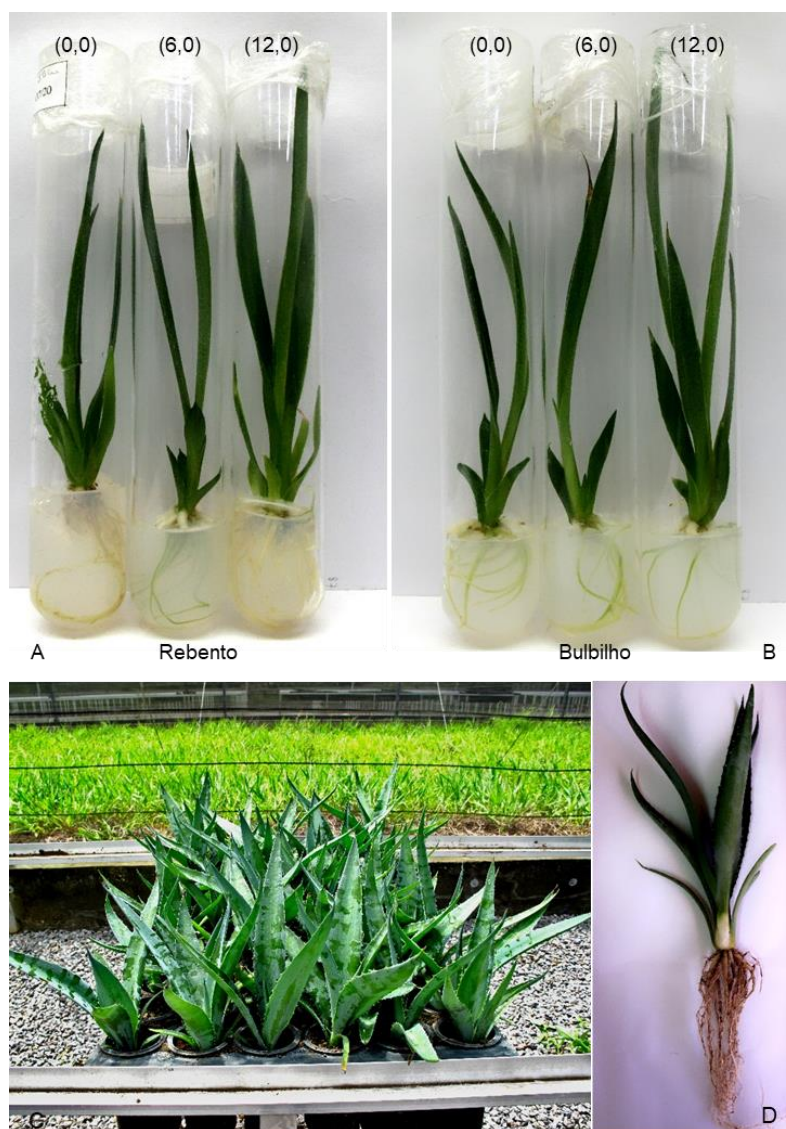


Figura 33. Plantas enraizadas in vitro: A partir de explante rebento (A) e bulbilho (B); Plantas aclimatizadas após 90 dias de transplante (C e D).

Após 45 dias em meio de cultura de enraizamento, as mudas com 100 mm de altura e sistema radicular bem desenvolvido oriundas de rebentos e bulbilhos

foram transferidas para casa de vegetação, sem passar por uma fase de rustificação e sem a utilização de cobertura com recipientes após transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro*. Observou-se que, com 30 dias as plantas começaram a emitir novas folhas e a não expansão das existentes, as quais aos noventa dias apresentavam sinais de senescência. A taxa de sobrevivência foi de 100%, com plantas morfológicamente bem desenvolvidas e adaptadas as condições *ex vitro* (Figura 33C e D), indicando que não há necessidade de pré-aclimatização, diminuindo os custos e tempo para produção de mudas.

CONCLUSÕES

1. O processo de desinfestação realizado nos explantes é eficiente, mostrando não ser necessário a utilização de tratamentos com fungicidas e antibióticos.
2. Os explantes tTCLs nas posições AP e MI₁ oriundos de rebentos e bulbilhos podem ser estabelecidos direto em meio de cultura MS^{1/2} com a presença de 13,32 µM de BAP, obtendo ganho (otimizando) de tempo ao utilizar a fase de estabelecimento para início da multiplicação dos brotos de *A. sisalana*, sem período de adaptação *in vitro*.
3. Na etapa de subcultivo, os explantes oriundos de rebento são mais responsivos para indução de brotos na presença de 13,328 µM de BAP.
4. O aumento do número de subcultivos induziu a formação de culturas nodulares e calos friáveis.
5. A concentração de 12 µM de AIB e explante proveniente de rebento com tamanho inicial de 30 mm apresentou melhor resposta na rizogênese, mas todos os explantes utilizados foram enraizados.
6. As mudas enraizadas *in vitro* independentes da origem do explante apresentam sucesso na aclimatização. A taxa de sobrevivência aos noventa dias foi de 100%, com plantas morfológicamente bem desenvolvidas e adaptadas as condições *ex vitro* de *A. sisalana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdellatif, K.F et al., 2012. Morphological and molecular characterization of somaclonal variations in tissue culture-derived banana plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10, 47-53.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2012.05.002>.

Bairu, M.W., Aremu, A.O., Van Staden, J., 2010. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147-173.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>.

Bairu, M.W., Fennell, C.W., Van Staden, J., 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA* cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, 108, 347-351.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.039>.

Binh, L.T et al., 1990. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23, 67–70. <https://doi.org/10.1007/BF00116091>.

Botura, M.B et al., 2013. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192, 211-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.012>.

Brum, G.R. et al., 2002. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação in vitro da figueira (*Ficus carica* L.). *Ciência Agrotécnica*, 26, 1403-9.

Caraballo, M.G et al., 2010. Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 545-551.
<http://dx.doi.org/10.4067/s0718-58392010000400003>.

Carneiro, F.S et al., 2014. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44, 294-303. <http://dx.doi.org/10.1590/s1983-40632014000300005>.

Chen, Y et al., 2014. Micropropagation of *Agave americana*. HortScience, 49, 320-327. American Society for Horticultural Science.
<http://dx.doi.org/10.21273/hortsci.49.3.320>.

Costa, F.H da S et al., 2006. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). Revista Brasileira de Fruticultura, 28, 280-283.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452006000200028>.

Da Rosa, J et al., 2020. Carvão ativado influencia a morfogênese in vitro de *Gypsophila paniculata* L. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão.

Das, T., 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31, 253–255. <https://doi.org/10.1007/BF00036233>.

Debnath, M et al., 2010. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. Journal of Medicinal Plants Research, 177-187. ISSN 1996-0875.

De-La-Peña, C et al., 2012. *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. BMC Plant Biology, 12, 203-203.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-203>.

Deng, G et al., 2019. Identification and expression of *SAUR* genes in the CAM plant *Agave*, Genes.10, 555-555. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10070555>.

Díaz-Martínez, M et al. Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. Plant Science, 185-186, 321-330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.004>.

Duarte, T da S., Peil, R.M.N., 2010. Relações fonte: dreno e crescimento vegetativo do meloeiro. *Horticultura Brasileira*, 28, 271-276.

<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-05362010000300005>.

Duarte-Aké, F et al., 2016. Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process. *Plant Cell Reports*, 35, 2489-2502.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-016-2049-0>.

Eeuwens, C.J et al., 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 311-323.

<http://dx.doi.org/10.1023/a:1016543921508>.

Fagan, E.B et al., 2015. *Fisiologia vegetal: reguladores vegetais*. 1ª Edição, Andrei Editora, pp. 300.

Fagundes, C. de M. et al., 2016. Carvão ativado no estabelecimento in vitro de cultivares de framboeseira. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 16, 406-413.

<http://dx.doi.org/10.5965/223811711642017406>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016. Faostat database. <http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>. Acesso em: maio.2020.

Fermino Junior, P.C.P et al., 2014. Morfo-histologia de culturas nodulares na micropropagação de *Aechmea setigera* mart. ex schult. & schult. f. (bromeliaceae). *Evidência, Joaçaba*, 14, 85-98. ISSN 2236-6059.

Gama, E.V.S. et al., 2014. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 649-656.

<http://dx.doi.org/10.1007/s13593-014-0255-0>.

George, E.F., Klerk, G.J., 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G-J (ed) Plant Propagation by Tissue Culture, 3^o ed. Edition, Dordrecht: Springer, pp.65-114.

Graner, E.M et al., 2019. Long-term in vitro culture affects phenotypic plasticity of *Neoregelia johannis* plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137, 511-524.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-019-01586-7>.

Guson, R.R., Moraes, C.P., Ronconi, C.C., 2012. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento in vitro de *Cattleya pumila* Hook. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 5, 551-563.
<https://doi.org/10.17765/2176-9168.2012v5n3p%25p>.

Hartmann, H.T et al., 2011. *Plant propagation: principles and practices*. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall.

Hu, C.Y., Wang, P.J., 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Culture. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y., Eds., *Handbook of Plant Cell Culture*, Macmillan, New York. 1, 177-227.

Jiménez, D.A., Lao, J.L.R., 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20, 124-131.
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>.

Kerbauy, G.B., 2008. *Fisiologia vegetal*. Ed. Guanabara Koogan, 2^a Ed. Rio de Janeiro, pp.116-223.

Lecona-Guzmán, C.A et al., 2017. In vitro propagation of *Agave americana* by indirect organogenesis. *HortScience*, 52, 996-999.
<http://dx.doi.org/10.21273/hortsci10498-16>.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.

Lone, A. B et al., 2010. Enraizamento de estacas de azaleia (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono em AIB e diferentes substratos. *Ciência Rural*, 40, 1720-1725. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010000800008>.

Loyola-Vargas, V.M., Vazquez-Flota, F., 2006. *Plant Cell Culture Protocols*, 2nd ed. *Methods in Molecular Biology*, pp.53-56. <http://dx.doi.org/10.1385/1592599591>.

Lucchesini, M et al., 2006. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions. *Biologia Plantarum*, 50, 161-168. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-006-0001-9>.

Luna, M.E.M et al., 2013. Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4, 1151-1159.

Majada, J.P et al., 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38, 272-278. <http://dx.doi.org/10.1079/ivp2001271>.

Mayer, N.A., Pereira, F.M., Nachtigal, J.C., 2002. Efeito do comprimento de estacas herbáceas de dois clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) no enraizamento adventício. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24, 500-504. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452002000200044>.

Monfort, L.F et al., 2012. Efeito do BAP no cultivo in vitro de *Ocimum selloi* Benth. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s,14, 458-463. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722012000300006>.

Monja-mio, K.M., Robert, M.L, 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49, 541-549. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Nikam, T., 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 225–228.

<https://doi.org/10.1023/A:1005976304198>.

Nwauzoma, A.B., Jaja, E.T., 2013. A review of somaclonal variation in plantain (*Musa* spp): mechanisms and applications. *Journal of Applied Biosciences*, 67, 5252-5260. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v67i0.95046>.

Pasa, M.S et al., 2012. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural*, 42, 1392-1396. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800010>.

Pescador, R. et al., 2015. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3, 200-200.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2015.04.001>.

Pimentel, C., 1998. *Metabolismo do carbono na Agricultura Tropical*. Edur, Seropédica, pp.150.

Pizzatto, M et al., 2011. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. *Revista Ceres*, 58, 487-492. <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-737x2011000400013>.

Portillo, L et al., 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43, 569-575.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>.

Reis, E.S. et al., 2008. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. Revista Ceres, 55, 160-167.

Rios, A.P., 2007. Estabelecimento, organogênese direta e aclimatização de sisal (*Agave sisalana* Perrine). Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Feira de Santana.

Ríos-Ramírez, S. del C et al., 2017. Benzylaminopurine and indol-3-acetic acid concentrations in in vitro proliferation of *Agave angustifolia* adventitious shoots. Ciencia e Investigación Agraria, 44, 284-293.
<http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>.

Ríos-Ramírez, S.C et al., 2018. In vitro formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. Emirates Journal of Food and Agriculture, 49-56.
<http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i1.1584>.

Rosa, W.S., 2017. Desempenho do aparato fotossintético em função das citocininas empregadas durante a fase de multiplicação in vitro de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. <http://repositorio.ufes.br/handle/10/8302>.

Ryugo, K., Breen, P.J., 1974. Indoleacetic acid metabolism in cuttings of pium (*Prunus cerasifera* x *P. munsoniana* cv. Mariana 2624). Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences, 99, 247.

Santos, M.R.A., Ferreira, M.G.R., Marques, M.G., 2010. BAP e AIB no cultivo in vitro de *Epidendrum ibaguense* Kunth. Plant Cell Culture & Micropropagation, 6, 90-98.
<http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/72>. 21 Ab. 2017.

Sarmast, M.K., 2018. In vitro propagation of conifers using mature shoots. *Journal of Forestry Research*, 29, 565-574. <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-018-0608-7>.

Schuch, M.W., Erig, A.C., 2005. Micropropagação de plantas frutíferas. In: Fachinello, J.C.; Hoffmann, A.; Nachtigal, J.C. (Eds.). *Propagação de plantas frutíferas*. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, pp.155-173.

Schwalbert, R et al., 2015. Multiplicação in vitro de *Desmodium incanum* em presença de carvão ativado. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*, 11, 2015-1365.

Silva, R.L da et al., 2016. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 123-133. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-016-1035-0>.

Taiz, L. et al., 2017. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. Porto Alegre, Artmed, 6ª edição.

Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, pp. 449-484.

Thiesen, L.A et al., 2017. Correlação de Pearson entre pigmentos fotossintetizantes e fitomassa de plantas de *Aloysia triphylla*. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 2, 249-257. <http://dx.doi.org/10.24221/jeap.2.3.2017.1450.249-257>.

Varshney, A., Anis, M., 2011. Improvement of shoot morphogenesis in vitro and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 859-867. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0883-9>.

Villa, F., Pasqual, M., Silva, E.F., 2014. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio ms, benzilaminopurina e carvão ativado. *Semina: Ciências Agrárias*, 35, 683-694. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p683>.

Von Elbe, J. H., 2000. Colorantes. In: Fennema O. W. (Ed.) Química de los alimentos. 2.ed. Zaragoza, Wisconsin-Madison, pp.782-799.

Zhang, L et al., 2016. Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors. International Journal of Molecular Sciences, 18, 33-33. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18010033>.

ARTIGO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE SISAL, AGAVE HÍBRIDO 11648¹

¹ Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Scientia Horticulturae*, em versão na língua inglesa.

Micropropagação de sisal (agave híbrido 11648)

Autor: Priscila Tavares Fonseca

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

Resumo: O agave híbrido 11648 é resultante do melhoramento de agave derivado do retrocruzamento de duas espécies diploides: (*A. amaniensis* × *A. angustifolia*) × *A. amaniensis*, amplamente cultivada para a produção de fibra. O trabalho teve como objetivo avaliar as etapas da micropropagação do agave híbrido 11648 para obtenção de um protocolo eficiente para produção de mudas. Foram realizadas as seguintes avaliações: 1- Estabelecimento e a posição do explante na multiplicação in vitro, com as concentrações de 0,0; 13,32; 26,64; 39,96; 53,28 µM de BAP; 2- Subcultivo in vitro, usando as concentrações de 6,66; 13,32; 19,98; 26,64; 39,96; 53,28 µM de BAP; 3- Enraizamento in vitro nas concentrações de 0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 µM de AIB e 4- aclimatização. A concentração de 13,32 µM de BAP (45,17 brotos por planta) foi eficiente para indução de brotos, assim como os tTCLs na posição de AP, MI₁ e MI₂. Nos subcultivos a indução de brotações em sisal obteve média 10,04 brotos por explante, entretanto, induziu a formação de culturas nodulares e calos friáveis. Altas concentrações de AIB não favoreceram o enraizamento in vitro. Explantes com tamanho superior a 30 mm de altura obtiveram melhor resposta na rizogênese. A taxa de sobrevivência das plantas foi de 100%, após transferidas para casa de vegetação.

Palavras-chave Agave. Morfogênese. Subcultivo. Citocinina. Auxina

Micropropagation of sisal (agave hybrid 11648)

Author: Priscila Tavares Fonseca

Adviser: Ana Cristina Fermino Soares

Abstract: The agave hybrid 11648 is the result of the improvement of agave derived from the backcross of two diploid species: (*A. amaniensis* × *A. angustifolia*) × *A. amaniensis*, widely cultivated for the production of fibers. This work aimed to evaluate the effect of BAP and IBA on the in vitro morphogenesis of the agave hybrid 11648. The following assessments were performed: 1- Establishment and influence of the disk segment position (TCLs) for in vitro multiplication, using BAP concentrations of 0.0; 13.32; 26.64; 39.96; 53.28 µM; 2- Subculture in vitro, with 6.66; 13.32; 19.98; 26.64; 39.96; 53.28 µM of BAP; 3- Rooting in vitro at concentrations of 0.0; 3.0; 6.0; 9.0; 12.0 µM IBA and 4- acclimatization. For in vitro multiplication, activated carbon inhibited the formation of sprouts. The concentration of 12.32 µM of BAP (45.17 sprouts / plant) was efficient for sprout induction, as well as the tTCLs AP, MI1 and MI2. In the subcultures, the induction of shoots in sisal obtained an average of 10.04 shoots for explant, however, it induced the formation of nodular cultures and friable calluses. High concentrations of IBA did not favor in vitro rooting. Explants with a size greater than 30 mm in height showed better response in the rhizogenesis. The survival rate of the plants was 100% after being transferred to the greenhouse.

Keywords Agave. Morphogenesis. Subculture. Cytokinin. Auxin

INTRODUÇÃO

O agave híbrido 11648 é originário da África e foi introduzido no Brasil na década de 70. É resultante do melhoramento de agave derivado do retrocruzamento de duas espécies diplóides: (*A. amaniensis* x *A. angustifolia*) x *A. amaniensis* (Dahal et al., 2003; Deng et al., 2019; Huang et al., 2019). A primeira se caracteriza por apresentar folhas grandes e de boa conformação e, a segunda, por produzir elevado número de folhas (Salgado et al., 1979).

Este agave é amplamente cultivado, ocupando a posição de segundo cultivar mais plantado no Brasil e de grande importância para os territórios africanos (Alvarenga, 2012; Silva; Beltrão, 1999; Suinaga et al., 2007) para a produção de fibras. Durante seu ciclo de vida, entre 8 a 13 anos, a planta produz em média de 560-650 folhas e 4,73 a 5,96 toneladas de fibra seca/ano/ha, dependendo das condições ambientais, manejo da lavoura e idade da planta (Jamil et al., 2019). A produção de folhas e fibras equivale a duas ou três vezes à do sisal comum (Salgado et al., 1979) e não possui espinhos nas bordas das folhas, o que facilita o processo de colheita e desfibramento. Em comparação com *A. sisalana*, é superior na produção de folhas, na produtividade de fibras por hectare e potencial de produção (Silva et al., 1999).

No Brasil as áreas de plantação do sisal são afetadas pela podridão vermelha em *A. sisalana* causadas pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018), sendo o híbrido 11648 mais resistente a podridão vermelha (Moreira; Vieira, 1999). Porém, um dos grandes desafios para as plantações de híbrido 11648 é a disponibilidade de mudas, pois a reprodução sexuada por sementes é rara e a propagação assexuada por bulbilhos e rebentos ocorre de forma lenta.

Diante da necessidade constante de aumento de produtividade e introdução de novas tecnologias para obtenção de mudas com qualidade fitossanitária e uniformidade, em um curto intervalo de tempo, a micropropagação é uma alternativa interessante.

A tecnologia de micropropagação permite projetar sistemas intensivos de produção de plantas com ambiente de propagação devidamente controlado (Fortes et al., 2010). O sucesso da micropropagação consiste em alto coeficiente de multiplicação, com pequenas demandas no número de plantas iniciais e no

espaço (Hussain et al., 2012). Um único explante pode ser multiplicado em centenas e milhares de plantas em um período de tempo relativamente curto e espaço sob condições controladas, independentemente da estação e do clima em uma base anual (Akin-Idowu et al., 2009).

A propagação *in vitro* fundamenta-se na cultura asséptica de diferentes explantes em um meio de cultura, aplicando o princípio da totipotencialidade das células para induzir divisão de células, morfogênese e desenvolvimento da planta (Siddique et al., 2015), no qual o sucesso da regeneração *in vitro* é dependente de vários fatores como: desinfestação, genótipo, tipo, idade, tamanho dos explantes, composição dos meios de cultura, condições de cultivo e tipos e concentrações de reguladores vegetais (Silva et al., 2008).

Os reguladores vegetais desempenham um papel essencial na determinação da via de desenvolvimento de células e tecidos vegetais em meio de cultura. Auxinas e citocininas são os reguladores vegetais mais amplamente usados em cultura de tecidos de plantas e sua quantidade determina o tipo de cultura estabelecida ou regenerada (Hussain et al., 2012). A alta concentração de auxinas geralmente favorece a formação de raízes, enquanto a alta concentração de citocininas promove a regeneração de brotos. Um equilíbrio de auxina e citocinina leva ao desenvolvimento de uma massa de células indiferenciadas conhecida como calo (Hussain et al., 2012).

Sistemas bem-sucedidos de micropropagação e regeneração através de organogênese ou embriogênese somática já foram descritos nas espécies de *Agave* evidenciando a influência de diferentes fontes de explantes (folhas imaturas, pseudocaule e rizomas), na organogênese indireta em híbrido 11648 (Zhang et al., 2013), embriogênese somática de *A. tequilana* Weber (Portillo et al., 2007), micropropagação de *A. americana* (Chen et al., 2014), embriogênese somática de *A. sisalana* (Carneiro et al., 2014) e *A. angustifolia* (Duarte-Ake et al., 2016) e micropropagação de *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez et al., 2017), mecanismos modulados principalmente pelo uso de reguladores vegetais citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e auxinas ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D) ou ácido indolbutírico (AIB).

Entretanto, na literatura não há registros de estudos sobre a influência de reguladores vegetais nas etapas do processo de micropropagação via organogênese direta do híbrido 11648. Nesse sentido, é necessário avaliar o

efeito das concentrações de reguladores vegetais para melhor compreender os processos de morfogênese e organogênese in vitro do híbrido 11648.

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar as etapas da micropropagação do híbrido 11648 para obtenção de um protocolo eficiente.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

A coleta de agave híbrido 11648 foi realizada na região sisaleira do semiárido baiano, localizada no município de Conceição do Coité (Latitude: 11° 33' 41" Sul, Longitude: 39° 17' 10" Oeste), Bahia, Brasil. Foram coletados apenas rebentos do híbrido 11648, pois este produz poucos bulbilhos e não foram encontrados bulbilhos nas áreas de coleta.

2.2 Multiplicação in vitro de *Agave sisalana*

2.2.1 Estabelecimento in vitro de segmentos de pseudocaule de Agave híbrido 11648 utilizando a técnica TCL com concentrações de BAP

Plantas de híbrido 11648 foram desfolhadas, deixando as folhas mais jovens e centrais da roseta, próximas do meristema apical, e reduzidos a segmentos de pseudocaule (cerca de 6,0 cm de altura). Em seguida foi realizada a desinfestação em câmara de fluxo laminar, com imersão em álcool 70% (2 minutos) e solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê®) por 20 minutos e submetidos a quatro lavagens em água destilada esterilizada.

Após a desinfestação, procedeu-se à incisão das folhas e redução do pseudocaule utilizando a técnica TCL (Thin Cell Layer), seccionando transversalmente em segmentos finos (tTCLs) a região abaixo do meristema apical, dispostos nas posições em tTCLs apical (AP), mediano (MI₁ e MI₂) e basal (BA), com aproximadamente 0,5 mm de espessura x 0,5 cm de diâmetro. Os explantes foram inoculados em frasco borel de plástico (252 mm x 329 mm) contendo 40 mL de meio de cultura MS½ (Murashige e Skoog, 1962),

suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 13,32; 26,64; 39,96; 53,28 μM), acrescido de 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 5 (posição de TCLs x concentração de BAP) totalizando 20 tratamentos, com 6 repetições, cada uma constituída por 4 unidades experimentais. Aos 60 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de contaminação (% C) e oxidação (% OX), número de brotos total por planta (T_{nb}); número de brotos nas posições de tTCLs: região apical (AP), região mediana (MI_1 e MI_2) e região basal (BA); comprimento da parte área em cm (CPA); número de folhas (NF); porcentagem de plantas hiperídricas (% H); matéria fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA).

