

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).

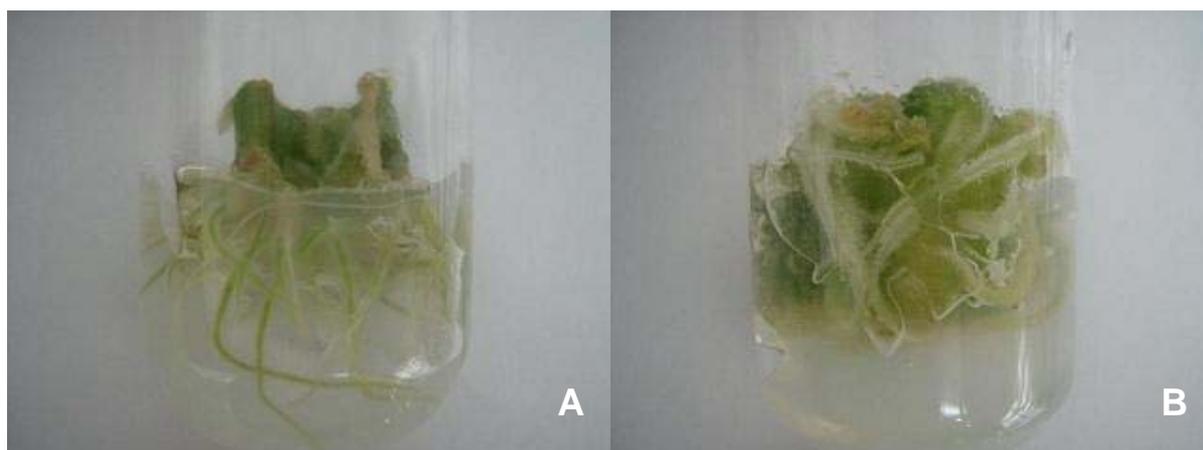


Figura 2. Folhas de bulbilhos de sisal. A e B – Indução de rizogênese.

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).