

Indução de calos *in vitro* em diferentes explantes de sisal (*Agave sisalana* Perrine)¹.

Queiroz, Sandra Regina de Oliveira Domingos^{1,2}; Rios, Ana Paula de Souza^{1,3}; Carneiro, Fernando dos Santos^{1,4}; Lyra, Camila dos Santos^{1,4}; Santana, José Raniere Ferreira de^{1,5}.

¹Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Biologia, Unidade Experimental Horto Florestal, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), Av. Presidente Dutra, s/n, Santa Mônica, Feira de Santana, BA, CEP 44100-000; ² Bióloga, Dra. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora PRODOC/ DCR/ FAPESB/ CNPq/ UEFS, e-mail: sanqueiroz@ig.com.br; ³ Bióloga, Mestranda em Biotecnologia - UEFS, bolsista FAPESB, e-mail: riosbioap@yahoo.com.br; ⁴Graduandos do curso de Ciências Biológicas - UEFS, e-mails: fernandobramar@yahoo.com.br / camilasantoslyra@gmail.com; ⁵ Prof. Dr. – Depto Biologia - UEFS, e-mail- raniere@uefs.br.

INTRODUÇÃO

O sisal dá origem à principal fibra dura produzida no mundo, contribuindo com mais da metade da produção comercial de todas as fibras desse tipo. Sua exploração, no Brasil, concentra-se, no Nordeste, geralmente em áreas onde as condições de clima e solo são pouco favoráveis ou de escassas alternativas para a exploração de outras culturas que ofereçam resultados econômicos satisfatórios (EMBRAPA, 2003).

O sisal é propagado vegetativamente e de forma lenta, por bulbilhos e por rebentões. Os bulbilhos são produzidos no escapo floral, após a queda das flores, enquanto os rebentões se originam de rizomas subterrâneos emitidos pela planta –mãe (Silva *et al.*, 1999).

Devido a grande importância econômica desta espécie e da grande demanda de mudas, há necessidade de se acelerar o processo de propagação. Assim, a propagação *in vitro* utilizando bulbilhos como material vegetal pode ser uma técnica viável para o cultivo do sisal.

Estudos realizados na Índia demonstraram que plantas de *A. sisalana* podem ser propagadas *in vitro* com sucesso, tanto via embriogênese somática quanto via organogênese (Nikan, 1997; Hazra *et al.*, 2002a, Hazra *et al.*, 2002b).

O objetivo deste trabalho foi verificar qual melhor tipo de explante na indução de calos em sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Unidade Experimental Horto Florestal na Universidade Estadual de Feira de Santana-BA (UEFS).

Utilizou-se como material vegetal, bulbilhos de sisal estabelecidos *in vitro* de acordo com Queiroz *et al.* (2006). Utilizou-se três tipos de explantes: bases dos bulbilhos; folhas e raízes (Figura 1).

Empregou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com a metade da concentração de sais, solidificado com ágar (6,5 g/L), suplementado com sacarose (3%), com ANA (0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/L) e CIN (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L) sozinhos e em todas as combinações possíveis totalizando 20 tratamentos. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (121°C e 1,0 atmosfera por 15 minutos). Distribui-se 15 mL de meio de cultura em tubos de ensaio (150 x 25mm).

Após a inoculação, os tubos de ensaio foram mantidos durante 60 dias em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h, e radiação fotossintética ativa de $15 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas - frias.

O delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 x 5 (Explante x ANA x CIN), com 5 repetições, cada uma formada de 4 tubos.

Aos 60 dias avaliou-se a porcentagem de explantes com calos (%CA).

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey, através do uso do software Sisvar (Ferreira, 2003). Os dados de porcentagens foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\frac{X}{X+1}}$.



Figura 1. Diferentes tipos de explantes de sisal. A – base; B – folha e C – raiz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto o explante base como folha apresentaram excelentes respostas para calogênese. Os calos em geral tinham uma coloração verde clara e aspecto friável. Nas folhas houve grande formação de raízes (Figura 2), o que, segundo alguns autores não é desejável, pois prejudica a posterior regeneração da parte aérea (Scowcroft & Adamson, 1976; Mroginski & Kartha, 1981; Meijer & Broughton, 1981). Já os explantes raízes, apresentaram uma pequena porcentagem de calos e os mesmos escureceram rapidamente. Calos rizogênicos em sisal também foram observados por Nikam *et al.* (2003).