2.2.2 Multiplicação in vitro com subcultivos de Agave híbrido 11648

As brotações de híbrido 11648, provenientes do experimento de multiplicação, foram incisados reduzindo-se as folhas e o pseudocaule segmentado longitudinalmente (base $\frac{1}{2}$) com aproximadamente 10 mm de altura. Em seguida, esses explantes, formados pelo pseudocaule segmentado foram inoculados em frasco borel contendo 40 mL de meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ acrescido de 6,66; 13,32; 19,98; 26,64; 39,96; 53,28 μM de regulador vegetal BAP, suplementado com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. Foram realizados quatro ciclos de multiplicação a cada 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 6 (subcultivo x concentrações de BAP), totalizando 24 tratamentos, com três repetições, cada uma constituída por quatro unidades experimentais. A cada 60 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos (NB), número total de brotos nos subcultivos (T_{NBS}), número de brotos total ao final de cada subcultivo (T_{NB}), potencial propagativo, número de folhas (NF), porcentagem de plantas hiperídricas (%H) e comprimento da parte área em cm (CPA). O potencial propagativo foi calculado, usando a taxa de crescimento (r) entre dois subcultivos subsequentes, dada pela expressão:

$$r = \left(\sqrt[t]{(Vf/Vi)} - 1 \right) \times 100$$

onde, Vf - número de brotos no subcultivo subsequente; Vi - número de brotos no subcultivo anterior; t - intervalo entre os subcultivos.

2.2.3 Enraizamento in vitro e aclimatização de Agave híbrido 11648

Brotações de híbrido 11648 obtidas no quarto subcultivo, com aproximadamente 10 e 30 mm de altura, foram inoculadas em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS½, suplementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 µM), acrescido com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 5 (altura inicial x concentrações de AIB) totalizando 10 tratamentos, com oito repetições, cada uma constituída por uma unidade experimental. Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos (NB), comprimento da parte área em cm (CPA), número de folhas (NF), número de raízes (NR) e matéria fresca e seca da parte área e da raiz (MFPA, MSPA, MFR e MSR).

Após 45 dias, as plantas enraizadas in vitro, com 110 mm de altura, foram aclimatizadas, transferindo-se 20 plantas para tubetes (63 mm x 190 mm), contendo substrato: solo (latossolo distrófico) + composto orgânico (latossolo amarelo, resíduos de podas de árvores, esterco caprino e bovino), na proporção 1:1 e mantidos em casa de vegetação com 70% de sombreamento. Após 90 dias de aclimatizadas foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

2.3 Condições experimentais

O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N, antes da autoclavagem à temperatura de 121° C e pressão de 1 atm por 20 minutos. As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica, utilizando frascos borel (252 mm x 329 mm) com tampas de plástico e filme plástico de

policloreto de vinila (PVC). As condições experimentais da sala de crescimento para cultivo in vitro de híbrido 11648 foram temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Tukey e análise de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. Para obtenção de distribuição normal, quando necessário, os dados foram transformados utilizando a análise box-cox, a 5% de significância. Para as variáveis em que os dados não seguiram uma distribuição normal, optou-se apenas por descrever. O software RStudio (RStudio Team 2020) foi usado para realizar as análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Multiplicação in vitro de *Agave sisalana*

3.1 Estabelecimento in vitro de segmentos de pseudocaule de agave híbrido 11648 utilizando a técnica TCL com concentrações de BAP

Houve efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da concentração de BAP para a variável T_{nb} e significativa ($p \leq 0,05$) para as variáveis % OX, CPA, NF, MFPA e MSPA. A interação da posição de tTCLs x concentração de BAP foi significativa ($p \leq 0,05$) para o NB. Os fatores analisados não foram significativos para porcentagem para as variáveis % C e % H.

O processo de desinfestação e o uso de explante tTCLs mostraram ser eficientes no estabelecimento in vitro de agave híbrido 11648, pois não foi verificada contaminação nos explantes e estes induziram alta taxa de multiplicação. Todavia, notou-se oxidação nos explantes, ocorrendo a maior porcentagem (50%) no controle (Figura 4). Os explantes oxidados apresentaram-se pouco responsivos e, a depender do grau de oxidação, quando muito severo não responderam, exibindo coloração escura. O processo ocorrido pode ser devido à desinfestação, com o uso de produtos químicos ou a

manipulação durante corte do explante (Loyola-Vargas e Vazquez-Flota, 2006), resultando na liberação de compostos fenólicos inibindo o crescimento do explante (Cid e Teixeira, 2014).

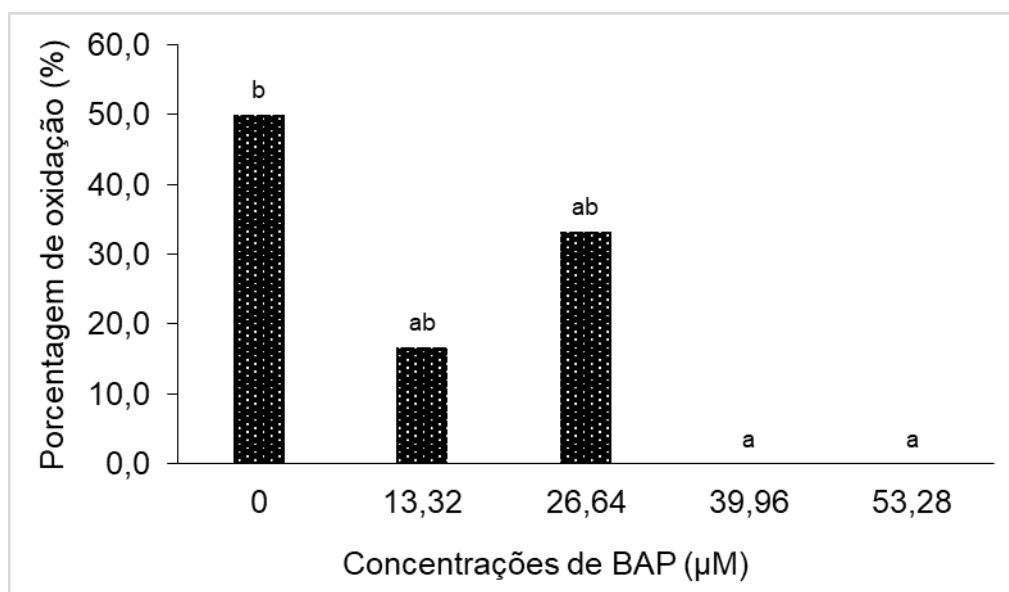


Figura 4. Porcentagem de oxidação em explantes de tTCLs provenientes de plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$ em função das concentrações de BAP. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O sucesso da técnica de micropropagação tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos e maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes (Fermino Junior et al. 2009). Nessa perspectiva os resultados foram promissores para o estabelecimento do Agave híbrido 11648, conforme observado em *A. tequilana* Weber (Portillo et al. 2007). Estes autores usaram como fonte de explantes sementes e rizomas, os quais foram estabelecidos somente usando álcool etílico 96% e hipoclorito de sódio a 3%.

A indução de brotos nos explantes tTCLs iniciou-se no décimo quinto dia, no qual o explante apresentou um aumento de área e coloração verde clara. O maior número de brotos (45,17 brotos por planta) foi verificado na concentração de 13,32 μM de BAP, exibindo diferença entre as médias somente em relação ao controle (Figura 5).

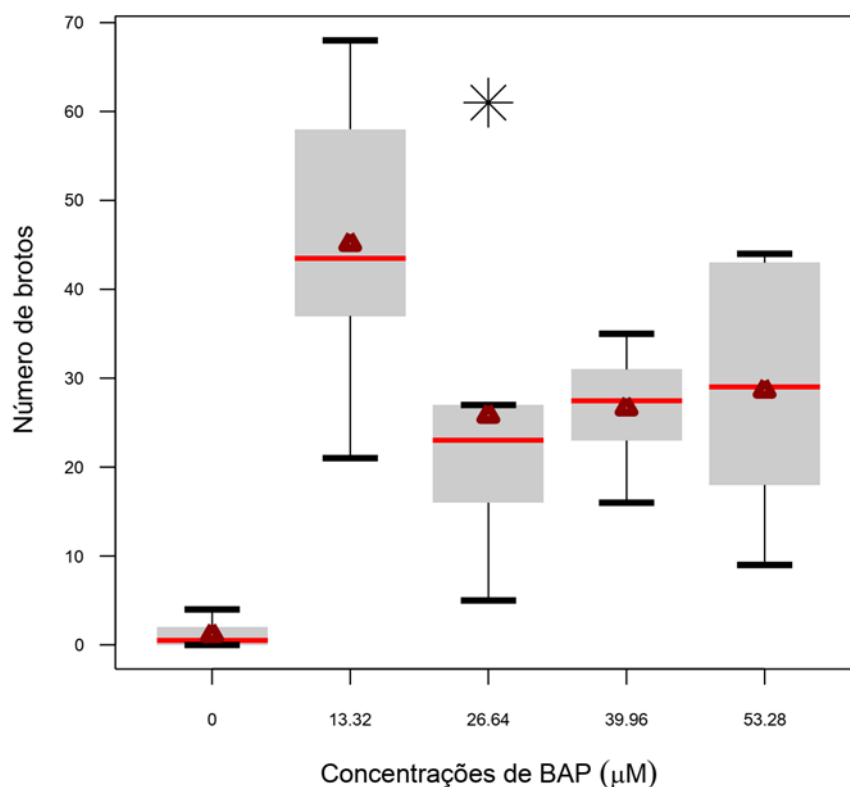


Figura 5. Número total de brotos em explante tTCL provenientes de pseudocaule de plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP.

O resultado obtido é promissor, pois em espécies do gênero *Agave*, como fonte de explante base $\frac{1}{2}$ e base, a literatura relata taxas inferiores de multiplicação. Em *A. sisalana*, Rios (2007) utilizou explante base $\frac{1}{2}$, e obteve 10,78 brotos por explante na concentração de 44,4 µM de BAP. Na espécie *A. americana*, com explante base, foi relatada a indução de 18,5 brotos por explante na concentração 13,32 µM de BAP (Chen et al. 2014). Estes autores concluíram que os explantes tTCLs são eficientes para indução de organogênese direta. Em *Brasilidium forbesii*, Gomes et al. (2015) observaram que os explantes ITCLs foram mais eficientes em regenerar protocormos (24,6 protocormos por explante) do que tTCLs em explante com 1 mm de espessura (21,3 protocormos por explante). Wattanapan e Meesawat (2018) também obtiveram alta taxa de multiplicação (46,67 brotos) em *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve* ao utilizar como fonte de explante tTCL com espessura de 0,5-0,6 mm.

A indução de brotos ocorreu em todas as posições de explantes tTCLs, verificando-se redução no número de brotos com o aumento das concentrações,

exceto para os explantes tTCLs MI, que exibiram melhor responsividade para MI₁ e menor em explantes tTCLs BA. Na concentração de 13,32 µM de BAP, os explantes tTCLs MI₁ induziram o maior número de brotos (19,17 brotos por explante), mas não diferindo estatisticamente dos explantes tTCLs AP e MI₂. Na concentração de 26,64 µM de BAP, os explantes tTCLs não exibiram diferença entre as médias, com maior indução em MI₁ (10,83 brotos por explante), similar ao observado na concentração de 39,96 µM de BAP. Os explantes tTCLs MI₁ induziram maior proliferação de brotos (12 brotos por explante), mas não apresentaram diferença estatística entre os explantes tTCLs MI₂ e BA. Porém, na concentração mais elevada de BAP, somente MI₁ obteve melhor resposta (19,33 brotos por explante) (Tabela 4). A Figuras 5A e 5B ilustra os brotos advindos de explantes tTCLs.

Foi observado nos tTCLs a formação de células na superfície do tecido, com coloração amarelo-esverdeado, que após transferidas para novo meio de multiplicação emitiram brotações (Figura 5C).

Tabela 4. Número de brotos em função da posição de tTCLs de plantas de híbrido 11648: região apical (AP), região mediana (MI₁ e MI₂) e região basal (AB) submetidas a diferentes concentrações de BAP.

BAP (µM)	Número de brotos			
	AP	MI ₁	MI ₂	BA
0,0	0,50 aA	0,0 aB	0,67 aAB	0,0 aA
13,32	9,83 abA	19,17 aA	12,67 abA	3,50 bA
26,64	4,67 aA	10,83 aA	6,33 aAB	4,0 aA
39,96	1,17 bA	12,0 aA	7,67 abAB	5,83 abA
53,28	5,67 bA	19,33 aA	3,5 bB	0,17 bA
CV (%)	100,21			

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A resposta de explantes de tTCLs foi influenciada pelos níveis de regulador vegetal, com redução na indução de brotos proporcional ao aumento deste, e a melhor resposta foi com os explantes posicionados próximos das regiões do meristema apical.

As citocininas promovem o aumento do número de brotos através da quebra da dominância apical e da proliferação de zonas meristemáticas (Kyojuka, 2007), pois estão envolvidas no processo de divisão celular das plantas, participam da síntese de DNA e controlam o ciclo celular (Gaspar et al., 2003). Entretanto, a indução ou a inibição dos processos morfogênicos *in vitro*, também dependem da capacidade das células em reagir a sinais específicos (George, 2008).

Conforme Monja-Mio e Robert (2013), a análise histológica em segmentos de tTCLs em *Agave fourcroydes* mostrou que as camadas apicais (AP e MI) contém mais tecido meristemático do que as camadas basais, que são derivados do meristema primário procâmbio e protoderme, comportamento semelhante ao observado neste estudo, como o *Agave* híbrido 11648, que apresentou maior indução de brotos de explantes tTCLs AP, MI₁ e MI₂.

Para número de folhas, a concentração de 39,96 µM de BAP promoveu melhor resposta (2,99 folhas por explante), entretanto, diferiu estatisticamente somente do controle (1,17 folhas por explante) (Figura 6). As folhas emitidas apresentaram boa qualidade, coloração verde clara e sem anomalias ou presença de hiperidricidade.

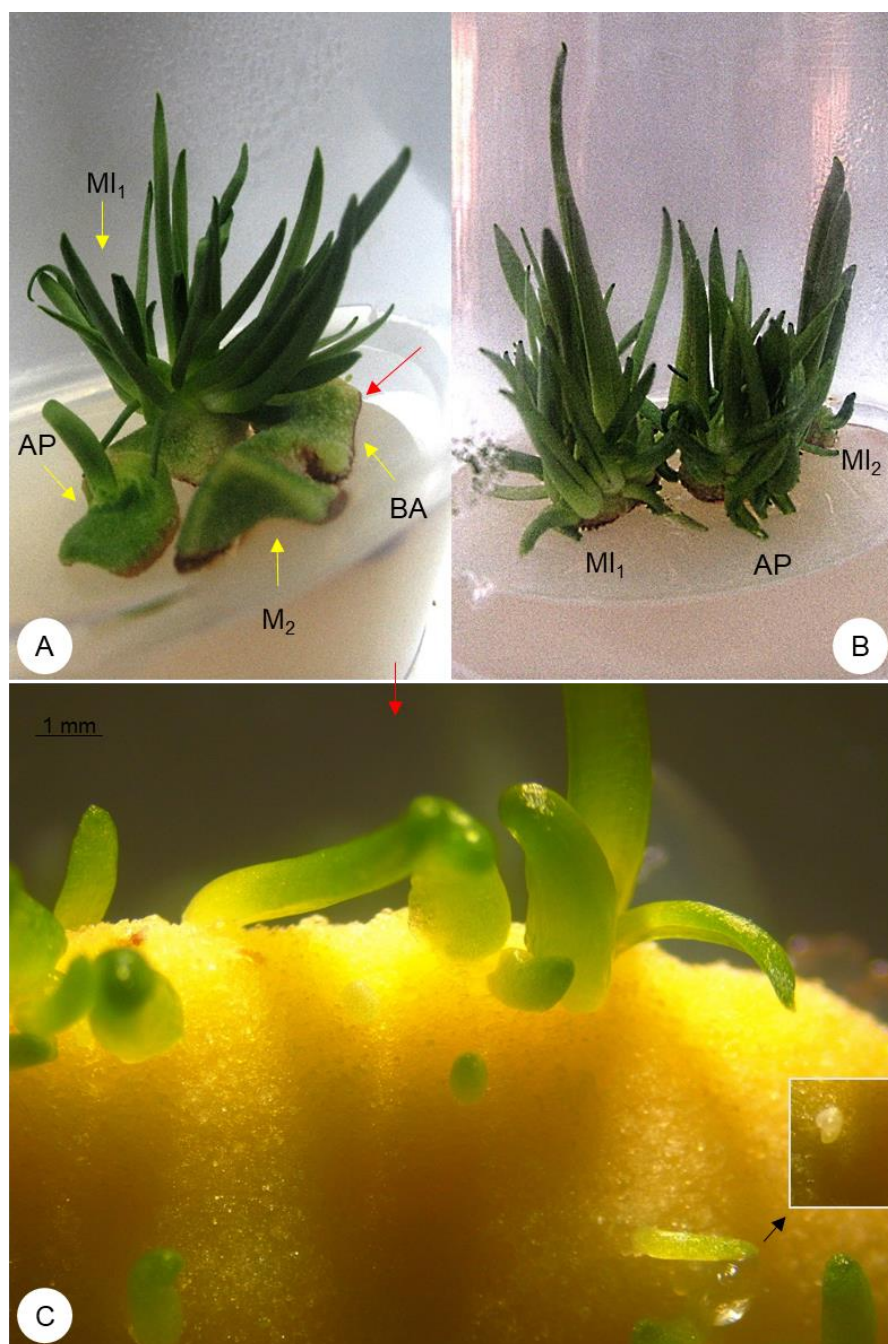


Figura 5. Multiplicação in vitro de híbrido 11648 utilizando segmentos de pseudocaulis (tTCLs) submetidos a diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$. A e B – Explantes na concentração de 13,28 μ M de BAP e setas amarelas indicando tTCLs apical (AP), tTCLs mediana (MI $_1$ e MI $_2$), tTCLs basal (B); C– Formação de células na superfície do tecido (seta vermelha) e indução de brotos.

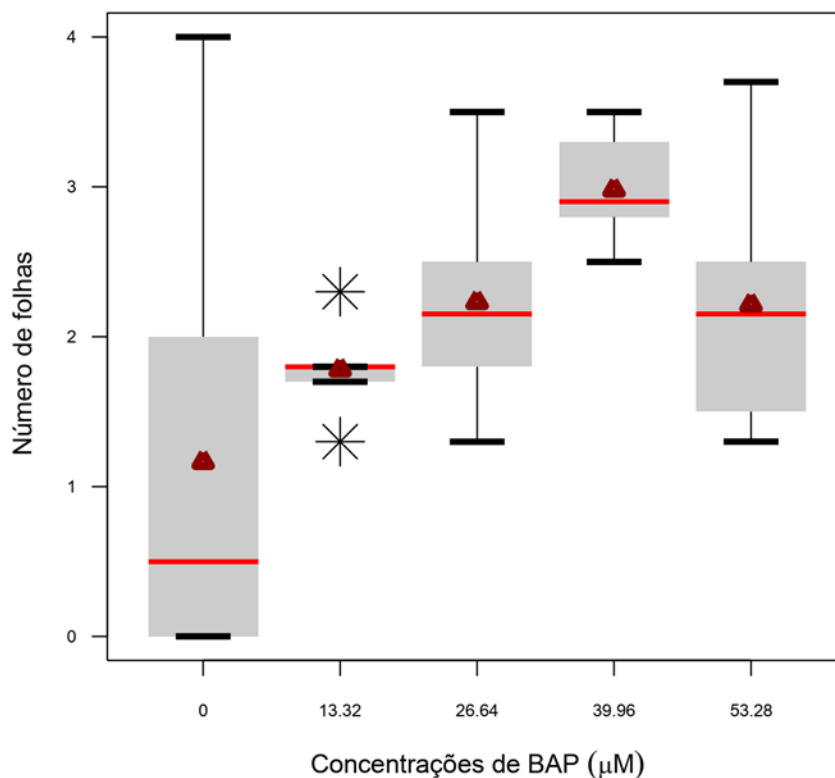


Figura 6. Número de folhas de plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP.

Comportamento similar ao número de folhas foi observado para comprimento da parte aérea, na concentração de 39,96 µM de BAP que promoveu o maior (28,55 mm) comprimento das brotações, diferindo estatisticamente somente do controle (7,83 mm) (Figura 7). Em *A. americana*, a concentração de 13,32 µM de BAP proporcionou maior emissão de folhas e comprimento da parte aérea (Chen et al. 2014).

Esse efeito para número de folhas e comprimento da parte aérea, demonstrou que o regulador vegetal BAP, nas concentrações avaliadas, não expressou ação inibitória no desenvolvimento das plantas de híbrido 11648. As citocininas estimulam a formação e o crescimento da parte aérea até uma determinada concentração, que variam de acordo com as exigências de cada espécie. Conforme, Taiz e Zeiger (2004) estas induzem a divisão celular e proliferação de brotos, mas dependendo da sua concentração, pode inibir o efeito da auxina que induz o alongamento das células vegetais.

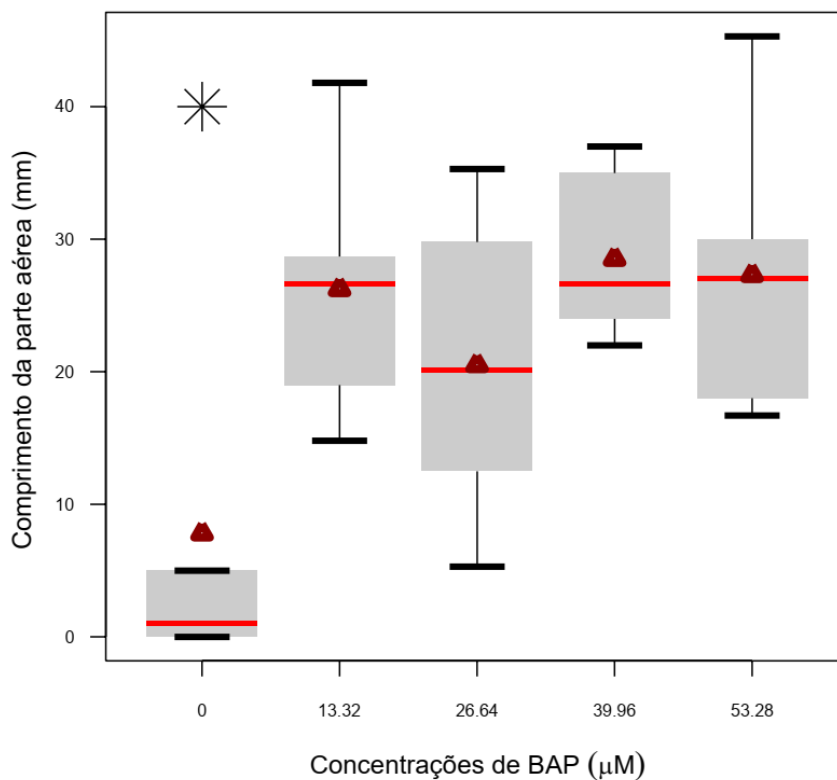


Figura 7. Comprimento da parte aérea de plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP.

O acúmulo de matéria fresca foi semelhante entre os tratamentos, não apresentando diferença entre as médias (2,22 mg), exceto, para a concentração de 26,64 μM de BAP, que proporcionou o menor acúmulo de biomassa fresca (0,99 mg) nas plantas (Figura 8).

Em contrapartida, o acúmulo de massa seca teve comportamento distinto, apresentando valor superior (1,3 mg) na concentração de 13,32 μM de BAP, que diferiu estatisticamente somente da concentração de 53,28 μM de BAP, que proporcionou o menor acúmulo de matéria seca (0,65 mg) (Figura 9).

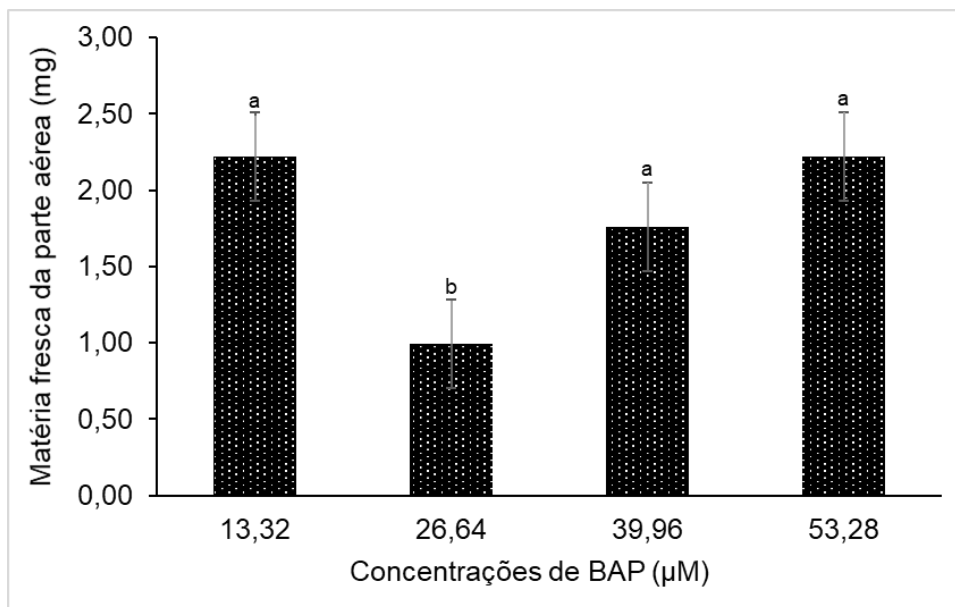


Figura 8. Matéria fresca da parte aérea de plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

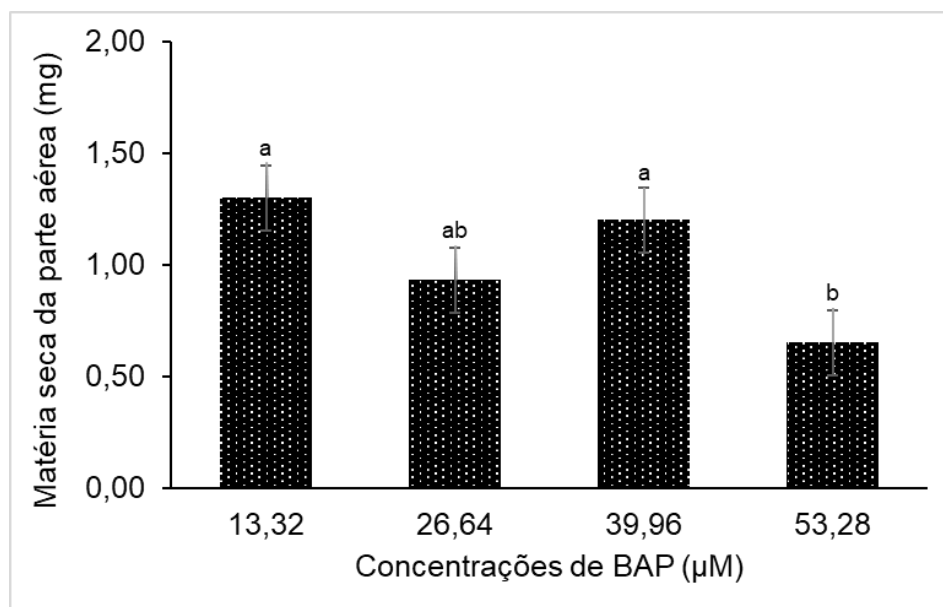


Figura 9. Matéria seca da parte aérea de plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

É possível inferir, com base nas variáveis analisadas, que as plantas podem ser estabelecidas *in vitro*, somente com uso de hipoclorito de sódio a 2,5% e direto em meio de cultura de multiplicação, otimizando o tempo e reduzindo os custos para obtenção de mudas. A concentração de 13,32 μM de BAP promoveu excelentes respostas para indução de brotos, com os explantes tTCLs AP, MI₁ e MI₂.

4. Multiplicação *in vitro* com subcultivos de Agave híbrido 11648

Os fatores isolados concentrações de BAP e o subcultivo foi significativa ($p \leq 0,01$) para a variável NB. Para a variável NF, a interação entre os fatores concentração de BAP x subcultivo mostrou efeito significativo ($p \leq 0,05$). Para a variável % H, os dados não seguiram distribuição normal. O fator isolado subcultivo foi significativo ($p \leq 0,01$) para variável CPA.

A emissão de brotos durante o período de subcultivo foi influenciada pelas concentrações de BAP e número de subcultivos. O maior número de brotos (10,04 brotos por explante) foi observado nas concentrações de 13,32 μM e 26,64 μM de BAP (9,25 brotos/explante) (Figura 10).

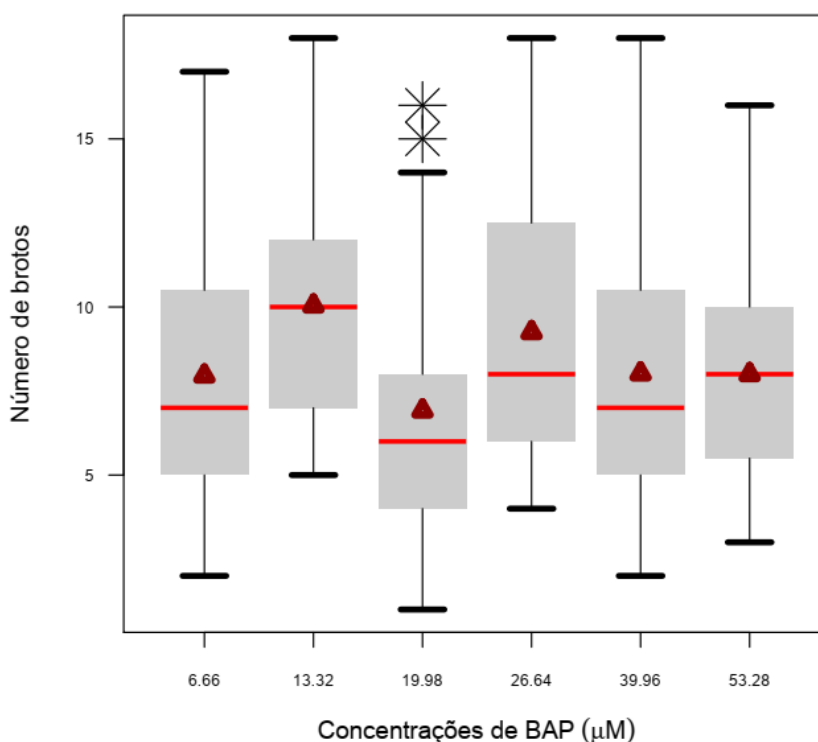


Figura 10. Número de brotos em plantas de híbrido 11648 cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP.

O aumento no número de brotos foi proporcional ao aumento do número de subcultivos. Na primeira transferência, a média foi de 5,01 brotos por explante e na quarta transferência, média de 12,13 brotos por explante (Figura 11), verificando crescimento correspondente a 142,12%.

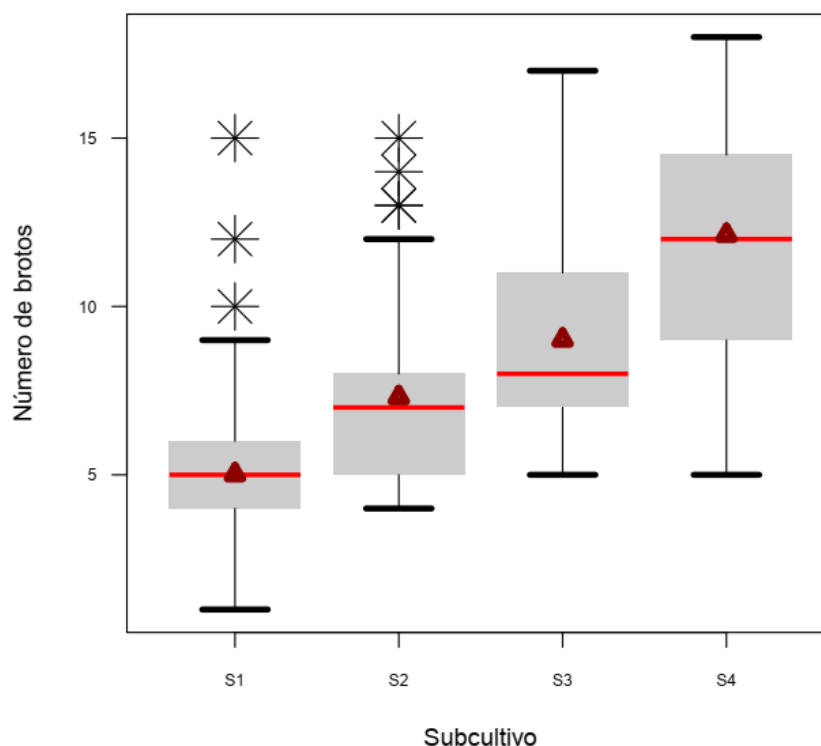


Figura 11. Número de brotos em plantas de híbrido 11648 cultivadas em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP. S1 – primeiro subcultivo; S2 – segundo subcultivo; S3 – terceiro subcultivo; e S4 – quarto subcultivo.

Esse resultado evidenciou que, as transferências para meio de cultura de multiplicação promoveram efeito positivo, estimulando a proliferação de brotos, possivelmente porque as citocininas atuam na indução da divisão celular e organogênese (Howell et al., 2003). Entretanto, estudos demonstram que a indução de brotos também depende da capacidade do tecido em responder aos estímulos externos em sinergismo com conteúdo endógenos de regulador vegetal, podendo ocorrer a indução ou inibição do processo, como verificado em *Tecomella undulata* (Varshney e Anis, 2011), *Agave angustifolia* (Duarte-Aké et al., 2016) e *Alcantarea nahoumii* (Silva et al., 2020).

A Tabela 5 mostra os valores referentes ao somatório de número de brotos em cada subcultivo (NB_S) número de brotos totais (T_{NB}) e crescimento

geométrico após quatro transferências para meio de multiplicação. A concentração de 13,32 μM de BAP produziu o maior número de brotos em cada subcultivo, seguida da concentração de 26,64 μM de BAP. Ao final de quatro transferências, o número de brotos totais correspondeu a 482,0 e 472,0 brotos, nas concentrações de 13,32 μM e 26,64 μM de BAP, respectivamente, um crescimento de 3.916,67 %, em relação ao número de brotos iniciais (12,0 brotos). Embora os resultados para obtenção de brotos ao longo dos quatro subcultivos seja satisfatória, ao analisar o potencial propagativo, percebe-se baixa taxa de crescimento (Tabela 5). Isso ocorre porque a taxa de multiplicação entre os subcultivos mostrou pouca variação. A Figura 12 mostra brotações advindas do subcultivo via organogênese direta.

Durante o período de subcultivo foi observado a formação de estruturas que indicam a ocorrência de indução de brotos via organogênese indireta (Figura 13) a partir do terceiro subcultivo. Essa resposta, não é desejável para protocolos de micropropagação, pois podem ser fontes de variação somaclonal.

Foi observado a formação de pequenas células na base do explante, formando estruturas semelhantes a cultura nodulares de coloração branca esverdeada (Figura 13A), e essas massas diferenciaram em brotos adventícios (Figura 13B). Também houve a indução de células com aspecto friáveis de coloração branca e esverdeada, as quais induziram estruturas semelhantes a embriões somáticos em estágio globular (Figura 13C). Estudos em espécies do gênero *Agave* relatam a obtenção de estruturas análogas às observadas neste trabalho, com *A.sisalana* (Das, 1992), *A.tequilana* (Portillo et al., 2007), híbrido 11648 (Zhang et al., 2013), *A.sisalana* (Carneiro et al., 2014), *A.angustifolia* (Reyes-Díaz et al., 2017) e *A.americana* (Lecona-Guzmán e Reyes-Zambrano, 2017). Ressalta-se a importância de análise histológica para confirmação da via de formação dessas estruturas obtidas em explantes do híbrido 11648.

Tabela 5. Número de brotos iniciais (NB_i), número total de brotos nos subcultivos (T_{NBS}), número de brotos total ao final de cada subcultivo (T_{NB}) e crescimento geométrico de plantas de H.11648 em meio $MS\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP e subcultivos.

	Número de brotos (T_{NBS})						Crescimento geométrico		
	NB_i	S_1	S_2	S_3	S_4	T_{NB}	$S_1 - S_2$	$S_3 - S_2$	$S_4 - S_3$
BAP (μM)									
6,66	12	53,0	89,0	101,0	139,0	382,0	0,86	0,24	0,63
13,32	12	90,0	109,0	134,0	149,0	482,0	0,31	0,36	0,18
19,98	12	42,0	69,0	88,0	133,0	332,0	0,29	0,42	0,64
26,64	12	77,0	119,0	119,0	157,0	472,0	0,29	0,45	0,50
39,96	12	44,0	103,0	103,0	161,0	411,0	1,00	0,47	0,76
53,28	12	55,0	91,0	104,0	134,0	384,0	0,85	0,24	0,40

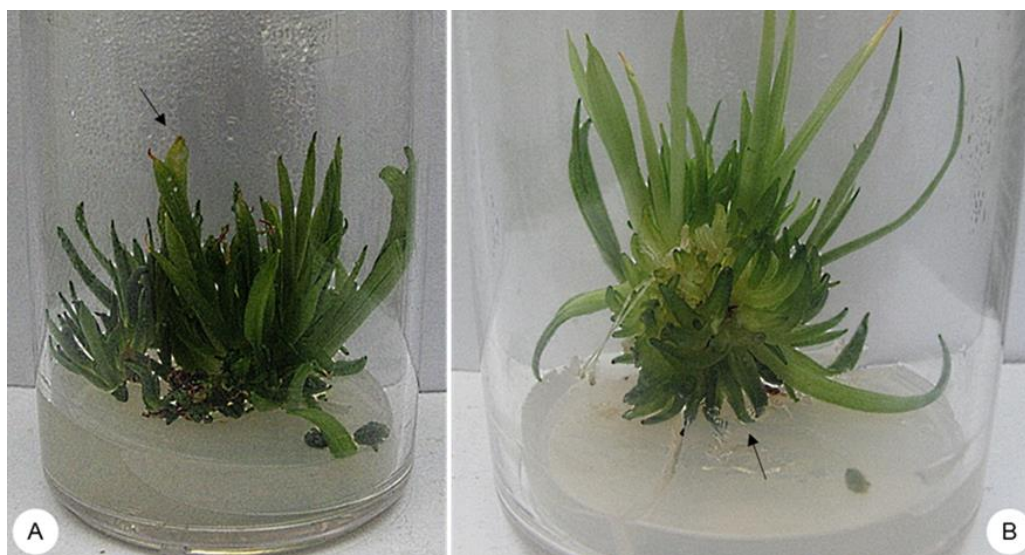


Figura 12. Brotações de híbrido 11648 em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ submetidos a diferentes concentrações de BAP após quatro subcultivos. A- Brotações com folhas com início de senescência (seta preta). B - Brotações hiperídricas (seta preta).

Foi verificado também a formação de brotos adventícios originados da base das folhas (Figura 13E), evidenciando que nesse tipo de explante, quando fornecido o estímulo correto, as células competentes podem induzir brotos. Esses dados estão de acordo com os verificados por Chen et al. (2014) que induziram brotos a partir de folhas de *A. americana*, utilizando BAP e ANA. Contudo, também foi relatada a indução de calos, com posterior regeneração de brotos, a partir de folhas imaturas do híbrido 11648 em meio de cultura com BAP combinado com ANA e 2,4-D (Zhang et al., 2013), e em *A. sisalana* na presença de BAP (Hazra et al., 2002). Essas observações permitem inferir que as citocininas em explantes de híbrido 11648 modulam o processo de obtenção de brotos independentes da via de organogênese em sinergismo com outros reguladores vegetais endógenos.

Conforme Sriskandarajah et al. (2006), durante o subcultivo os níveis de hormônios endógenos (equilíbrio de auxinas e citocininas) podem mudar e afetam o potencial de organogênese ou a via de organogênese, dependendo da

espécie. A homeostase hormonal depende da atividade enzimática (como a citocinina oxidase/desidrogenase), que também é específico para cada espécie.

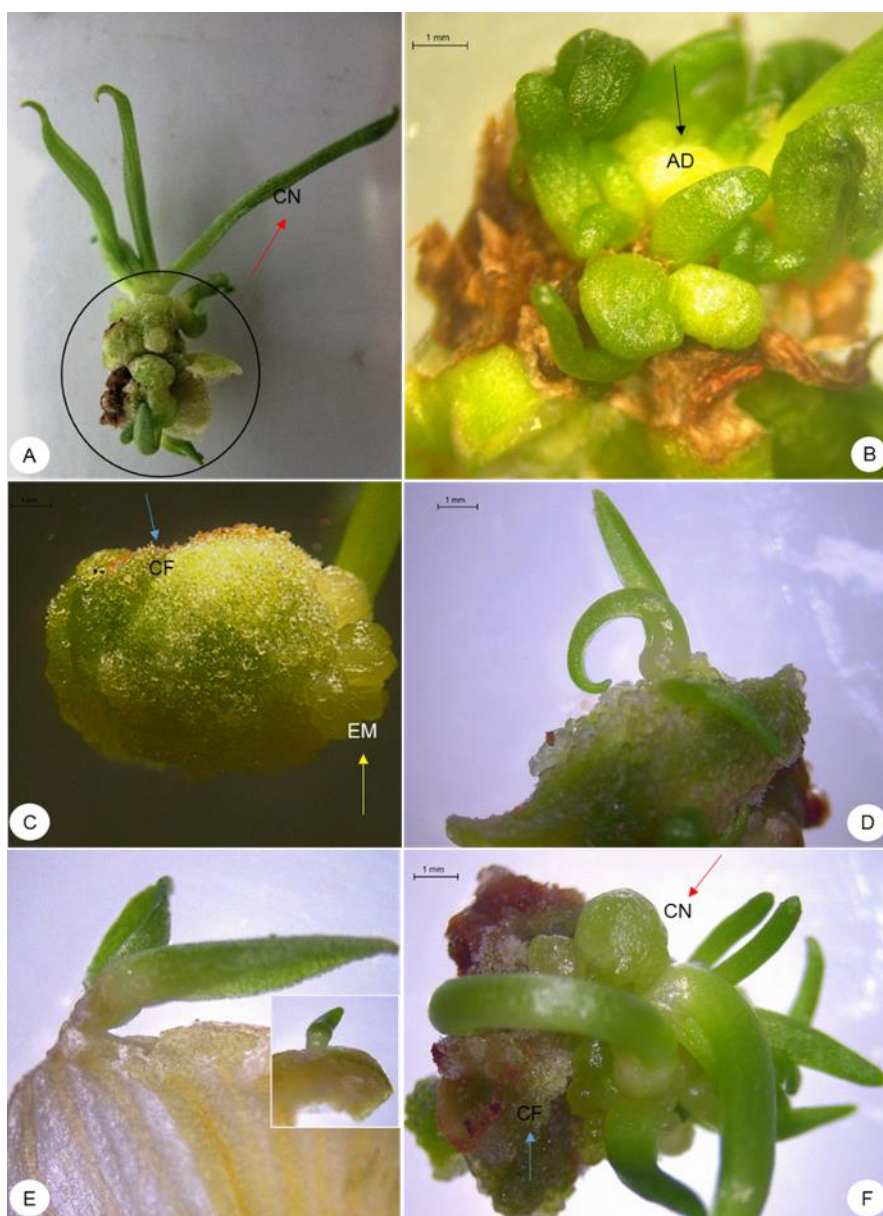


Figura 13. Início de formação de culturas nodulares na base de brotações (CN) (A). Explante com formação de brotações adventícias via organogênese indireta (AD) e cultura nodulares (CN) (B). Explante com estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos (EM) e calos friáveis (CF) (C). Brotações adventícias originadas dos calos friáveis (D). Formação de broto adventício advindo de base foliar (E). Explante com calos friáveis, cultura nodulares e brotos adventícios (F) em explantes de agave híbrido 11648 cultivado em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$, com diferentes concentrações de BAP.

Para número de folhas, nos subcultivos em cada nível de BAP, houve diferença estatística somente na concentração de 39,96 μM de BAP, com maior emissão de folhas (3,25 folhas por explante) na terceira transferência e 53,28 μM de BAP (3,83 folhas por explante), no quarto subcultivo (Figura 14). As folhas do agave híbrido 11648 não apresentaram deformações durante o período avaliado de subcultivo, exibindo coloração verde clara e algumas plantas com indício de senescência, que pode estar associado a alta concentração de regulador vegetal e ao estresse oxidativo provocado pelo ambiente de cultivo in vitro.

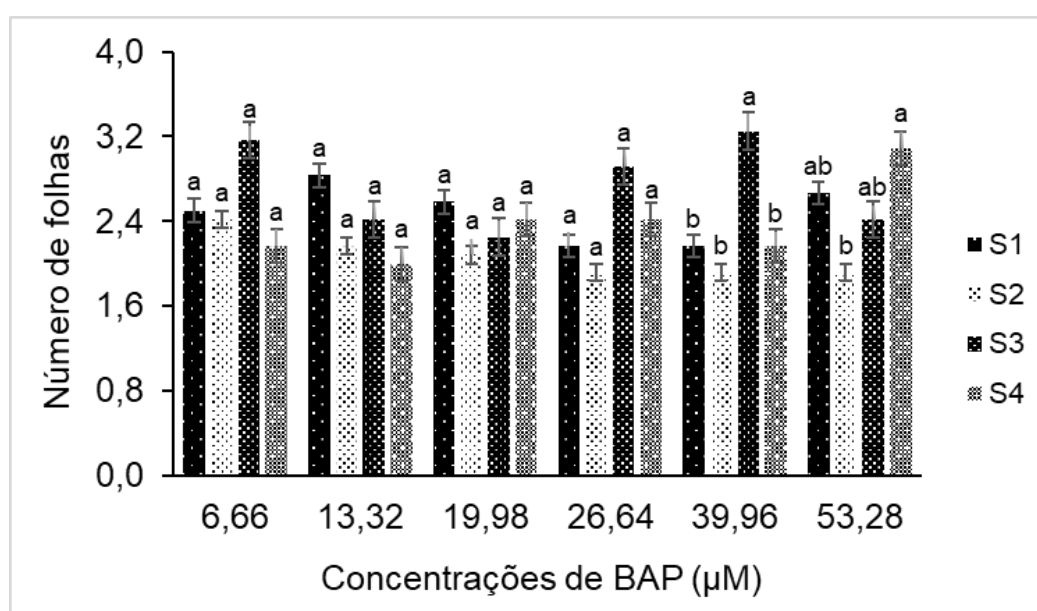


Figura 14. Número de folhas de plantas de híbrido 11648 em função dos subcultivos em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$ acrescido de regulador vegetal BAP. *Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. S1 – primeiro subcultivo; S2 – segundo subcultivo; S3 – terceiro subcultivo; e S4 – quarto subcultivo.

Embora, na fase inicial de multiplicação in vitro não tenha ocorrido hiperidricidade, os subcultivos promoveram o surgimento da hiperidricidade, com maior porcentagem (37,50%) na segunda transferência. A formação de plantas hiperídricas no gênero *Agave* foram descritos em *A. sisalana* (Nikam et al., 2019) e *Agave fourcroydes* (Caraballo et al., 2010).

As sucessivas transferências para meio de multiplicação causaram a redução no comprimento da parte aérea. A maior média (32,1 mm) foi observada no primeiro subcultivo. A partir do segundo subcultivo, não houve diferença entre as médias, com comprimento de 20,91 mm das brotações no quarto subcultivo (Figura 15), permitindo inferir que elevadas concentrações de citocinina reduziram de maneira significativa o tamanho das brotações no cultivo in vitro, indicando possível efeito fitotóxico do regulador vegetal BAP.