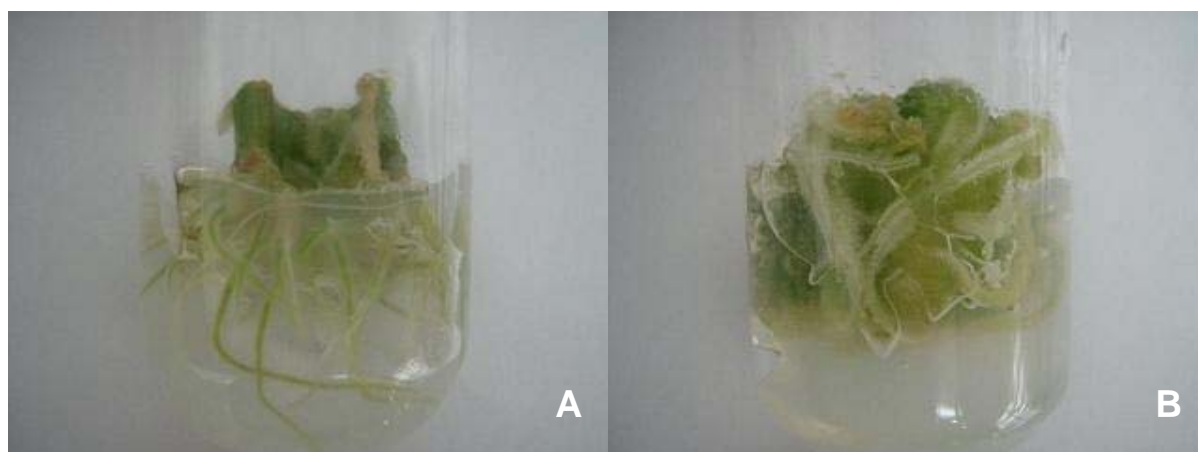


Figura 2. Folhas de bulbilhos de sisal. A e B – Indução de rizogênese.

Observou-se para dupla interação entre os explantes e ANA que tanto para base quanto para folha não houve diferenças entre as concentrações sendo que em média obteve-se mais de 70% de calos nesses explantes. Não houve indução de calos na ausência do regulador (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de porcentagem de calos para a dupla interação entre tipos de explantes e concentrações de ANA.

| Explantes | Concentrações de ANA (mg/L) | | | |
|-----------|-----------------------------|---------|---------|---------|
| | 0 | 0,25 | 0,5 | 1 |
| Base | 0,00bA | 70,67aA | 72,00aA | 73,33aA |
| Folha | 0,00bA | 78,67aA | 72,00aA | 73,33aA |
| Raiz | 0,00aA | 12,00aB | 8,10aB | 8,00aB |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha, e maiúscula na mesma coluna para cada tratamento, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Analisando-se os resultados obtidos para a tripla interação (CIN x ANA x EXP) verificou-se que independente das concentrações de ANA, os melhores resultados para o explante base, foram obtidos na concentração de 0,5mg/L de CIN, sendo que os valores variaram entre 80 e 100% de formação de calos e para o explante folha na concentração de 1,5 mg/L de CIN, os valores ficaram entre 93,33 e 100% (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios obtidos para a variável porcentagem de calos para a interação tripla entre os tratamentos: tipos de explante dentro de CIN e ANA em explantes de sisal.

| CIN | ANA | EXPLANTES | | |
|------|------|-----------|---------|--------|
| | | BASE | FOLHA | RAIZ |
| 0 | 0 | 0,00a | 0,00 a | 0,00 a |
| 0 | 0,25 | 53,33b | 86,67a | 13,33c |
| 0 | 0,5 | 60,00a | 60,00a | 6,67b |
| 0 | 1,0 | 86,67a | 86,67a | 13,33b |
| 0,25 | 0 | 0,00a | 0,00a | 0,00a |
| 0,25 | 0,25 | 80,00a | 60,00a | 0,00b |
| 0,25 | 0,5 | 53,33a | 26,67a | 35,71a |
| 0,25 | 1,0 | 60,00a | 40,00a | 6,67b |
| 0,5 | 0 | 0,00a | 0,00a | 0,00a |
| 0,5 | 0,25 | 86,67a | 73,33a | 13,33b |
| 0,5 | 0,5 | 80,00a | 100,00a | 0,00b |
| 0,5 | 1,0 | 100,00a | 80,00a | 13,33b |
| 1,0 | 0 | 0,00a | 0,00a | 0,00a |
| 1,0 | 0,25 | 80,00a | 80,00a | 33,00b |
| 1,0 | 0,5 | 80,00a | 73,33a | 0,00b |
| 1,0 | 1,0 | 40,00b | 66,67a | 0,00b |
| 1,5 | 0 | 0,00a | 0,00a | 0,00a |
| 1,5 | 0,25 | 53,33b | 93,33a | 0,00c |
| 1,5 | 0,5 | 86,67a | 100,0a | 0,00b |
| 1,5 | 1,0 | 80,00a | 93,33a | 6,67b |