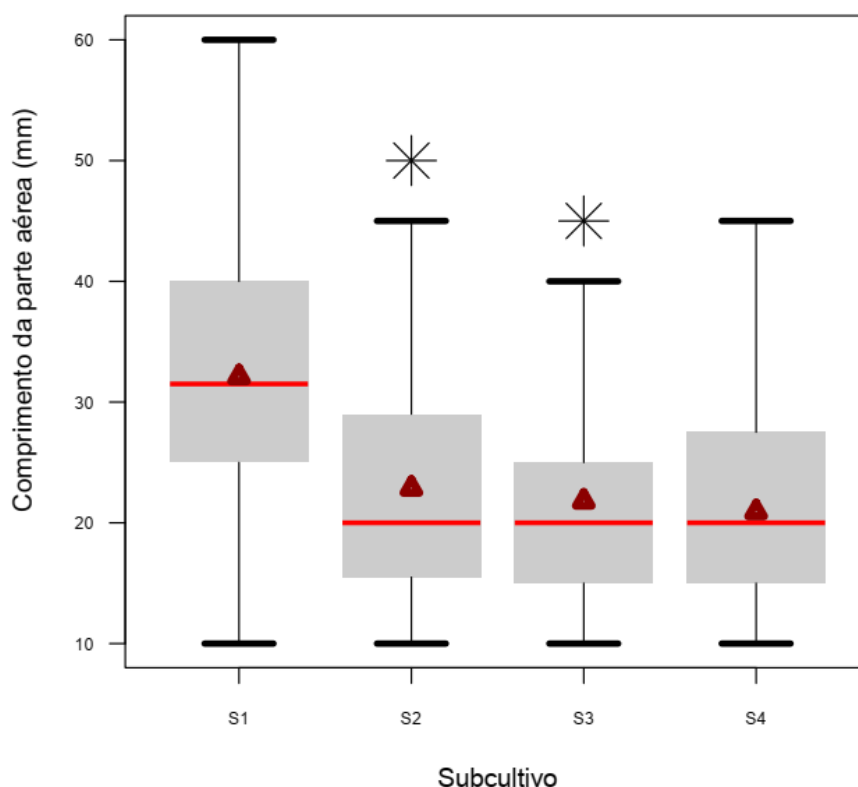


Figura 15. Comprimento da parte aérea de plantas de híbrido 11648 submetidos a quatro subcultivos em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ acrescido de regulador vegetal BAP. S1 – primeiro subcultivo; S2 – segundo subcultivo; S3 – terceiro subcultivo; e S4 – quarto subcultivo.

Conclui-se que a concentração de 13,32 μ M de BAP foi eficiente para promover a indução de brotos no agave híbrido 11648, até quatro transferências para meio de multiplicação. Os sucessivos subcultivos implicam na formação de estruturas similares a culturas nodulares com indução de brotos adventícios e calos friáveis. Recomenda-se a análise de fidelidade genética dos brotos advindos dos subcultivos.

Enraizamento in vitro e aclimatização de plantas de agave híbrido 11648

A concentração de AIB mostrou efeito significativo ($p \leq 0,05$) para NF. Para NR, a interação concentração de AIB x altura inicial das brotações foi significativa ($p \leq 0,05$). A altura inicial das brotações teve efeito significativo ($p \leq 0,01$) para CR e ($p \leq 0,05$) para as variáveis MFPA, MFR e MSR e as concentrações de AIB foi significativa ($p \leq 0,01$) apenas para MSR. Para NB, CPA, MSPA os fatores analisados não foram significativos.

Após quatro subcultivos, os brotos foram transferidos para meio enriquecido com auxina, para induzir a rizogênese. A auxina otimizou o enraizamento da cultura, porém altas concentrações indicaram decréscimo para as variáveis de crescimento e o fator tamanho inicial das brotações influenciou de forma positiva o processo de rizogênese.

A indução de brotações laterais não foi observada com a adição da auxina AIB no meio de cultura ou na ausência desta. As auxinas atuam na manutenção da dominância apical inibindo a formação de brotos laterais. Os resultados indicam que supostamente ocorreu equilíbrio entre os níveis endógenos citocinina/auxina não favorável a indução de novas brotações.

O comprimento da parte aérea não diferiu com as concentrações de AIB, em relação ao controle. A altura inicial das brotações também não influenciou no crescimento das plantas, obtendo-se a média de 119,4 mm de altura, denotando que o acúmulo de citocinina devido às transferências para o meio de multiplicação com BAP não inibiu o crescimento, ao ser transferido para meio isento ou com auxina. As citocininas podem inibir o efeito da auxina que induz o alongamento das células vegetais (Taiz e Zeiger, 2004). Entretanto, para o agave híbrido 11648, o balanço entre as concentrações endógenas de reguladores vegetais auxina/citocinina foi suficiente para estimular o crescimento da planta.

A emissão de folhas reduziu com o aumento das concentrações de AIB, representado pelo modelo quadrático descendente, obtendo o número máximo de folhas (5,44 folhas por explante) na concentração de 6,96 μM de AIB, ou seja, altas concentrações de auxina promoveram a inibição de emissão de folhas em brotações de híbrido 11648 (Figura 16).

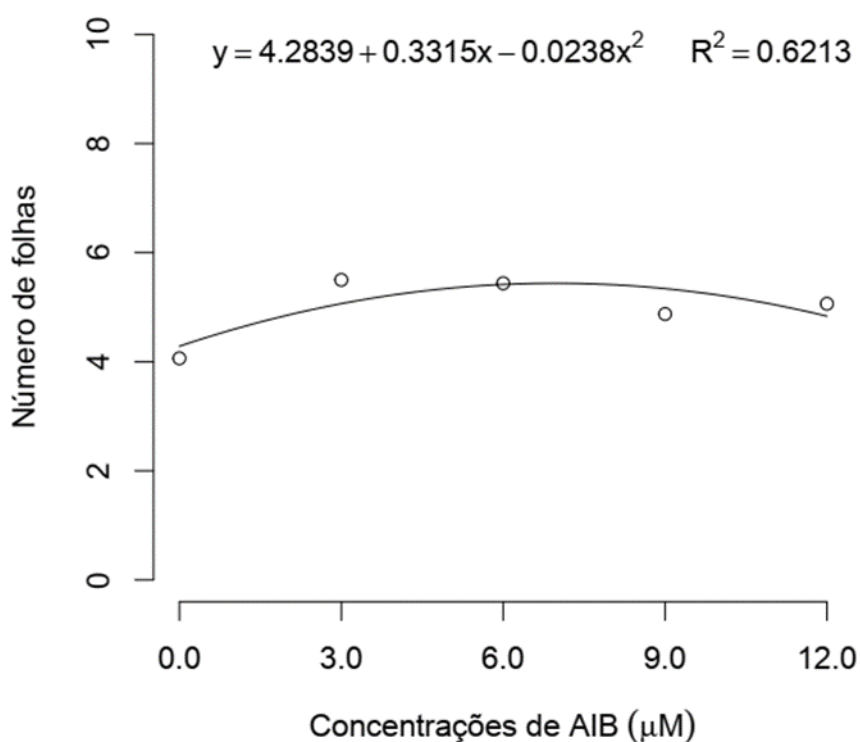


Figura 16. Número de folhas de plantas de híbrido 11648 cultivadas em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de AIB.

As folhas possuíam aspecto vigoroso com tonalidade verde e sem expressão de senescência foliar ou anomalias. O número e o vigor das folhas são fatores importantes para posterior fase de aclimatização, pois garantem uma melhor adaptação após transplante para condições *ex vitro* e sobrevivência das plantas.

A taxa de enraizamento não variou para os fatores analisados, obtendo 100% de indução de raízes. Zhang et al. (2013) obtiveram em brotos do agave híbrido 11648, regenerados via organogênese indireta, com 98,33% de enraizamento, em meio desprovido de regulador vegetal. O número de raízes variou em relação à altura inicial das brotações, interagindo com as concentrações de AIB. Ao utilizar brotos com tamanhos iniciais de 10 mm de altura não houve diferença entre as médias. Em contrapartida, ao inocular brotos com 30 mm de altura, obteve-se o aumento no número de raízes, proporcional ao aumento das concentrações de AIB, conforme modelo linear (Figura 17).

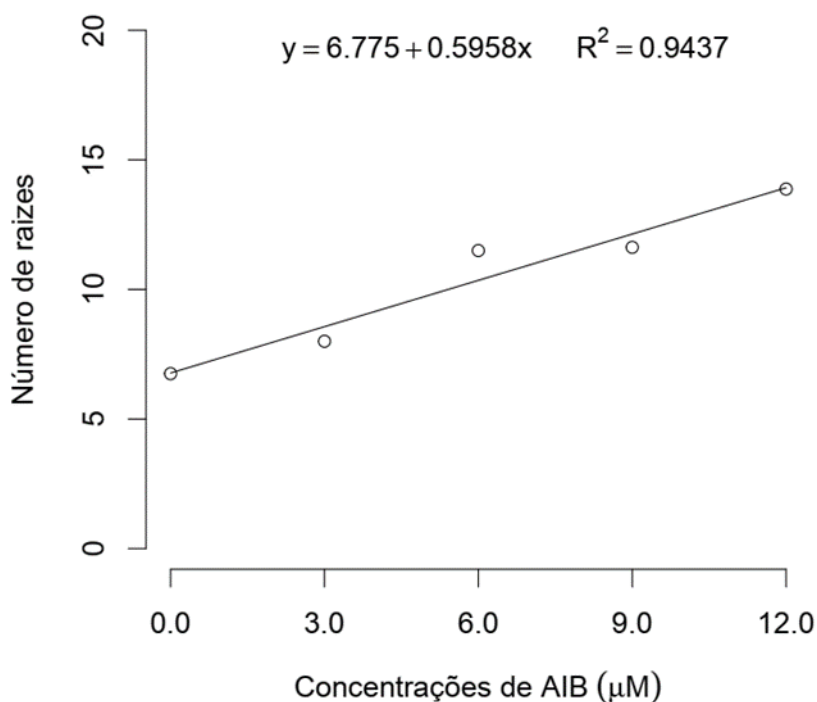


Figura 17. Número de raízes em plantas de híbrido 11648 com altura inicial de 30 mm de altura cultivadas em meio de cultura MS½ com diferentes concentrações de AIB.

A partir da concentração 6,0 µM de AIB, os explantes com tamanho inicial de 30 mm de altura apresentaram maior indução de raízes, observando na concentração de 12,0 µM de AIB a formação de 13,88 raízes por explante, e nos explantes com altura inicial de 10 mm a menor média (8,62 raízes por explante) (Figura 18). Em brotos regenerados do agave híbrido 11648, via organogênese indireta, a melhor resposta para número de raízes (8,91 raízes por explante) foi obtida na maior concentração de AIB (24,6 µM), utilizando explantes com altura de 5 a 8 cm (Zhang et al., 2013).

O comprimento da raiz reduziu linearmente com o aumento das concentrações de AIB (Figura 19). Isso indica que altas concentrações de AIB promovem o aumento na emissão de raízes, mas inibem o crescimento desta. Zhang et al., (2013) observaram no enraizamento de brotos desse híbrido 11648, o maior comprimento da raiz (8,44 cm) em meio isento de regulador vegetal. Em, *A. americana*, o aumento da concentração de AIB promoveu o maior comprimento e número de raízes (Chen et al., 2014).

A matéria fresca da parte aérea não foi influenciada pelas concentrações de AIB, mas sim, de maneira positiva pelo tamanho inicial das brotações, observando maior acúmulo de matéria fresca (1,31 g) em explantes com 30 mm de altura em comparação aos explantes com 10 mm de altura (0,981g) (Figura 20). Entretanto, o acúmulo de biomassa seca da parte aérea não diferenciou entre as concentrações e altura iniciais das brotações, confirmando os dados obtidos para comprimento da parte aérea. Em *A. fourcroydes*, o aumento de AIB reduziu a massa fresca dos brotos (Caraballo et al., 2010), enquanto que em *A. angustifolia*, a maior massa fresca (6,4 g) e seca (0,37 g) foram obtidas nas plantas cultivadas com 4,92 μM de AIB (Ríos-Ramírez et al., 2017).

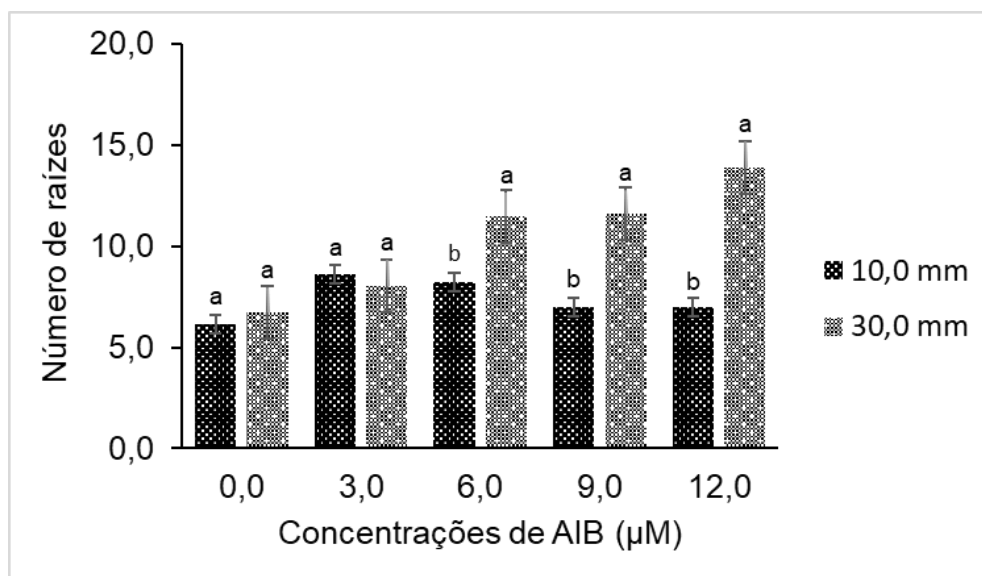


Figura 18. Número de raízes de plantas de híbrido 11648, cultivadas em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de BAP. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

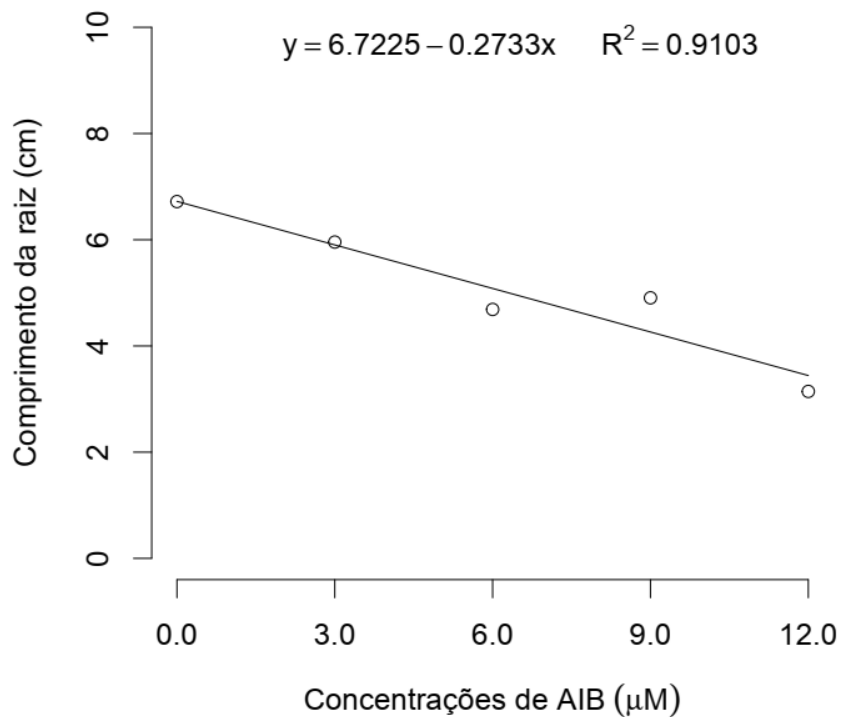


Figura 19. Comprimento da parte aérea de plantas de híbrido 11648 cultivadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de AIB.

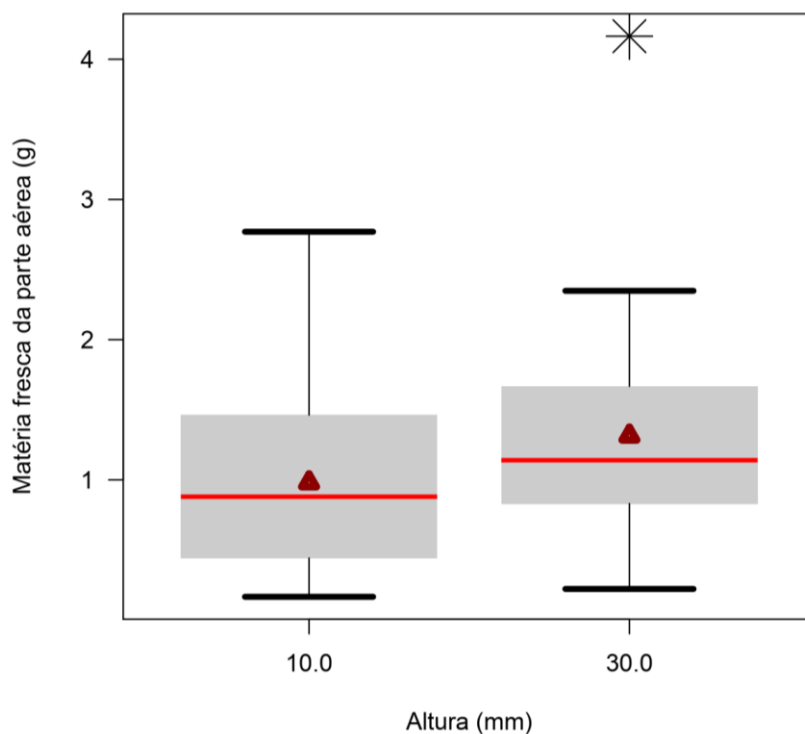


Figura 20. Matéria fresca da parte aérea de plantas de híbrido 11648 em função da altura inicial dos brotos cultivadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de AIB.

As concentrações de AIB não influenciaram no acúmulo de massa fresca da raiz, porém apresentaram melhores resultados (0,375 g) com os explantes de 30 mm de altura, em comparação aos de 10 mm (0,277 g) (Figura 21). Ao contrário do verificado para a massa fresca, houve redução na massa seca da raiz, com o aumento dos níveis de AIB, representado pela equação quadrática descendente. O maior acúmulo de matéria seca (0,0317 g) ocorreu na concentração de 5,63 μ M de AIB (Figura 22).

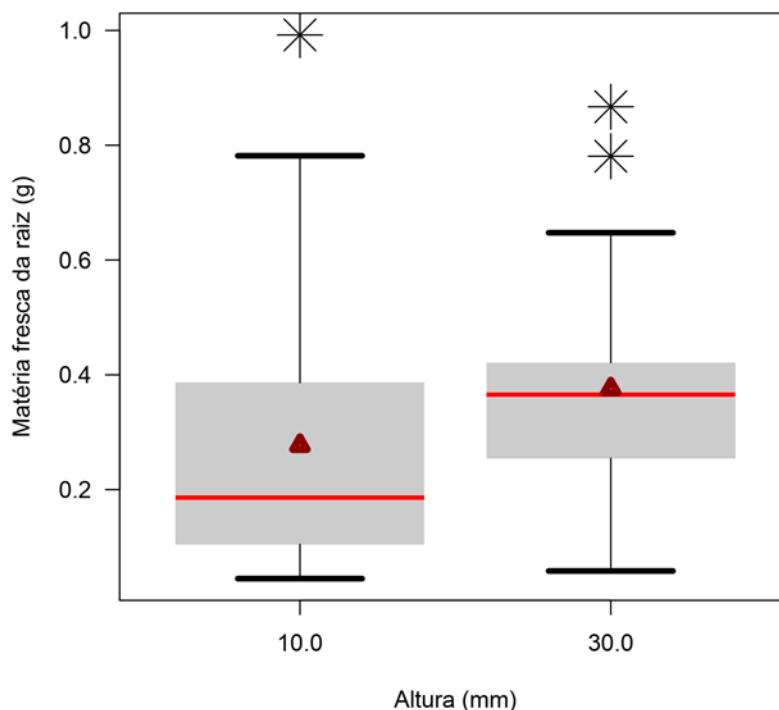


Figura 21. Matéria fresca da raiz de plantas de híbrido 11648 em função da altura inicial dos brotos em meio de cultura $MS\frac{1}{2}$, submetidos a diferentes concentrações de AIB.

Os explantes de 30 mm de altura exibiram maior acúmulo de massa seca (0,0315 g), enquanto que os explantes de 10 mm apresentaram menos massa (0,0214 g) (Figura 23). Em *Ananas comosus* L. Merrill o AIB não influenciou no processo de rizogênese e os melhores resultados para massa seca da parte aérea e raiz foram obtidos em meio isento de AIB (Oliveira-Cauduro et al., 2016).

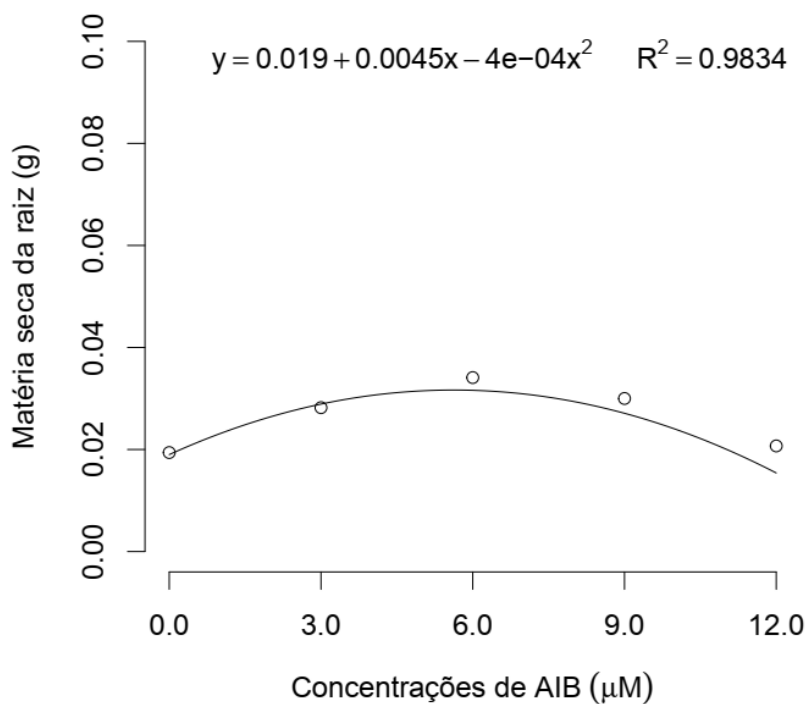


Figura 22. Matéria seca da raiz de plantas de híbrido 11648, cultivadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de AIB.

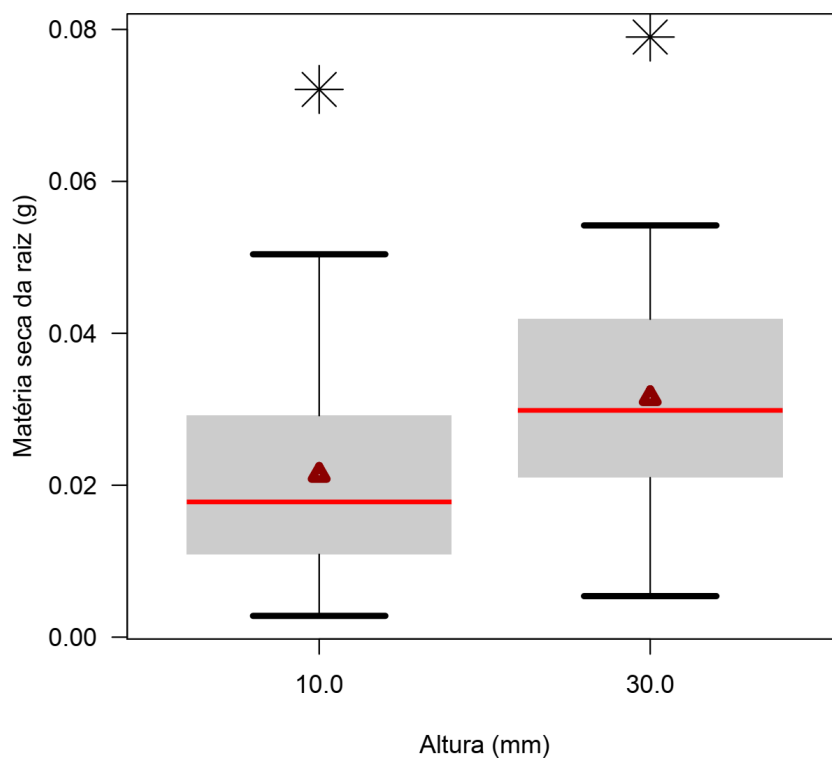


Figura 23. Matéria seca da raiz de plantas de híbrido 11648 em função da altura inicial dos brotos, cultivadas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com diferentes concentrações de AIB.