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

Binh *et al.* (1990), estudando espécies de Agave, verificaram uma intensidade mínima na indução de calos, quando utilizaram os hormônios CIN e ANA. Já em nosso estudo observou-se que a presença de ANA e CIN se faz necessária para a indução de calos em explantes de bulbilhos de sisal. Verificou-se também que as concentrações de cinetina utilizadas não inibiram a formação de raízes nos explantes (Dados não mostrados).

A melhor média para indução de calos dentro dos tratamentos de CIN associados ao ANA foi obtida na concentração de ANA (1mg/L) + CIN (0,5 mg/L). Resultados semelhantes foram encontrados por Nikam *et al.* (2003), que induziram calos dos bulbilhos de sisal em meio MS suplementado com ANA (0,25 – 1mg/L) + CIN (1 - 2 mg/L).

CONCLUSÃO

Para a obtenção de calos em sisal faz-se necessário o uso de reguladores de crescimento;

Segmentos da base de bulbilhos de sisal apresentaram maior formação de calos que segmento foliar e radicular, sendo considerados como ótimos explantes para a indução de calos em *Agave sisalana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BINH, L. T.; MUOI, L. T.; OANH, T. D.; THANG & PHONG, T. D. Rapid propagation of agaves *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Vol. 23, 1990.

EMBRAPA. Informações gerais sobre o sisal. Disponível em: <<http://www.cnpa, Embrapa.br/>> Acesso em: 13 de outubro de 2003.

FERREIRA, D. F. **SisVar – Versão 4.3**. DEX/UFLA- Lavras-MG, 2003.

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

HAZRA, S. K.; SUDRIPTA. D.; DAS, A. K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Agave sisalana* Perr. Ex Engelm. **Phytomorphology**, v. 70, n. 2-3, p. 217-222, 2002b.

MEIJER, E.G.M.; BROUGHTON, W.J. Regeneration of whole plants from hypocotyl-, root-, and leaf-derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. **Physiologia Plantarum**, 52 (2), p. 280-284, 1981.

MROGINSKI, L. A.; KARTHA, K. K. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Century) plants by in vitro culture of immature leaflets. **Plant Cell Reports**, v.1, n. 2. p. 64-66, 1981.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, 15: 473-497, 1962.

NIKAM, T. D. High frequency shoot regeneration *Agave sisalana*. **Plant Cell Tissue and Organ culture**. Dordrecht, v. 51, n.3, p. 225-228, nov., 1997.

NIKAM, T. D.; BANSUDE, G. M.; ANEESH KUMAR, K. C. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). **Plant Cell Report**. New York, v.22, n.3, p.188-194, out., 2003.

QUEIROZ, S. R. O. D.; RIOS, A. P. S. ; OSUNA, J. T. A.; SANTANA, J. R. F. Estabelecimento *in vitro* de sisal (*Agave sisalana* Perrine) I. Controle da contaminação e da oxidação. **Magistra**, V. 18, n. 3, Julho/Set, p. 130-139, 2006.

SCOWCROFT, W. R.; ADANSON, J. A. Organogenesis from callus cultures of the legume *Stylosanthes hamata*. **Plant Science Letters**, 7, 39-42, 1976.

SILVA, O. R. R. F.; CARVALHO, O. S.; RAMOS, E. S. B. Cultivo do Sisal no Nordeste. In: SILVA, O. R. R. F; BETRÃO, N. E. M. **O Agronegócio do Sisal no Brasil**. Brasília, EMBRAPA-SPI; Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999, p. 53-92.

PALAVRAS – CHAVE : *Agave sisalana* Per.; Calogênese; Rizogênese.

Agradecimentos: FAPESB (apoio financeiro e bolsas); CNPq (bolsas).