É provável que os explantes maiores sejam mais responsivos devido a condição nutricional, por apresentarem maior teor de carboidratos e de auxinas endógenas (Mayer et al., 2002; Pizzatto et al., 2011), otimizando o crescimento da parte aérea e raiz. As plantas enraizadas in vitro estão representadas na Figura 24A.



Figura 24. Plantas de híbrido 11648 enraizadas in vitro submetidas a diferentes concentrações de AIB (A). Plantas aclimatizadas após 90 dias de transplante (B).

Após 45 dias em meio de cultura de enraizamento, as mudas com 110 mm de altura e sistema radicular bem desenvolvido foram transferidas para casa de vegetação, sem passar por uma fase de rustificação e sem utilização de cobertura com recipientes plásticos. Aos trinta dias após a transferência das condições in vitro para ex vitro, observou-se o surgimento de folhas novas. A taxa de sobrevivência após 90 dias de aclimatização foi de 100%, com plantas morfológicamente bem desenvolvidas e adaptadas as condições ex vitro (Figura 24B), indicando que não há necessidade de pré-aclimatização, diminuindo os custos e tempo para produção de mudas.

CONCLUSÕES

1. O processo de desinfestação com hipoclorito de sódio e álcool 70 é eficiente, mostrando não ser necessário a utilização de tratamentos com fungicidas e antibióticos.
2. Os explantes tTCLs nas posições tTCLs AP, Ml₁ e Ml₂ podem ser estabelecidos direto em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ com a presença de 13,32 μ M de BAP obtendo ganho (otimizando) de tempo ao utilizar a fase de estabelecimento para início da multiplicação dos brotos, sem período de adaptação in vitro.
3. Na etapa de subcultivo, os explantes são mais responsivos para indução de brotos na presença de 13,328 μ M de BAP.
4. O aumento do número de subcultivos induziu a formação de culturas nodulares e calos friáveis.
5. Para indução de rizogênese, não é necessário o uso de AIB e explantes com tamanhos iniciais de 30 mm apresentaram melhor resposta.
6. A taxa de sobrevivência após aclimatização foi de 100%, gerando plantas morfológicamente bem desenvolvidas e adaptadas as condições ex vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Romman, S.M. et al., 2015. Kinetin is the most effective cytokinin on shoot multiplication from cucumber. *Journal of Agricultural Science*, 7, 159-159.

<http://dx.doi.org/10.5539/jas.v7n10p159>.

Akin-Idowu, P.E et al., 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 8, 3782-3788. <http://dx.doi.org/10.4314/ajb.v8i16.62060>.

dx.doi.org/10.4314/ajb.v8i16.62060.

Caraballo, M.G et al., 2010. Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 545-551.

<http://dx.doi.org/10.4067/s0718-58392010000400003>.

Carneiro, F.S et al., 2014. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44, 294-303. <http://dx.doi.org/10.1590/s1983-40632014000300005>.

Chen, Y et al., 2014. Micropropagation of *Agave americana*. *HortScience*, 49, 320-327. American Society for Horticultural Science,

<http://dx.doi.org/10.21273/hortsci.49.3.320>.

Cid, L.P.B.; Teixeira, J. B, 2014. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L.P.B. (Ed.). *Cultivo in vitro de plantas*. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa. 15-49p.

Cortleven, A., Noben, J.P., Valcke, R., 2011. Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science*. 09, 33.

<https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-33>.

Costa, F.H da S et al., 2006. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine

(AAA). Revista Brasileira de Fruticultura. 28, 280-283.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452006000200028>.

Da Rosa, J. et al., 2020. Carvão ativado influencia a morfogênese in vitro de *Gypsophila paniculata* L. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão.

Dahal, K.R., Utomo, B.I., Brink, M, 2003. *Agave sisalana* Perrine. In: Plant Resources of South-East Asia No 17. Bogor, Indonesia: Prosea Foundation. 68–75p.

Das, T., 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31, 253–255. <https://doi.org/10.1007/BF00036233>.

Deng G et al., 2019. Identification and expression of SAUR genes in the CAM plant agave. Genes (Basel).10, 555. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10070555>.

Dobránszki, J., Mendler-Drienyovszki, N., 2014. Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. Journal of Plant Physiology, 171, 1472-1478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.015>.

Duarte-Aké, F et al., 2016. Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process. Plant Cell Reports. 35, 2489-2502.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-016-2049-0>.

Fortes et al., 2010. Organogenic nodule formation in Hop: a tool to study morphogenesis in plants with biotechnological and medicinal applications. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010, 1-16.
<http://dx.doi.org/10.1155/2010/583691>.

Gao, J et al., 2014. Expression of a hevein-like gene in transgenic agave hybrid nº. 11648 enhances tolerance against zebra stripe disease. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 119, 579-585. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-014-0557-6>.

Gaspar, T.H et al., 2003. Changing concepts in plant hormone action. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 39, 85-106.

<http://dx.doi.org/10.1079/ivp2002393>.

George, E.F.; Hall, M.A; Klerk, G-J, 2008. Plant Tissue Culture Procedure - Background. E. F. George et al. (eds.). In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3. ed. Dordrecht: Springer. 65-114p.

Gomes, L.R.P et al., 2015. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 37, 143-149.

<https://doi.org/10.4025/actascibiols.v37i2.27276>

Hou, Jing-Wei et al., 2010. Effects of in vitro subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. 'yanshanhong'. *Journal of Forestry Research*. 21, 155-160.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11676-010-0025-z>.

Howell, S., 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science*. 8, 453-459. [http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385\(03\)00191-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385(03)00191-2).

Hussain, A et al., 2012. Plant Tissue Culture: current status and opportunities. *Recent Advances In Plant In Vitro Culture*. 1-28.

<http://dx.doi.org/10.5772/50568>.

Jamil, A.H et al., 2019. Sisal fiber of agave H11648 as a potential raw material for ecofriendly textile. 3. (ed). In: *Proceeding Indonesian Textile Conference (International Conference)*. 12v. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3470929>.

Junior Fermio, P.C.P., Nagao, E.O., Scherwinski-Pereira, J.E., 2009. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.F.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental.

. *Scientia, Forestal Piracicaba*, 37, 427-435.

Kulaeva, O.N., Burkhanova, E.A., Karavaiko, N.N., 2002. Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *Journal of Plant Physiology*. 159, 1309-1316. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00761>.

Kyozuka, J., 2007. Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology*. 10,442-446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.010>.

Lecona-Guzmán, C.A et al., 2017. In vitro propagation of *Agave americana* by indirect organogenesis. *Hortscience*. 52, 996-999. <http://dx.doi.org/10.21273/hortsci10498-16>.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148, 350-382.

Loyola-Vargas, V.M., Vazquez-Flota, F., 2006. *Plant Cell Culture Protocols*, 2nd ed. *Methods in Molecular Biology*, pp.53-56. <http://dx.doi.org/10.1385/1592599591>.

Magyar-tábori, K et al., 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 101, 251-267. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9696-6>.

Mayer, N.A., Pereira, F.M., Nachtigal, J.C., 2002. Efeito do comprimento de estacas herbáceas de dois clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) no enraizamento adventício. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24, 500-504. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452002000200044>.

Monja-mio, K.M., Robert, M.L., 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 49, 541-549. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>.

Moreira, J.A.N; Vieira, R.M. Melhoramento genético do sisal. In: SILVA, Odilon

Reny Ribeiro Ferreira da; BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo (Ed.). O agronegócio do sisal no Brasil. Brasília, Df: Embrapa, 1999. Cap. 6. p. 93-109.

Murashige, T.; Skoog, F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Nikam, T., 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51, 225–228.
<https://doi.org/10.1023/A:1005976304198>.

Oliveira-Cauduro, Y., 2017. Micropropagation of pineapple with in vitro and ex vitro rooting. *Plant Cell Culture & Micropropagation* ,12, 53-60.

Pimentel, C., 1998. *Metabolismo do carbono na Agricultura Tropical*. Edur, Seropédica, 150p.

Pizzatto, M et al., 2011. Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. *Revista Ceres*. 58, 487-492. <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-737x2011000400013>.

Portillo, L et al., 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 43, 569-575.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>.

Reyes-Díaz, J.I et al., 2017. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops And Products*.108, 81-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>.

Ríos-Ramírez, S.C et al., 2017. Benzylaminopurine and indole-3-acetic acid concentrations in in vitro proliferation of *Agave angustifolia* adventitious shoots. *Ciencia e Investigación Agraria*. 44, 284-293.
<http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>.

Rosa, W.S., et al., 2018. Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the in vitro multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*. 133, 339-350. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-018-1385-x>.

Rosales, M.S.D et al., 2008. El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*. 16, 53-62 .

Salgado, A.L.B.; Ciaramello, D.; Azzini, A, 1979. Melhoramento de *Agave* por hibridação. *Bragantia*. 38, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87051979000100001>.

Siddique, I.N.A et al., 2015. Influence of plant growth regulators on in vitro shoot multiplication and plantlet formation in *Cassia angustifolia* vahl. *Journal Braz. Arch. Biol. Technol*. 58, 686-691. [http:// dx.doi.org/10.1590/S1516-89132015050290](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132015050290).

Silva et al., 2020. Micropropagation and in vitro conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 42, 2-10. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v42i1.52940>.

Silva, O.R.R.F.da; Beltrão, N.E. de M, 1999. O agronegócio do sisal no Brasil. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Campina Grande: Embrapa-CNPA.

Silva, R.P et al., (2008). Indução e cultivo in vitro de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43, 1331-1337. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008001000011>

Sriskandarajah, S et al., 2006. Regenerative capacity of *Cacti schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormones, cytokinin oxidase/dehydrogenase, and peroxidase activities. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25, 79-88. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-005-0058-2>.

Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, pp. 449-484.

Van Staden, J., Zazimalova, E, George E.F., 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*, 3 ed. Springer, Dordrecht, 205–226p.

Varshney, A., Anis, M., 2011. Improvement of shoot morphogenesis in vitro and assessment of changes of the activity of antioxidant enzymes during acclimation of micropropagated plants of Desert Teak. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34, 859-867. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0883-9>.

Wattanapan, N et al., 2018. In vitro propagation through transverse thin cell layer (tTCLs) culture system of lady's slipper orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 40, 306-313. <http://dx.doi.org/10.14456/sjst-psu.2018.48>.

Yeh, S.Y., Chen, H.W., Ng C.Y., et al., 2015. Down-regulation of cytokinin oxidase 2 expression increases tiller number and improves rice yield. *Rice*. 8, 36-36. <http://dx.doi.org/10.1186/s12284-015-0070-5>.

Zhang, Yan-Mei et al., 2013. Shoot organogenesis and plant regeneration in agave hybrid, No. 11648. *Scientia Horticulturae*, 161, 30-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.047>.

ARTIGO 3**CONSERVAÇÃO IN VITRO DE GERMOPLASMA DE *Agave sisalana* SOB
CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO LENTO¹.**

¹ Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Biodiversity and Conservation, em versão na língua inglesa.

Conservação in vitro de germoplasma de *Agave sisalana* sob condições de crescimento lento

Priscila Tavares Fonseca¹ <https://orcid.org/0000-0002-7829-8412>. **Cristina Ferreira Nepomuceno**¹ <https://orcid.org/0000-0002-8242-1620>. **Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa**¹ <http://orcid.org/0000-0003-1666-711X>. **Jair Wyzykowski**¹ <https://orcid.org/0000-0002-1002-3631>. **Ana Cristina Fermino Soares**¹ <https://orcid.org/0000-0002-4014-1794>.

Resumo: A demanda por fibras naturais incentiva a expansão do mercado de sisal (*Agave sisalana*). A conservação de germoplasma de sisal é essencial na manutenção da diversidade genética e como ferramenta para as pesquisas na área de seleção, melhoramento e propagação in vitro da espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar os agentes osmóticos manitol e sorbitol, e o inibidor de crescimento paclobutrazol nas respostas morfológicas e no desenvolvimento de protocolos para a conservação in vitro de *A. sisalana*. Foram realizados dois experimentos para a conservação *in vitro*: 1- avaliação de sorbitol e manitol, nas concentrações 0,0; 87,0; 174,0 e 261,0 mM, com 87,0 mM sacarose, correspondente aos potenciais osmóticos -0,217; -0,437; -0,655 e -0,873 MPa; e 2 - avaliação do paclobutrazol (PBZ) nas concentrações 0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0 μ M. O manitol na concentração de 261,0 mM (-0,873 MPa) promoveu crescimento lento da cultura, com redução de 288,59%, quando comparado ao controle, e não influenciou na porcentagem de regeneração e multiplicação das plantas após 12 meses de cultivo. O paclobutrazol na concentração de 15,0 μ M proporcionou redução de 93,52% na altura das plantas, em relação ao controle e também não interferiu na porcentagem de regeneração e multiplicação das plantas. Manitol e paclobutrazol mostraram ser eficientes para conservação in vitro, mantendo a viabilidade do explante e sobrevivência das plantas após aclimatização. Esse é o primeiro estudo relatando estratégias de conservação de germoplasma de *A. sisalana*.

Palavras-chave Cultivo in vitro. Crescimento lento. Morfogênese. Conservação *ex situ*.

In vitro conservation of *Agave sisalana* germplasm under slow growing conditions

Priscila Tavares Fonseca¹ <https://orcid.org/0000-0002-7829-8412>. **Cristina Ferreira Nepomuceno**¹ <https://orcid.org/0000-0002-8242-1620>. **Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa**¹ <http://orcid.org/0000-0003-1666-711X>. **Jair Wyzykowski**¹ <https://orcid.org/0000-0002-1002-3631>. **Ana Cristina Fermino Soares**¹ <https://orcid.org/0000-0002-4014-1794>.

Abstract: The demand for natural fibers encourages the expansion of the sisal market (*Agave sisalana*). The conservation of sisal germplasm is essential in maintaining genetic diversity and as a tool for research in the area of selection, improvement and in vitro propagation of the species. The objective of this work was to evaluate the osmotic agents mannitol and sorbitol, and the growth inhibitor paclobutrazol in the morphological responses and in the development of protocols for the in vitro conservation of *A. sisalana*. Two experiments were carried out for in vitro conservation: 1- evaluation of sorbitol and mannitol, in concentrations 0.0; 87.0; 174.0 and 261.0 mM, with 87 mM sucrose, corresponding to the osmotic potentials -0.217; -0.437; -0.655 and -0.873 MPa; and 2 - evaluation of paclobutrazol (PBZ) at concentrations 0.0; 3.0; 6.0; 9.0; 12.0; 15.0 μ M. Mannitol at a concentration of 261.0 Mm (-0.873 MPa) promoted slow growth of the crop???, with a reduction of 288.59%, when compared to the control, and did not influence the percentage of plant regeneration and multiplication. Paclobutrazol at a concentration of 15.0 μ M provided a reduction of 93.52% in plant height, in relation to the control and also did not interfere in the percentage of plant regeneration and multiplication. Mannitol and paclobutrazol proved to be efficient for in vitro conservation, maintaining explant viability and plant survival after acclimatization. This is the first study reporting on *A. sisalana* germplasm conservation strategies.

Keywords In vitro cultivation. Slow growth. Morphogenesis. Ex situ conservation.

INTRODUÇÃO

Agave sisalana Perrine conhecida popularmente como sisal produz a principal fibra vegetal dura para o mercado brasileiro e mundial. No cenário internacional, o Brasil é o maior produtor e exportador de fibra de sisal (FAO, 2020). A produção de fibra de sisal na região semiárida da Bahia, no Brasil, detém 94,43% da produção brasileira (FAO 2020; IBGE 2020), esta cultura tem um papel social e econômico fundamental, constituindo-se como principal fonte de renda na agricultura familiar e na indústria da fibra, sendo importante agente de fixação do homem na região semiárida.

A fibra de sisal é utilizada tradicionalmente na produção de cordéis, cordas, cordões, fios, tecidos, tapetes, diversos artesanatos e seus derivados na indústria química e farmacêutica (Botura et al. 2013; Zhang et al. 2014; Maran e Priya 2015). Recentemente, novas demandas por fibras naturais estão expandindo os mercados de sisal, em aplicações de maior valor, como papel, compósitos reforçados e compósitos plásticos (FAO 2020).

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em maximizar o uso de materiais de plantas de agave para outros fins, como para aplicações em alimentos, forragem, ensilagem, agricultura, medicina, energia, meio ambiente, têxteis, cosméticos e estética, visto que a maior parte de sua biomassa pré e pós-produção é desperdiçada (Pérez-Zavala et al. 2020). O sisal e outras espécies de agaves apresentam potencial para produção de biocombustíveis, sendo consideradas plantas estratégicas na atual situação de mudanças climáticas com aquecimento global (FAO, 2020), por apresentarem o metabolismo CAM (Abraham et al. 2016; YIN et al. 2018), que lhes garante a resistência a condições climáticas de elevadas temperaturas e escassez de água e crescerem em solos considerados marginais, solos que não são utilizados para outras culturas.

Porém, a produção de sisal na Bahia tem enfrentado um forte declínio, com redução de 55,79% na produção de fibras de sisal, em 2016 a produção foi de 180.948 toneladas (IBGE, 2021) e em 2021 reduziu para 80.000 toneladas (FAO, 2021). A redução é reflexo de problemas de natureza tecnológica, com relação a tecnologias de plantio e manejo do solo e água, produção de mudas, prevenção e manejo fitossanitário e questões socioeconômicas. A reprodução

do sisal por via sexual é limitada pela escassa produção de sementes, sendo em sua maioria não viáveis. A propagação do sisal é predominantemente assexuada, pela emissão de rebentos e bulbilhos. Outro fator que dificulta a propagação da cultura, é o agente patogênico *Aspergillus welwitschiae*, que causa a podridão vermelha do sisal (Duarte et al. 2018), impactando negativamente a cadeia produtiva de sisal, principalmente nas últimas décadas.

É fundamental, para o correto desenvolvimento dessa cultura, que sejam desenvolvidas tecnologias para produção de mudas saudáveis (Holtum et al. 2011; Rodríguez-Garay e Rodríguez-Domínguez, 2018; Marone et al. 2020), e que sejam introduzidas novas espécies e variedades de forma a enriquecer os bancos de germoplasma. A partir disso será possível identificar as melhores cultivares para os diferentes usos e regiões, o que poderá tornar a agaveicultura uma das grandes fontes de biomassa (Marone et al. 2020).

A biotecnologia, em particular a cultura de tecidos, é, portanto, a melhor opção para o melhoramento dos agaves usados para fins comerciais. Uma contribuição extremamente importante dessas técnicas está relacionada à conservação de espécies ameaçadas de extinção e à manutenção de linhagens potencialmente úteis para melhorias futuras e à busca de novos usos para esse grupo de plantas muito importante, mas ainda não totalmente explorado (Monja-Mio et al. 2019). Por ser uma cultura que predomina em ambientes áridos e semiáridos, os genes consistem em um recurso potencial para a engenharia genética de outras culturas agronomicamente importantes cultivadas em climas adversos (Pérez-Zavala et al. 2020).

A cultura de tecidos vegetais contribui para a produção de mudas com boa qualidade fitossanitária, assim como possibilita a preservação de material genético *in vitro*, para uso em programas de melhoramento genético, permitindo assim, a seleção de genótipos que expressem maior produtividade, resistência a seca, a doenças, dentre outras características agronômicas.

A conservação *in vitro* é uma estratégia que mantém as plantas de forma que possam permanecer sob condição de laboratório com o mínimo de manipulação possível, garantindo assim a identidade genética do material e a qualidade fitossanitária (Almeida et al. 2002; Engelmann, 2011; Santos et al. 2011; Reed et al. 2013). O material vegetal conservado *in vitro* não fica exposto a diferentes condições abióticas, como na conservação *in situ* ou *ex*

situ (coleções vivas no campo), podendo estar disponível ao longo de todo o ano (El-Bahr et al. 2016). Esta técnica consiste na manutenção das plantas em meio de cultura em condições de crescimento mínimo pela manipulação de diferentes fatores que reduzam o metabolismo da planta. Esses fatores podem ser desde minimizar a disponibilidade de água no meio, pelo uso de osmorreguladores, como galactose, maltose, sorbitol, dentre outros, até o uso de reguladores vegetais como o ABA (ácido abscísico), substâncias retardantes de crescimento como o paclobutrazol, além da modificação nas condições de incubação da cultura, a exemplo da redução da temperatura e da luminosidade (Engelmann 2011).

O sistema de crescimento mínimo é vantajoso por permitir o prolongamento entre os intervalos dos subcultivos sem afetar a viabilidade das plantas (Ashmore 1997; Pérez-Molphe-Balch et al. 2012; Silva et al. 2016). Além disso, o material vegetal pode ser mantido com sucesso no mesmo meio de cultura por período de um a cinco anos, a depender da espécie e do método usado (Reed et al. 2011; Pérez-Molphe-Balch et al. 2012; Pacheco et al. 2016).

Alguns relatos bem-sucedidos de crescimento lento *in vitro* para os agaves foram reportados para as espécies ameaçadas *Agave bracteosa*, *A. chiapensis*, *A. nizandensis*, *A. ornithobroma*, *A. peacockii*, *A. titanota* e *A. victoria reginae*, e para espécies exploradas de forma não sustentável. *A. cupreata*, *A. karwinskii* e *A. potatorum*, usado para a produção de "mezcal", (Pérez-Molphe-Balch et al. 2012), com a utilização de agentes osmóticos ao meio de cultura como o manitol ou sorbitol.

O paclobutrazol tem sido uma alternativa em protocolos de conservação por atuar inibindo a síntese de giberelina (Soumya et al. 2017), com resultados satisfatórios na conservação de *Solanum tuberosum*, 'Grande Naine' (*Musa AAA*) (Albany et al. 2005), *Anadenanthera colubrina* (Nepomuceno et al. 2007), *Syringa x hyacinthiflora* (Cui et al. 2009), *Saccharum* spp. (Bello-Bello et al. 2014). Na literatura não há relatos com a utilização deste agente retardante de crescimento para agaves. A eficácia desta técnica varia de acordo com as características fisiológicas da espécie a ser conservada. Embora não haja procedimento padrão para todos os genótipos de todas as espécies, os sucessos obtidos têm sido animadores, e será possível desenvolver um método adequado de crescimento lento para novas espécies. Contudo, ressalta-se a necessidade

de conhecer melhor os efeitos desses agentes no desenvolvimento, metabolismo e morfologia das plantas nas fases subsequentes de regeneração, multiplicação e aclimatização, pois pode afetar o crescimento, o rendimento, integridade da membrana, conteúdo de pigmentos, ajuste osmótico e atividade fotossintética (Anjum et al. 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os agentes osmóticos manitol e sorbitol e o inibidor de crescimento paclobutrazol na indução do crescimento lento de *Agave sisalana*, visando a conservação in vitro como alternativa de conservação ex situ.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

A coleta de bulbilhos de *Agave sisalana* (Figura 1A) foi realizada na região sisaleira do semiárido baiano, nos municípios de Valente (Latitude: 11° 24' 41" Sul, Longitude: 39° 27' 48" Oeste) e Conceição do Coité (Latitude: 11° 33' 41" Sul, Longitude: 39° 17' 10" Oeste), Bahia, Brasil.

2.2 Conservação in vitro de *Agave sisalana* utilizando agentes osmóticos

Os bulbilhos foram estabelecidos e multiplicados in vitro conforme Rios et al. (2007). Após a multiplicação, os brotos foram transferidos para meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (Murashige e Skoog 1962) livre de reguladores de crescimento. Ao final de 30 dias, os brotos formados foram reduzidos (7,0 mm x 3,0 mm) e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (Figura 1D), acrescido de sorbitol (Sr) e manitol (Mn) nas concentrações: 0,0; 87,0; 174,0; 261,0 mM, com 87,0 mM de sacarose (Sc) e solidificado com 0,8% de ágar. As concentrações dos agentes osmóticos foram correspondentes aos potenciais osmóticos: -0,217; -0,437; -0,655 e -0,873 MPa (Tabela 1), os quais foram calculados através da equação Van't Hoff's (Paiva Neto e Otoni, 2003).

Equação:

$$\Psi_o = -C_iRT$$

onde,

C – Concentração do soluto

i – Constante de ionização

R – Constante de gases ($0,00831 \text{ kg MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T – Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Tabela 1 Concentrações e potenciais osmóticos de manitol e sorbitol combinado com sacarose na conservação in vitro de *Agave sisalana*.

Sacarose (Sc)	Osmotic agents (mM)		Potencial osmótico (MPa)
	Mannitol (Mn)	Sorbitol (Sr)	
87,0	----	----	-0,217
87,0	87,0	----	-0,437
87,0	174,0	----	-0,655
87,0	261,0	----	-0,873
87,0	----	87,0	-0,437
87,0	----	174,0	-0,655
87,0	----	261,0	-0,873

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial $2 \times 3 + 1$ (dois agentes osmóticos, três concentrações e controle), totalizando sete tratamentos, com oito repetições, cada uma constituída de quatro unidades experimentais. A cada trimestre fez-se a avaliação das plantas, durante o período total de 12 meses.

Realizou-se também a regeneração dos brotos conservados, subcultivos, enraizamento e aclimatização das plantas (Figura 1).

2.3 Conservação in vitro de *Agave sisalana* utilizando inibidor de crescimento paclobutrazol

Os bulbilhos, após 60 dias de estabelecidos in vitro, foram incisados reduzindo-se as folhas e o pseudocaule (7,0 mm x 3,0 mm) e em seguida inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura $\text{MS}_{1/2}$ (Figura 1D) acrescido de paclobutrazol (PBZ) nas concentrações: 0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0;

15,0 μM , suplementado com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) constituído de cinco concentrações de paclobutrazol e controle, totalizando seis tratamentos, com oito repetições, cada uma constituída de quatro unidades experimentais.

A cada trimestre foi efetuada a avaliação das plantas, durante o período total de 12 meses. Realizou-se também a regeneração dos brotos conservados, subcultivos, enraizamento e aclimatização das plantas (Figura 1).

2.4 Variáveis analisadas

As variáveis avaliadas para os dois experimentos foram: porcentagem de sobrevivência (%S), comprimento da parte aérea em cm (CPA), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS), número de brotos (NB), porcentagem de plantas hiperídricas (%H), número de raízes (NR), massa fresca e seca da parte aérea e da raiz (MFPA, MSPA, MFR e MSR). As variáveis foram avaliadas trimestralmente, exceto para massa fresca e seca das plantas, as quais foram analisadas no final de doze meses de conservação *in vitro*.

2.5 Regeneração *in vitro* de plantas de *Agave sisalana* conservadas *in vitro*

Para avaliar a capacidade de regeneração das plantas conservadas *in vitro*, foram retiradas seis plantas de cada tratamento (agentes osmóticos e inibidor de crescimento), trimestralmente, durante doze meses de conservação *in vitro*. As plantas conservadas foram reduzidas, ficando apenas com a região basal do pseudocaule (base inteira), cujo tamanho final foi de aproximadamente 10,0 mm de altura e foram inoculadas em frascos contendo 40 mL de meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$, acrescido de 53,28 μM de BAP, suplementado com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial $2 \times 3 + 1$ (dois agentes osmóticos x três concentrações mais o controle). No experimento com o inibidor de crescimento paclobutrazol, foram avaliadas cinco concentrações mais o controle, totalizando seis tratamentos,

com quatro repetições, cada uma constituída de duas unidades experimentais. A cada 45 dias de cultivo foi avaliada a porcentagem de regeneração (% R).

2.6 Multiplicação in vitro de plantas de *Agave sisalana* conservadas in vitro

As plantas provenientes da regeneração in vitro (após 45 dias) foram reduzidas e o pseudocaule segmentado em duas metades (base $\frac{1}{2}$) com aproximadamente 10,0 mm de altura e inoculado em frasco tipo borel contendo 40 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, acrescido de 53,28 μ M de BAP, suplementado com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 3 + 1 (dois agentes osmóticos x três concentrações e o controle) e para o PBZ foi constituído de cinco concentrações mais o controle, totalizando seis tratamentos. Os experimentos foram compostos por quatro repetições, cada uma constituída de duas unidades experimentais. Foram realizados três ciclos de multiplicação bimestral, sendo avaliado o número de brotos a cada subcultivo.

2.7 Enraizamento in vitro e aclimatização de plantas de *Agave sisalana* conservadas in vitro

Plantas obtidas do terceiro subcultivo com aproximadamente 4,0 cm de altura foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ sem regulador vegetal, acrescido com 87,0 mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

Após 45 dias, as plantas foram aclimatizadas, transferindo-se 10 plantas de cada tratamento para tubetes (63 mm x 190 mm), solo (latossolo distrófico) + composto orgânico (latossolo amarelo, resíduos de podas de árvores, esterco caprino e bovino), na proporção 1:1 e mantidos em casa de vegetação com 50% de sombreamento. Após 90 dias de aclimatizadas foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

2.8 Condições experimentais

O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N, antes da autoclavagem à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 20 minutos. As inoculações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para a manutenção de condição asséptica, os tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) fechados com filme plástico de policloreto de vinila (PVC) e os frascos borel (252 mm x 329 mm) com tampas envolto com PVC.

As condições experimentais da sala de crescimento para cultivo in vitro de *A. sisalana* foram temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.9 Análise estatística

Os dados foram avaliados mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott-Knott e análise de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. Para obtenção de distribuição normal, quando necessário, os dados foram transformados utilizando a análise box-cox, a 5% de significância. Para as variáveis em que os dados não seguiram uma distribuição normal, optou-se apenas por descrever. O software RStudio (RStudio Team 2020) foi usado para realizar as análises estatísticas.

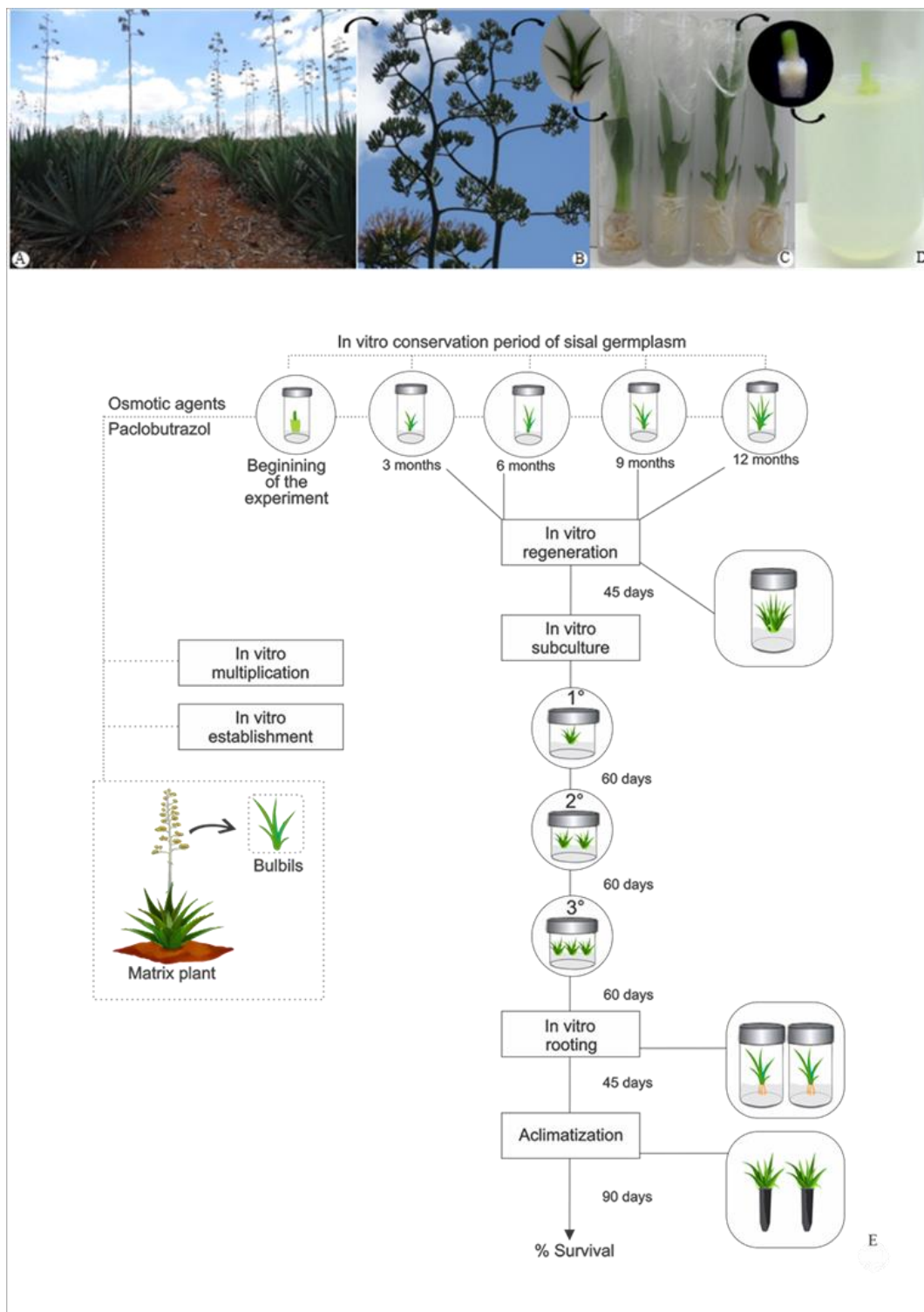


Figura 1 Plantas de *Agave sisalana* com inflorescência (A). Inflorescência com bulbilhos (B). Plantas após sessenta dias de estabelecidas in vitro (C). Explante em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ acrescido de agentes osmóticos ou paclobutrazol (D). Organograma com as etapas até a aclimatização in vitro de plantas de *A. sisalana* (E).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conservação in vitro de *Agave sisalana* utilizando agentes osmóticos

Durante o período de conservação in vitro, houve sobrevivência de 100% das plantas, independentemente do tempo e do agente osmótico utilizado. Este resultado em *A. sisalana* foi superior ao relatado por Pérez-Molphe-Balch et al. (2012) para espécies do gênero *Agave*, com 80% de sobrevivência das plantas após 10 meses de cultivo em meio de cultura com manitol ou sorbitol combinados com sacarose.

Pode-se observar, ao longo do tempo de conservação in vitro, que o comprimento da parte aérea das plantas de sisal continuou aumentando, independentemente do tipo de agente osmótico utilizado. Contudo, verificou-se que a partir dos 180 dias, esse crescimento foi mais lento (Figura 2), indicando que não houve efeito deletério dos agentes osmóticos no alongamento celular.

A desaceleração do metabolismo de *A. sisalana* foi evidenciada pelo crescimento mais lento das plantas, com o aumento das concentrações de agentes osmóticos. O manitol mostrou-se mais eficiente na inibição do crescimento das plantas de sisal do que sorbitol. Na maior concentração de manitol (261,0 mM), correspondente ao potencial osmótico -0,873 MPa, as plantas apresentaram o menor comprimento da parte aérea (2,57 cm), quando comparado ao controle (-0,217 MPa) (9,98 cm), com redução de 288,59% na taxa de crescimento (Tabela 2) (Figura 3A). Pérez-Molphe-Balch et al. (2012) observaram também a redução na taxa de crescimento em espécies do gênero *Agave* na presença de 145,0 mM manitol ou sorbitol. Os agentes osmóticos também promoveram o crescimento mais lento em espécies e subespécies do gênero *Turbinicarpus* (Cactaceae) (Pérez-Molphe-Balch et al. 2012).

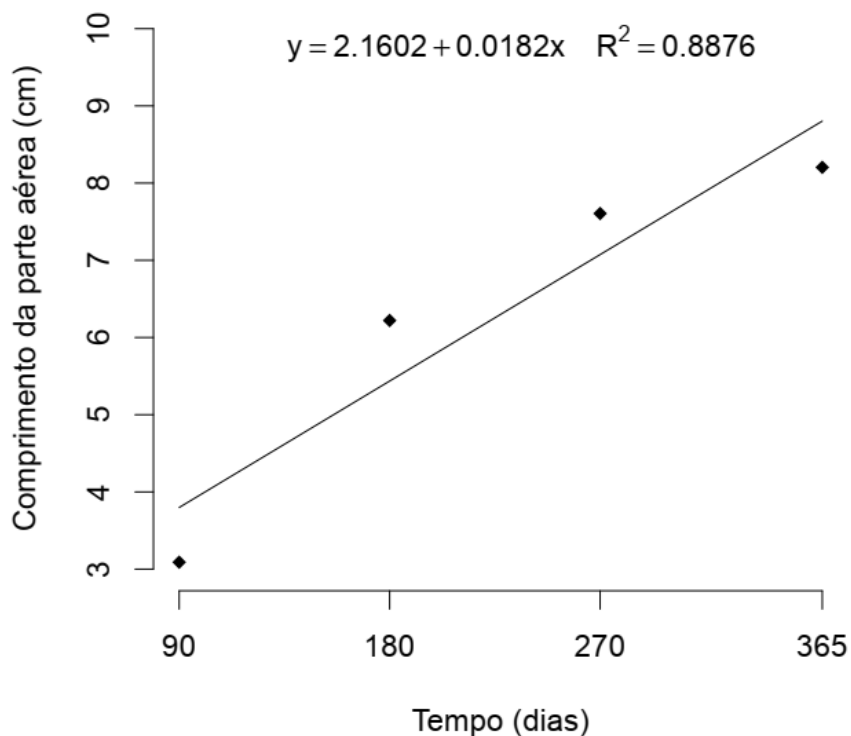


Figura 2 Comprimento médio da parte aérea de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* em função do tempo, em meio de cultura MS½ suplementado com manitol e sorbitol, associados a sacarose.

O crescimento mínimo em *A. sisalana* está relacionado ao modo de ação dos agentes osmóticos, quando adicionados ao meio de cultura, os quais removem o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, reduzindo o potencial hídrico, ocasionando a diminuição da absorção de água e de nutrientes do meio de cultura, o que conseqüentemente reduz o metabolismo da planta.

Além disso, a resposta observada in vitro pode ser reflexo do comportamento da espécie no ambiente natural, pois são espécies adaptadas a regiões semiáridas, em que a disponibilidade de água determina ciclos de crescimento e dormência, sendo também regulado pela acumulação de metabólitos como prolina, e outros compostos osmoprotetores, dentre estes, o manitol (Pérez-Molphe-Balch et al. 2012).

Tabela 2 Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas verdes (NFV), matéria fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA), e matéria fresca e seca da raiz (MFR e MSR) de plantas de *Agave sisalana* com diferentes concentrações de manitol e sorbitol, associado a sacarose, após 12 meses de conservação in vitro.

Agente osmótico (mM)			ΨS (MPa)	CPA (mm)	NFV	MFPA (mg)	MSPA (mg)	MFR (mg)	MSR (mg)
Sc	Mn	Sr							
87,0	-	-	-0,217	9,98 a	6,26 a	23,01 a	15,67 b	5,27 b	0,58 b
87,0	87,0	-	-0,437	5,48 c	5,99 a	17,90 a	17,43 b	5,13 b	0,60 b
87,0	174,0	-	-0,655	4,30 d	4,06 b	4,81 b	0,49 c	1,47 c	0,29 c
87,0	261,0	-	-0,873	2,57 e	3,97 b	4,43 b	0,96 c	0,60 c	0,18 c
87,0	-	87,0	-0,437	8,56 b	5,49 a	20,60 a	14,22 b	4,14 b	0,60 b
87,0	-	174,0	-0,655	7,61 b	5,91 a	19,26 a	21,78 a	5,59 b	0,81 b
87,0	-	261,0 -	-0,873	5,46 c	4,10 b	5,99 b	13,70 b	11,38 a	1,76 a
CV (%)				33,64	20,62	26,36	34,00	33,26	34,97

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Sc - sacarose; Mn - manitol; Sr - sorbitol.

A eficiência do manitol regulando o crescimento da espécie *in vitro* é um indicativo da ação deste atuando como substrato para enzimas de translocação (Dumschott et al. 2017), com efeito no crescimento e particionamento de recursos (Turgeon et al. 2009), e seu acúmulo resulta na melhor tolerância ao estresse abiótico, mecanismo de adaptação que contribui para tolerar o déficit hídrico no habitat natural.



Figura 3 Plantas cultivadas em meio de cultura $Ms\frac{1}{2}$ com sacarose (Sc), manitol (Mn) e sorbitol (Sr) aos 12 meses de cultivo *in vitro* (A). Brotos com hiperhidricidade *in vitro* (B). Brotos regenerados *in vitro* (C). Plantas aclimatizadas de *Agave sisalana* (D).

O modelo linear crescente (Figura 4) indica o aumento do número de folhas verdes, independente dos agentes osmóticos testados, com o declínio tendo início no final do período de cultivo (365 dias), que está relacionado a senescência das folhas.

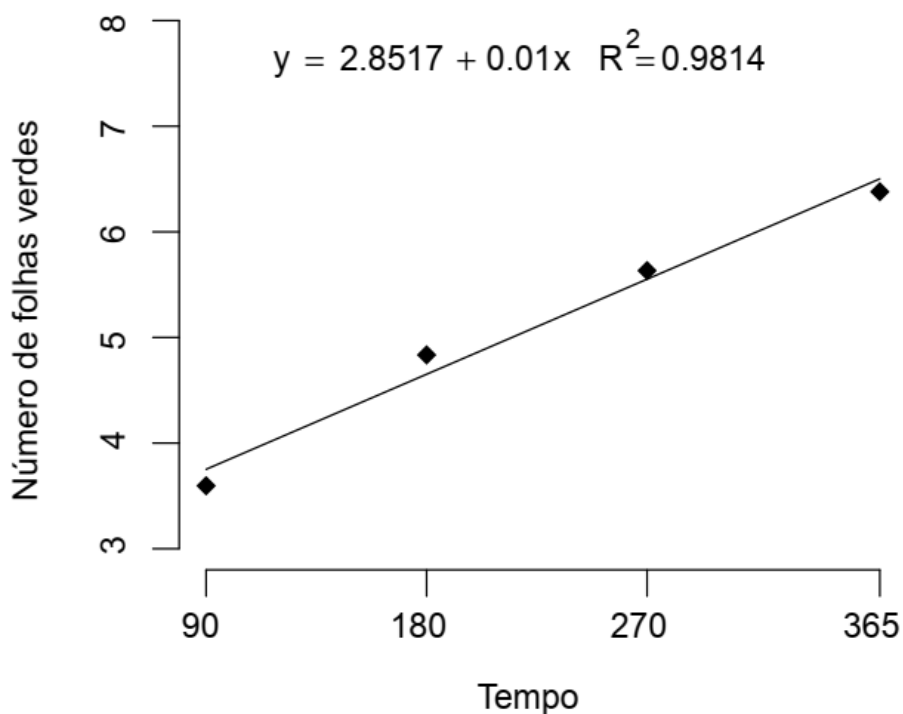


Figura 4 Número de folhas verdes de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* em função do tempo submetidas a diferentes concentrações de agentes osmóticos: manitol e sorbitol associados a sacarose.

Observou-se a redução do número de folhas verdes, com o aumento das concentrações de manitol e sorbitol. O menor número de folhas verdes (3,9; 4,06 e 4,10) ocorreu nas plantas mantidas no meio de cultura com 261 mM e 174 mM de manitol e 261 mM de sorbitol, respectivamente (Tabela 2).

A redução no número de folhas é um mecanismo de defesa na tolerância à seca, o que provavelmente ajuda a planta a absorver menos luz e, portanto, tem menos superfície de transpiração (Akbarpour et al. 2017). Além disso, reduções no suprimento hídrico inibem o crescimento do caule e a expansão foliar, estimulando preferencialmente o alongamento das raízes (Taiz et al. 2017) para melhor absorção de água e nutrientes.

Foi observado que as menores médias para o acúmulo de massas fresca e seca da parte aérea e de raiz ocorreram nos potenciais osmóticos mais elevados (Tabela 2). Esses resultados indicam que no potencial mais elevado de manitol a produção de fotoassimilados e incorporação de esqueletos de carbono ocorrem de forma mais lenta. Conforme, Pace et al. (1999) o crescimento inicial lento ocorre porque as plantas gastam grande parte da energia para emissão de raízes pela planta, sendo as raízes nesta fase o dreno preferencial dos fotoassimilados. Quando o potencial da água é reduzido nas raízes, ocorre um rápido ajuste osmótico, auxiliando o restabelecimento da pressão de turgor e permitindo a manutenção do alongamento celular. Em contraste, o ajuste osmótico nas folhas ocorre mais lentamente, levando à diminuição ou à parada da extensão das paredes celulares e ao menor crescimento da parte aérea (Hsiao e Xu, 2000).

O surgimento de folhas senescentes foi verificado ao longo do tempo de cultivo observando início do processo de senescência a partir do sexto mês. Não houve diferença estatística para o número de folhas senescentes na concentração de manitol com maior potencial osmótico (-0,873 MPa), durante o intervalo de tempo de cultivo, exibindo o menor número de folhas senescentes (0,31). Entretanto, para as demais concentrações, observou-se aumento de folhas senescentes proporcional ao tempo de cultivo, representado pelo modelo linear crescente. O maior número de folhas senescentes (3,20) foi obtido nas concentrações com o menor potencial osmótico -0,217 MPa de sacarose e -0,437 MPa de sorbitol (Figura 5). As folhas em estágio de senescência apresentavam amarelecimento, não sendo verificada em nenhum tratamento a abscisão foliar.

O aparecimento de folhas senescentes pode estar correlacionado com a redução da disponibilidade de nutrientes, que causa a translocação destes das folhas maduras para as folhas jovens. De acordo com George et al. (2008), ao longo do ciclo, a concentração de alguns elementos nas folhas aumenta enquanto a de outros decresce, ocorrendo translocação de nutrientes de órgãos senescentes para regiões de crescimento das plantas, como folhas novas e estruturas reprodutivas. A quantificação do início de senescência das folhas é de extrema importância para protocolos de conservação, pois indica quando as

plantas devem ser transferidas para um novo meio de cultura antes de ocorrer o processo de perda de viabilidade dos explantes.

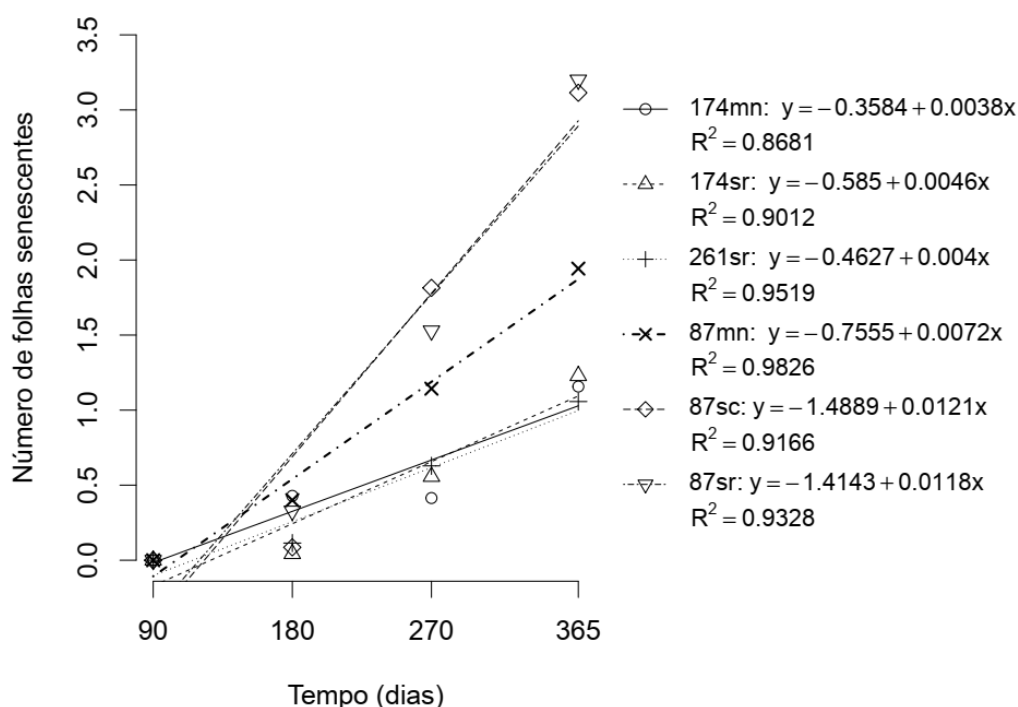


Figura 5 Número de folhas senescentes de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* em função do tempo submetidas a diferentes concentrações de agentes osmóticos: manitol (mn) e sorbitol (sr) associados a sacarose (sc).

O agente indutor de estresse osmótico manitol foi eficiente na promoção do crescimento mínimo in vitro de plantas de *A. sisalana*. O comprimento da parte aérea, acúmulo de massa fresca e seca e número de folhas senescentes são variáveis essenciais para avaliar o desempenho das espécies conservadas in vitro. As duas primeiras indicam se está ocorrendo o crescimento mínimo, em consequência da desaceleração do metabolismo das plantas, e a terceira variável indica o estado fisiológico da planta, sinalizando quando a planta começa a senescer, e, se inicia a perda de viabilidade.

A emissão de brotos foi verificada em todos os tratamentos, obtendo maior número de brotos na concentração com o potencial -0,437 MPa de sorbitol. A emissão de brotos pode ser um efeito residual de BAP adicionado na fase de multiplicação. Resultado similar foi observado em *Agave* spp., após conservadas

in vitro por dez meses, os autores constataram formação de brotos laterais nas plantas in vitro ao suplementar o meio de cultura com manitol e sorbitol (Pérez-Molphe-Balch et al. 2012).

A adição de agentes osmóticos no meio de cultura não promoveu inibição de emissão de raízes, observando aumento proporcional ao tempo de cultivo. O aumento no número de raízes para as concentrações com potenciais -0,217 MPa e -0,437 MPa, ao longo do tempo de cultivo, foi representado pelo modelo quadráticas descendente, constatando o maior número de raízes (17,5). Para os potenciais -0,655 MPa e -0,873 MPa, o modelo que melhor se ajustou foi o linear crescente (Figura 6). A concentração correspondente ao potencial de -0,873 MPa de manitol, não apresentou diferença entre os tempos de cultivo.

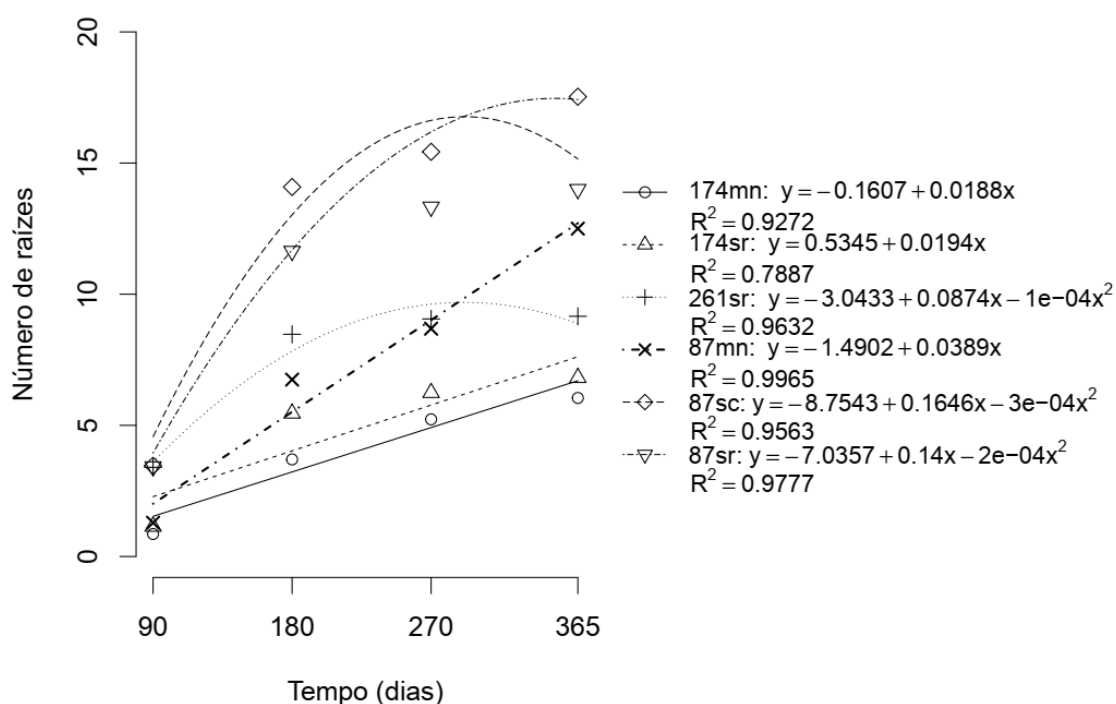


Figura 6 Número de raízes de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* em função do tempo submetidas a diferentes concentrações de agentes osmóticos: manitol (Mn) e sorbitol (Sr) associados a sacarose.

A restrição hídrica afeta o consumo de carbono e energia pela parte aérea, favorecendo uma distribuição maior de assimilados vegetais para o sistema radicular, levando a um crescimento preferencial das raízes e limitando o crescimento da parte aérea (Taiz et al. 2017). Para *A. sisalana*, o aumento da

restrição hídrica não favoreceu ao aumento do número de raízes, pois o maior número de raízes foi observado no menor potencial osmótico (-0,2167 MPa).

Nesse estudo foram observados brotos com hiperhidricidade, verificando maior porcentagem (41%) no potencial de -0,473 MPa, com manitol, não diferindo de -0,837 MPa com ambos os agentes osmóticos e -0,655 MPa com o sorbitol. As plantas de *A. sisalana* com hiperhidricidade exibiram folhas verde clara e escura, aparência vítrea, túrgidas e frágeis, características morfológicas típicas de plantas com hiperhidricidade (Figura 3B).

Em um estudo, Nikam et al. (2019) mostraram que *A. sisalana* é uma planta suscetível ao excesso de água e a inclusão de baixos níveis de agentes indutores de estresse osmótico NaCl e PEG no meio de cultura é benéfico para reverter brotos com hiperhidricidade. Entretanto, ao utilizar os agentes indutores de estresse osmótico manitol e sorbitol estes não inibiram a formação de plantas com hiperhidricidade. É possível que, em *A. sisalana*, este fenômeno também esteja associado a outros fatores como excesso de sais minerais (fonte de nitrogênio, cloreto etc.), estresse oxidativo e baixa densidade de fluxo de fótons.

A cada noventa dias foi realizada a retomada de crescimento das plantas conservadas in vitro, com o objetivo de analisar a viabilidade do explante. Entretanto, não houve diferença estatística para porcentagem de regeneração, independente do tempo de cultivo e das concentrações de agentes osmóticos testados, observando-se 100% de indução de brotações. As plantas sob conservação in vitro mantiveram à capacidade de regeneração, não influenciando no potencial morfogênico. A indução e crescimento de novas plantas, a partir do material conservado in vitro, levou aproximadamente 30 dias (Figura 3C).

A porcentagem de regeneração é uma variável importante para verificar a viabilidade do explante após o período de conservação in vitro. Em *A. sisalana* é possível manter o potencial morfogênico das plantas até os doze meses de cultivo analisados com a utilização de agentes osmóticos, sem a necessidade de subcultivos. Resultados similares foram reportados por reportados por Pérez-Molphe-Balch et al. (2012) para *Agave* spp. com taxa de regeneração entre 78% a 86 %, variando em função das espécies após dez meses de conservação in vitro.

As plantas regeneradas *in vitro* foram multiplicadas por três ciclos de cultivo. Notou-se aumento do número de brotos em função dos subcultivos, com maior indução de brotos (204,45) no terceiro subcultivo, correspondente ao aumento de 3.150% em relação ao primeiro subcultivo (6,29). Essa resposta sinalizou que independente dos agentes osmóticos ou concentrações avaliadas, não houve interferência no potencial morfogênico das plantas, e que a conservação da espécie é viável pelo período de doze meses, sem a necessidade de transferir as plantas para um novo meio de cultura (Figura 7). Resultados semelhantes foram obtidos após 24 meses de conservação de acessos de *Ananas comosus*, com aumento do número de brotações com os subcultivos (Silva et al. 2016).

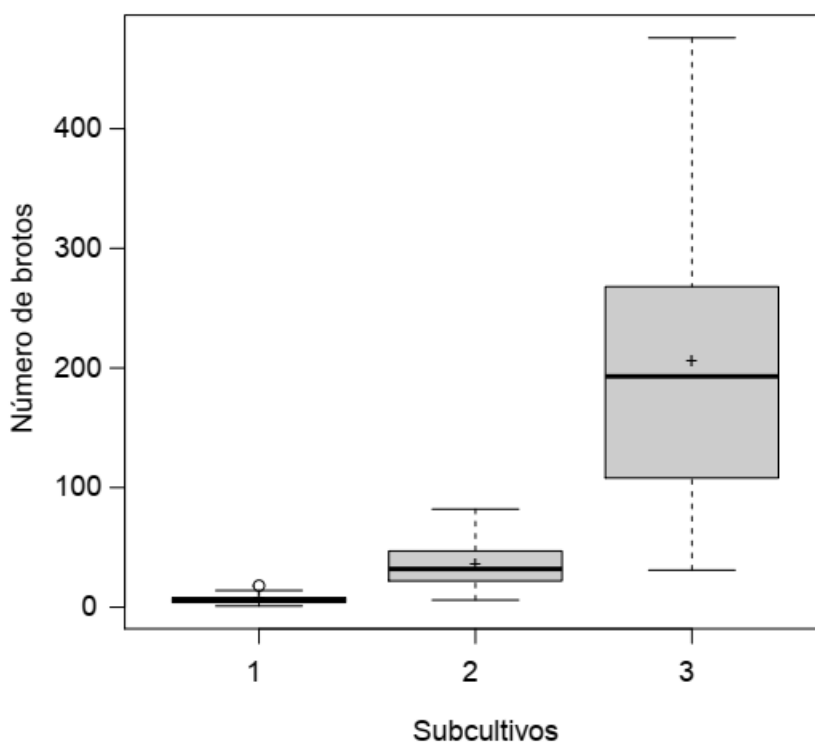


Figura 7 Número de brotos de plantas de *Agave sisalana* em função dos subcultivos submetidos a diferentes concentrações de agentes osmóticos associados a sacarose em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$.

As plantas após o terceiro subcultivo foram enraizadas em meio isento de regulador vegetal, observando crescimento e formação de raízes em todas as plantas. Estas foram aclimatizadas, e após 90 dias constatou-se 100% de sobrevivência das plantas sem nenhuma anomalia, com plantas bem

desenvolvidas após o período de quatro meses em casa de vegetação (Figura 3D).

O estudo permitiu inferir que ao adicionar no meio de cultura o agente osmótico manitol na concentração 261,0 mM correspondente a -0,873 MPa, promoveu desaceleramento do metabolismo implicando no crescimento mais lento e manutenção da viabilidade da cultura, gerando um protocolo eficiente para ser usado na manutenção da espécie em banco de germoplasma por um período de 12 meses.

3.2 Conservação in vitro de *Agave sisalana* utilizando inibidor de crescimento paclobutrazol

A adição de paclobutrazol no meio de cultura para promover o crescimento lento de plantas de *A. sisalana* não interferiu na porcentagem de sobrevivência, verificando que não houve diferença estatística entre as concentrações testadas, obtendo 100% sobrevivência das plantas durante o período de doze meses de conservação.

Em todas as concentrações de BPZ houve crescimento mais lento da cultura, embora o aumento da concentração tenha proporcionado a maior redução no comprimento da parte aérea. A concentração de 15,0 μ M de PBZ causou crescimento mais lento das plantas (7,5 cm), quando comparado ao controle (14,5 cm), representado pelo modelo linear (Figura 8), constatando redução de 93,52% na altura das plantas. A Figura 9A mostra a redução do crescimento de plantas conservadas em meio de cultura acrescido com PBZ.

O crescimento mínimo das plantas provavelmente está associado a redução das divisões celulares e alongamento celular, devido à inibição da síntese de giberelina, hormônio que atua na extensão da parede e alongamento celular (Taiz e Zaiger 2009). O paclobutrazol inibe a atividade da *ent*-caureno oxidase, enzima na via biossintética de GA que catalisa a oxidação do *ent*-caureno em ácido *ent*-caurenóico (Kondhare et al. 2014). O resultado obtido para *A. sisalana* é similar ao reportado para as espécies *A. colubrina* (Nepomuceno et al. 2007), *Syringa x hyacinthiflora* (Cui et al. 2009), *Dendrobium nobile* (Z. Wen et al. 2013), com redução na altura das plantas, com o uso de PBZ.

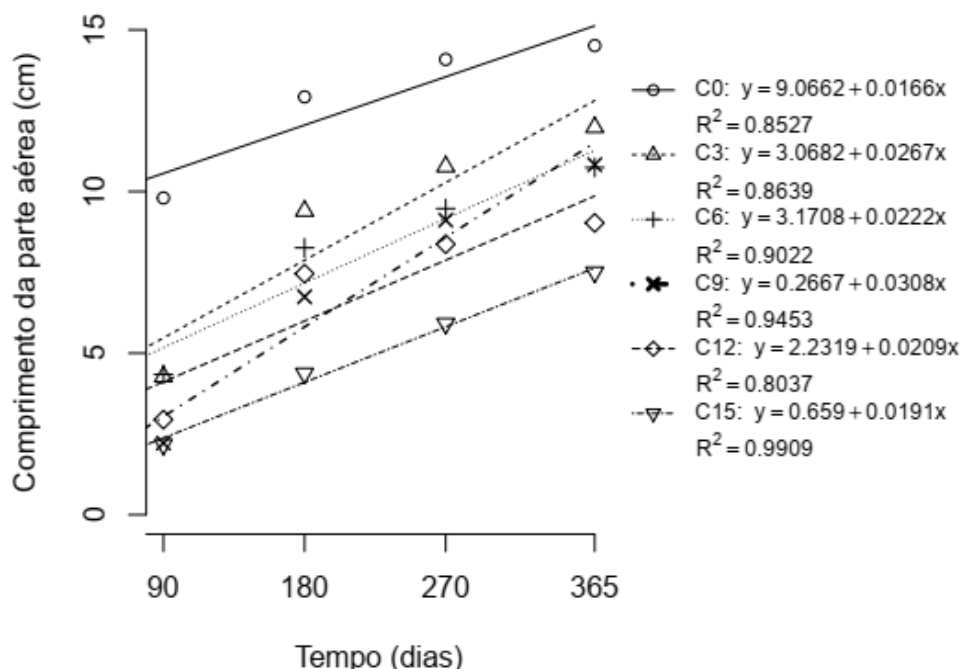


Figura 8 Comprimento da parte aérea de plantas de *A. sisalana* conservadas in vitro durante 365 dias em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol

O aumento do número de folhas foi proporcional ao tempo de cultivo, conforme modelo quadrático ascendente (Figura 10), indicando que há emissão de folhas durante todo período avaliado.

Observou-se redução no número de folhas verdes, com o aumento nas concentrações de PBZ, representado pelo modelo quadrático descendente, com menor emissão de folhas na concentração de 15,0 μM de PBZ (Figura 11). O PBZ pertence à classe dos triazóis que têm vários efeitos morfológicos nas folhas, dentre eles, a redução da área foliar, mas aumenta a cera epicuticular, largura e espessura (Fletcher et al. 2010; Gao et al. 1987) e, portanto, a massa seca das folhas por unidade de área é aumentada (Fletcher et al. 2010; Davis et al. 1988). Em *Syringa x hyacinthiflora*, o número de folhas verdes e a área foliar foi reduzida quando tratadas com paclobutrazol (Cui et al. 2009).

As folhas em *A. sisalana*, emitidas nos tratamentos com paclobutrazol, possuíam coloração verde escuro (Figura 9A) e, na concentração de 15,0 μM de PBZ, as folhas tinham aspecto mais espesso. Folhas com coloração verde escura podem ser indicativo do efeito estimulante de PBZ na diferenciação do

plastídeos e biossíntese de clorofila, bem como a prevenção de degradação de clorofila simultaneamente (Fletcher et al. 1982; Hazarika et al. 2000). Essas características também foram reportadas em *Syringa x hyacinthiflora* (Cui et al. 2009) e, *Dendrobium nobile* (Wen et al. 2013).



Figura 9 Plantas de *A. sisalana* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol em meio de cultura MS½: Plantas conservadas após 12 meses (A). Plantas hiperídricas (B). Brotos regenerados (C). Plantas aclimatizadas (D).

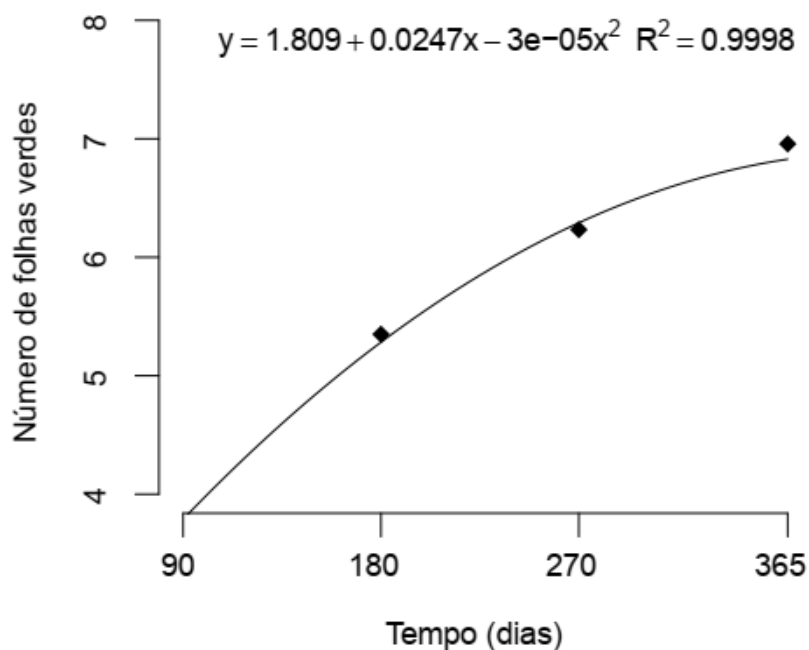


Figura 10 Número de folhas verdes de plantas de *Agave sisalana* conservadas in vitro durante 365 dias em meio de cultura MS½ suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

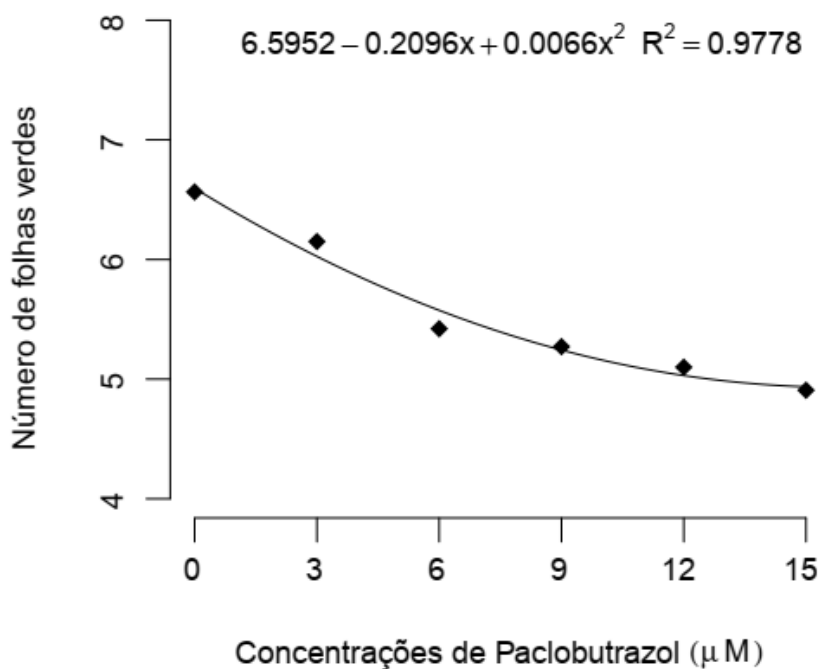


Figura 11 Número de folhas verdes de plantas de *Agave sisalana* conservadas in vitro em meio de cultura MS½ submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol após 12 meses de cultivo em diferentes concentrações de paclobutrazol.

O uso de PBZ promoveu o retardamento da senescência em folhas de *A. sisalana*. Em função do tempo, observou-se que o número de folhas senescentes aumenta com o tempo de cultivo, conforme o modelo linear crescente (Figura 12), observando início do processo de senescência a partir do terceiro mês de cultivo, no controle, e no sexto mês, em meio de cultura com PBZ. O menor número de folhas senescentes foi proporcional ao aumento das concentrações de PBZ. Na concentração de 15,0 μM de PBZ, o aparecimento de folhas senescentes foi menor (0,40) do que nas plantas mantidas em meio de cultura isento de PBZ (1,66), representado pelo modelo linear decrescente (Figura 13).

A senescência tardia, a coloração das folhas verde escura e folhas mais espessas são particularidades relacionadas à ação do PBZ, provavelmente devido ao aumento do nível endógeno de citocininas através de seu efeito secundário nas plantas (Fletcher et al. 2000), possibilitando maior alocação dos compostos intermediários da síntese de giberelinas, para a produção de maior quantidade de fitol, parte essencial da molécula de clorofila e responsável pelo aumento desta (Chaney, 2004) e ao aumento na atividade de enzimas oxidativas que impedem a maturação celular (Dewi et al. 2016).

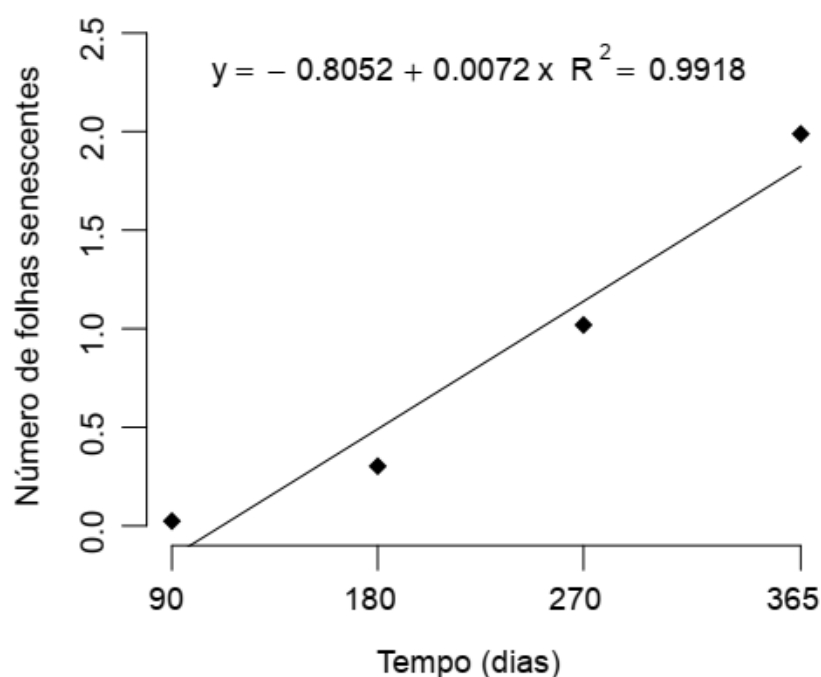


Figura 12 Número de folhas senescentes de *Agave sisalana* conservadas in vitro durante 365 dias em meio de cultura $\text{MS}\frac{1}{2}$ suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

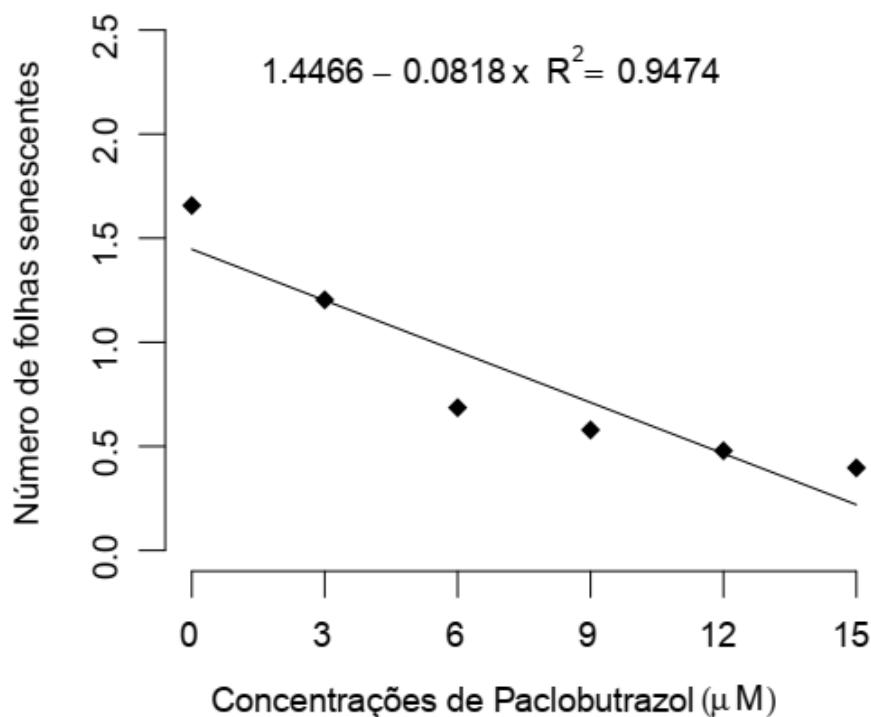


Figura 13 Número de folhas senescentes de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol após 12 meses de cultivo.

A maior emissão de brotos (3,71 brotos por explante) foi verificada na concentração de 15,0 µM de PBZ, efeito relacionado possivelmente ao aumento do nível endógeno de citocininas, resposta induzida pela adição de PBZ no meio de cultura. Esses brotos expressaram baixa porcentagem de folhas hiperídricas (15,86%) (Figura 9B), o que pode estar associado à produção de compostos antioxidantes e melhorias no aparato fotossintético promovidos pelo PBZ.

Foi observado o aumento na emissão de raízes, com o tempo de cultivo em todas as concentrações, conforme modelo linear crescente. Entretanto, a maior emissão de raízes (34,24) foi registrada no controle e o menor número de raízes (19,44) na concentração de 15,0 µM de PBZ (Figura 14). Conforme Davis et al. (1988), os reguladores da classe dos triazóis podem influenciar o crescimento da raiz, embora o efeito possa ser inibidor ou estimulador, dependendo da planta e da concentração utilizada.

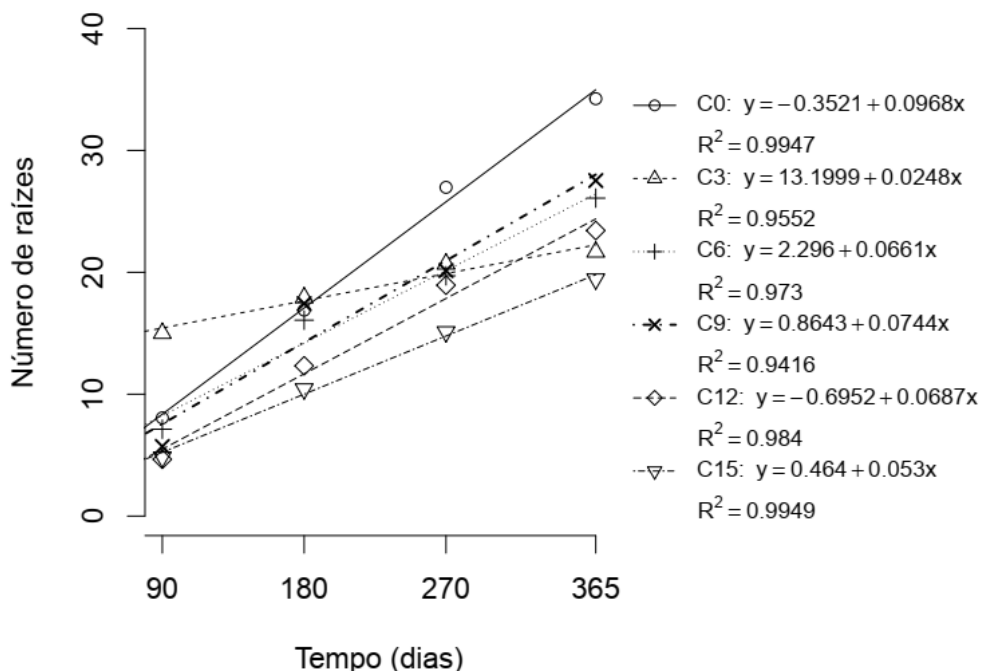


Figura 14 Número de raízes de plantas de *Agave sisalana* conservadas in vitro durante 365 dias em meio de cultura MS½ suplementado com diferentes concentrações de paclobutrazol.

Foi observado para variável massa fresca da parte aérea, a redução da biomassa com o aumento das concentrações, expressa pelo modelo quadrático descendente (Figura 15). Embora, na concentração de 15,0 µM de PBZ tenha sido registrada uma redução no comprimento dos brotos, para matéria seca da parte aérea não houve diferença estatística entre as concentrações, o que talvez esteja associado a emissão de folhas mais espessas. Embora, o aumento da concentração mostre uma menor emissão de raízes, verifica-se maior acúmulo de biomassa no tratamento com 15,0µM de PBZ, comportamento representado pelo modelo quadrático descendente (Figura 16 e 17), possivelmente devido as raízes apresentarem ramificações, característico da espécie que possui sistema radicular fasciculado.

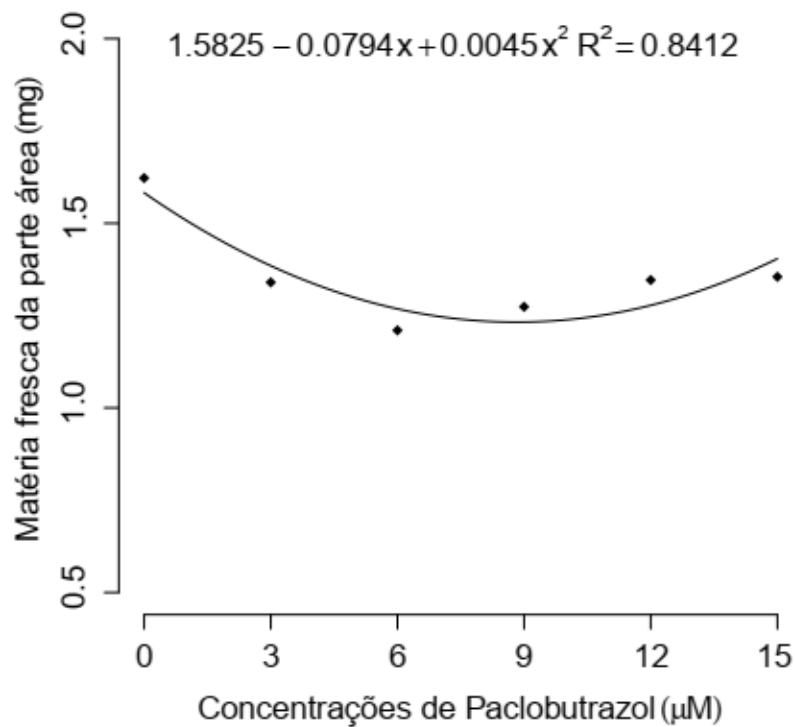


Figura 15 Matéria fresca da parte aérea de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol após 12 meses de cultivo.

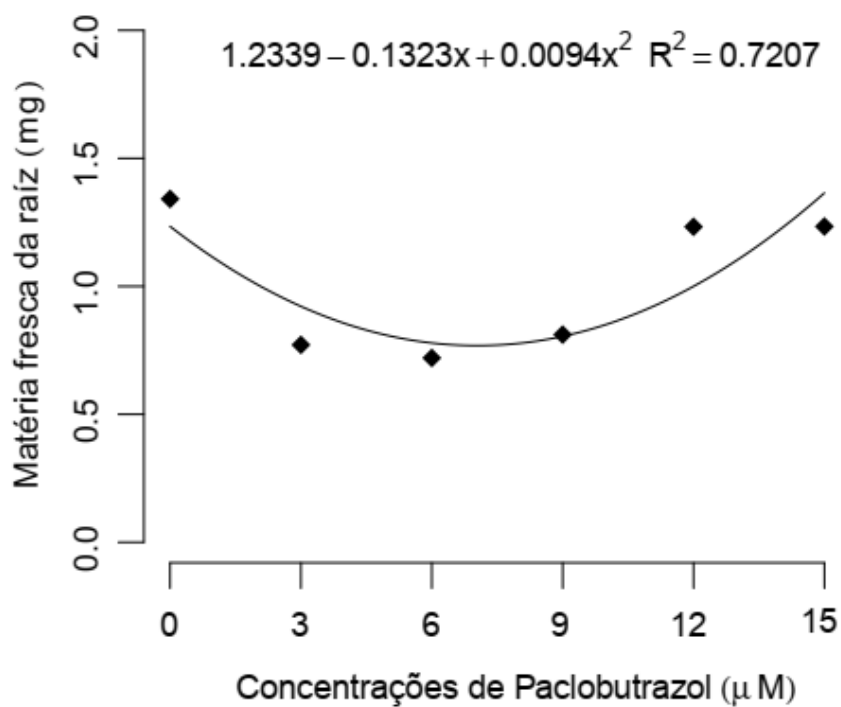


Figura 16 Matéria fresca da raiz de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol após 12 meses de cultivo.

O maior acúmulo de biomassa em raízes de *A. sisalana* está em concordância com os resultados verificados em *Dendrobium nobile* (Wen et al. 2013), *Syringa x hyacinthiflora* (Cui et al. 2009), com PBZ no meio de cultura. Os autores também relataram raízes significativamente mais grossas, entretanto, em *A. sisalana* não foram observadas raízes mais espessas.

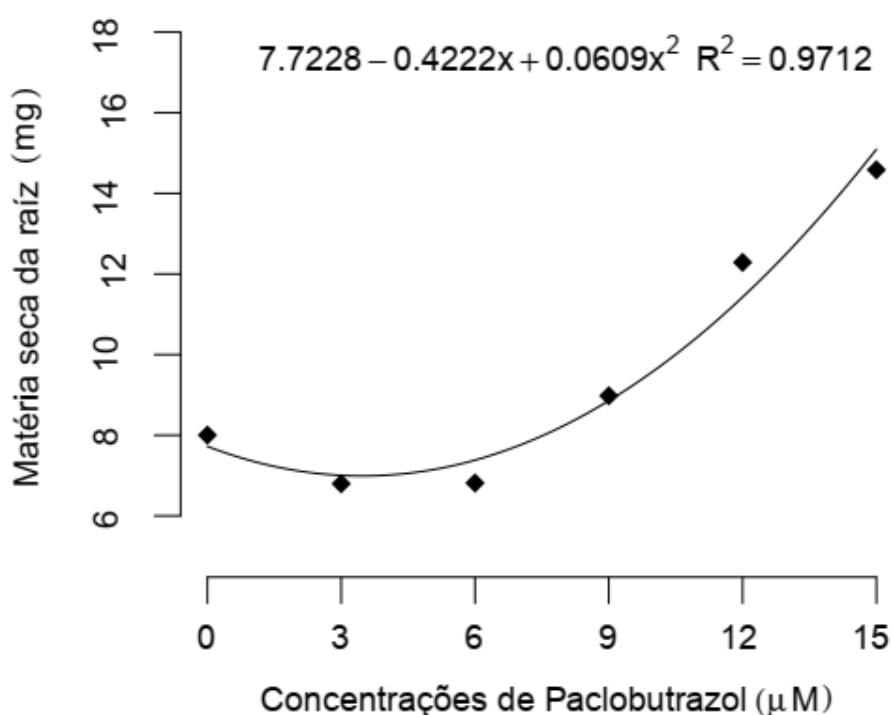


Figura 17 Matéria seca da raiz de plantas conservadas in vitro de *Agave sisalana* submetidas a diferentes concentrações de paclobutrazol após 12 meses de cultivo.

As plantas cultivadas em meio de cultura com PBZ foram regeneradas trimestralmente, não sendo verificado diferença estatística entre as concentrações e tempo de cultivo. Foi observado 100% de regeneração, permitindo afirmar que não ocorreu perda de viabilidade do explante para formação de novos indivíduos e retomada do crescimento (Figura 9C). Embora as avaliações tenham ocorridas com doze meses, a capacidade de regeneração foi mantida até o período de 24 meses para todas as concentrações, exceto para

o controle (87,0 mM de sacarose), pois todas as plantas senesceram. A sobrevivência e a manutenção da viabilidade de *A. sisalana*, mostrou ser possível a manutenção das plantas sem transferência ou subcultivo para novo meio de cultura ao utilizar o paclobutrazol, por um período superior a doze meses de cultivo.

As plantas regeneradas foram multiplicadas por três ciclos subsequentes. O número de brotos aumentou em razão dos subcultivos, obtendo a maior indução de brotos (229,83) no terceiro subcultivo, isso corresponde a um crescimento de 1.213,31% em relação ao primeiro subcultivo (17,50) (Figura 18). Esse excepcional crescimento no número de brotos torna claro que o paclobutrazol não interferiu no potencial propagativo da espécie, mantendo as células competentes para indução de morfogênese viável.

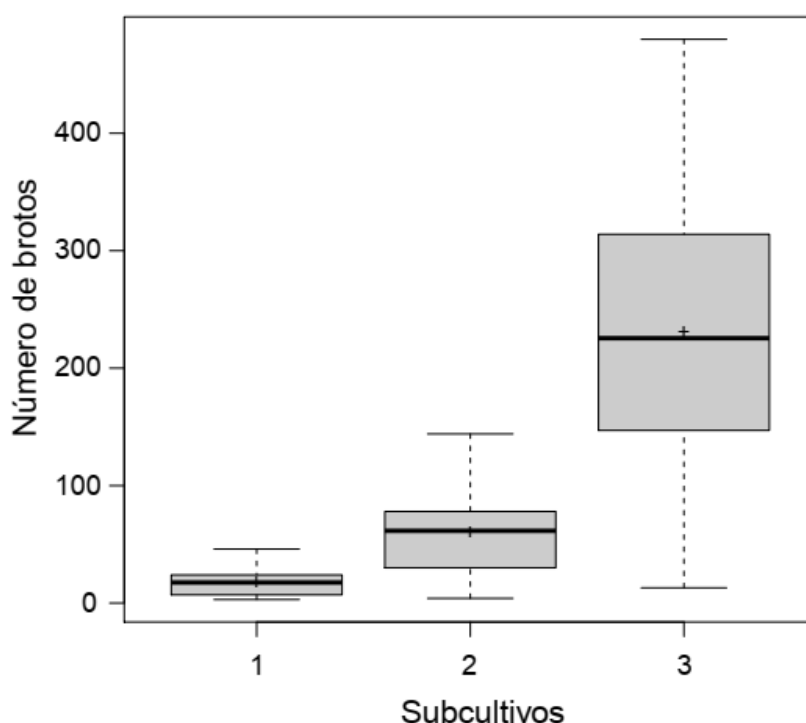


Figura 18 Número de brotos de plantas de conservadas in vitro de *Agave sisalana* em função dos subcultivos (S) submetidos a diferentes concentrações de paclobutrazol.

As plantas, após o terceiro subcultivo, foram enraizadas em meio isento de regulador, observando crescimento e formação de raízes em todas as plantas. Estas foram aclimatizadas e, após 90 dias, contatou-se 100% de

sobrevivência das plantas sem nenhuma anomalia (Figura 9D), indicando que o paclobutrazol pode ser utilizado para mantê-las em conservação *in vitro*, sem afetar seu desenvolvimento pós-cultivo *in vitro*.

A concentração de 15,0 μM de PBZ promoveu desaceleramento do metabolismo, implicando no crescimento mais lento, sem interferir na viabilidade e potencial morfogênico das plantas após um ano de cultivo *in vitro*. Em virtude de as plantas permanecerem viáveis após 24 meses, o protocolo gerado pode ser utilizado na manutenção da espécie em banco de germoplasma por um período superior a 12 meses.

Agradecimentos Os autores agradecem a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e o Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais pela infraestrutura cedida, à Capes pela concessão das bolsas de doutorado (DS 88882.441095/2019-01) ao primeiro autor (P.T.F), e Pós-Doutorado (PNPD 88882.315209/2019-01) ao segundo autor (C.F.N.), ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa e a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação da Bahia (SECTI) convenio (SECTI-UFRB 001/2013) pelo financiamento da pesquisa.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbarpour E, Imani A, Yeganeh SF (2017) Physiological and morphological responses of almond cultivars under *in vitro* drought stress. *Journal of Nuts*, 08:61-72. <http://dx.doi.org/10.22034/jon.2017.530393>.

Albany NR, Vilchez JÁ, Garcia Lis, Jiménez E (2005) Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83:357-361. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-005-6307-z>.

Anjum SA, Xie X, Wang L, Saleem MF, Man C, Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6:2026-2032

Aremu A.O, Bairu M W, Szüčová L et al (2012) The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated “Williams” bananas. *Journal of Plant Physiology* 169: 1530-1541.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.006>.

Ashmore SE (1997) Status Report on the Development and Application of In Vitro Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome

Pérez-Molphe-Balch E, Araiza MJE, Reyes MEP (2012) In vitro conservation of *Agave* spp. germplasm under slow growth conditions. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:279-287

Bello-Bello J, Poot-Poot W, Iglesias-Andreu L et al (2014) Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación in vitro de caña de azúcar. *Agrociencia* 48: 439-446

Botura, MB, Santos JDG, Silva GD et al (2013) In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology* 192:211-217.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.012>

Chaney WR (2004) Paclobutrazol: more than just a growth retardant. In: Pro-hortconference, Peoria, Illinois

Cortleven A, Noben JP, Valcke R (2011) Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science* 09:33.
<https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-33>

Davis TD, Steffens GL, Sankhla N (2011) Triazole plant growth regulators. Horticultural Reviews 63-105.

<http://dx.doi.org/10.1002/9781118060834.ch3>

Dewi K, Agustina RZ, Nurmalika F (2016) Effects of blue light and paclobutrazol on seed germination, vegetative growth and yield of Black Rice (*Oryza sativa* L. 'Cempo Ireng'). Biotropia 23:84-5. <http://dx.doi.org/10.11598/btb.2016.23.2.478>

Dobránszki J, Mendler-Drienyovszki N (2014) Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. Journal of Plant Physiology 171:1472-1478. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.015>

Dumschott K, Richter A, Loescher W et al (2017) Post photosynthetic carbon partitioning to sugar alcohols and consequences for plant growth. Phytochemistry 144:243-252.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.019>

El-Bahr, M.k, El Hamidb A.Abd, Matter MA et al (2016) In vitro conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 14:363-370.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.08.004>

FAO (2020) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS –FAOSTAT database.

<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>. Acesso em 07 de abril de 2020

Fletcher RA, Gilley A, Sankhla N, Davis TD (2010) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Horticultural Reviews 24:55-138.

<http://dx.doi.org/10.1002/9780470650776.ch3>

Fletcher RA, Gilley A, Sankhla, N et al (2000). Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticulture Reviews* 24: 55–137

Gao J, Hofstra G, Fletcher RA (1988) Anatomical changes induced by triazoles in wheat seedlings. *Canadian Journal of Botany* 66: 1178 - 1185.

<http://dx.doi.org/10.1139/b88-168>

George EF, Klerk GJ (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: George, E.F.; Hall, M.A.; Klerk, G-J (ed) *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3^o ed. Edition, Dordrecht: Springer, pp 65-114

Hazarika BN, Parthasarathy VA, Nagaraju V (2000). Paclobutrazol induced biochemical changes in microshoots of citrus species. *Folia Horticulturae* 12: 69-77

Hsiao, TC.; Xu, L-K (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* 51:1595-1616.

<http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/51.350.1595>.

IBGE (2017) Levantamento Sistemático de Produção Agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. *Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* 30:1-82

Kondhare KR, Hedden P, Kettlewell PS et al (2014) Use of the hormone-biosynthesis inhibitors fluridone and paclobutrazol to determine the effects of altered abscisic acid and gibberellin levels on pre-maturity α -amylase formation in wheat grains. *Journal of Cereal Science* 60: 210-216.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2014.03.001>

Kulaeva ON, Burkhanova EA, Karavaiko NN (2002) Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *Journal of Plant Physiology* 159: 1309-

1316. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00761>

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382

Maran JP, Priya B (2015) Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers* 115:732-738.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.058>

Marone, MP et al (2020). SISAL: de um passado rústico para um futuro brilhante. *O Semiárido Brasileiro e Suas Especificidades 2*. Editora: Atena Editora, 40-57. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.7042027055>

Monja-Mio et al (2019). Breeding Strategies to Improve Production of Agave (*Agave* spp.). *Advances In Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops*, [S.L.], 319-362. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_10.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nepomuceno, CF, Rios APS, Queiroz SROD et al (2009) Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. *Revista Árvore* 33: 481-490.
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622009000300010>

Nikam TD, Mulye KV, Chambhare MR et al (2019) Reduction in hyperhydricity and improvement in vitro propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 138:67-78.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-019-01603-9>

Pace PF et al (1999) Drought-induced changes in shoot and root growth of young cotton plants. *The Journal of Cotton Science* 3:183-187

Pacheco G, Simão MJ, Vianna MG et al (2016) In vitro conservation of *Passiflora* —A review. *Scientia Horticulturae* 211:305-311.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004>

Pérez-Molphe-Balch E, Esparza Araiza MJ, Pérez Reyes ME et al (2012) Conservación in vitro de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 279-287.

<http://www.scielo.org.mx/scielo.php?>

Pérez-Molphe-Balch E, Pérez-Reyes ME, Larosa-Carrillo MDL (2012) In vitro conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) under slow growth conditions. *Haseltonia*, 17:51-57. <http://dx.doi.org/10.2985/1070-0048-17.1.6>

Pérez-Zavala ML, Hernández-Arzaba JC, Bideshi DK, Barboza Corona JE (2020) Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100:5324-5333.

<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.10586>

Reed BM, Gupta S, Uchendu EE (2012) In vitro genebanks for preserving tropical biodiversity. *Conservation of Tropical Plant Species* 77-106.

http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3776-5_5

Reed BM, Sarasan V, Kane M et al (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47:1-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-010-9337-0>

Rios APS (2007) Estabelecimento, organogênese direta e aclimatização de sisal (*Agave sisalana* Perrine). Dissertação, Universidade Estadual de Feira de Santana

Rosa WS, Martins JPR, Rodrigues ES et al (2018) Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the in vitro multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133:339-350. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1385-x>

RStudio Team (2020) RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>

Sankar B, Karthishwaran K, Somasundaram R (2013) Leaf anatomical changes in peanut plants in relation to drought stress with or without paclobutrazol and abscisic acid. *Journal of Phycology* 5: 25-29

Santos MC, Léo AS, Léo CAS et al (2011) Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação in vitro de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agrônômica* 42:735-741. <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-66902011000300020>

Silva RL, Ferreira CF, Ledo CAS et al (2016) Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127:123-133. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-016-1035-0>

Soumya PR, Kumar P, Pal M (2017) Paclobutrazol: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant: a novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant. *Indian Journal of Plant Physiology* 22:267-278. <http://dx.doi.org/10.1007/s40502-017-0316-x>

Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Porto Alegre, Artmed

Turgeon R, Wolf S (2009) Phloem transport: Cellular pathways and molecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 60:207-221. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092045>

Zhang X, Liu L, Lin C (2014) Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. *Food Hydrocolloids* 39:10-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.012>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O estabelecimento in vitro de explante tTCLs a partir de pseudocaule de plantas dos genótipos *A. sisalana* e híbrido 11648 pode ser realizado diretamente em meio de cultura MS½ suplementado com 13,32 µM de BAP (meio de multiplicação in vitro), empregando somente álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (2,5% de cloro ativo) na desinfestação dos explantes originados de rebentos e bulbilhos.
2. A técnica tTCLs mostrou ser promissora para propagação dos genótipos, obtendo melhor resposta dos explantes nas posições AP e MI₁ para *A. sisalana* e AP, MI₁ e MI₂ para o híbrido 11648.
3. A multiplicação in vitro com quatro subcultivos, sendo realizados a cada 60 dias, em meio de cultura MS½ suplementado com 13,32 µM de BAP para ambos os genótipos é indicada para obtenção de mudas de qualidade e quantidade.
4. As plantas advindas do subcultivo in vitro podem ser enraizadas utilizando explantes com tamanhos de 30 mm de altura, sendo necessário o uso de AIB somente para o genótipo *A. sisalana*, na concentração 12 µM de AIB. As plantas aclimatizadas apresentaram-se bem adaptadas as condições ex vitro.
5. Para a conservação in vitro de *A. sisalana*, por um período de 12 meses, recomenda-se o agente osmótico manitol na concentração de 261 mM ou inibidor de crescimento paclobutrazol na concentração de 15 µM, obtendo taxa de sobrevivência de 100% após aclimatização.