

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

FLÁVIA MONIQUE DA SILVA SALES

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE REBENTOS DE SISAL

**CAMPINA GRANDE – PB
AGOSTO, 2012**

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE REBENTOS DE SISAL

FLÁVIA MONIQUE DA SILVA SALES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE – PB
AGOSTO DE 2012

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE REBENTOS DE SISAL

FLÁVIA MONIQUE DA SILVA SALES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de concentração Biotecnologia e Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho

**CAMPINA GRANDE – PB
AGOSTO DE 2012**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

S163m Sales, Flávia Monique da Silva.
Morfogênese in vitro de rebentos de sisal
[manuscrito] / Flávia Monique da Silva Sales. – 2012.
48 f. : il. color.

Digitado
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias),
Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade
Estadual da Paraíba, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Julita Maria Frota Chagas
Carvalho, Embrapa Algodão”

1. Sisal. 2. *Agave sisalana*. 3. Fitorreguladores.
4. Genética vegetal. I. Título.

21. ed. CDD 633.577

MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE REBENTOS DE SISAL

FLÁVIA MONIQUE DA SILVA SALES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de concentração Biotecnologia e Melhoramento Genético de Plantas.

Aprovada em ____ de Agosto de 2012

Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Humberto Actis Zaidan (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UFCG/
CDSA/ UATEC - Sumé**

Dr^a. Liziane Maria de Lima (D.Sc., Biologia Molecular) Embrapa Algodão

**Dr^a. Julita Maria Frota Chagas Carvalho (D.Sc., Recursos Fitogenéticos) – Embrapa
Algodão
Orientadora**

A meu pai Josenilson, pelo grande empenho na construção de meu ser e, sobretudo por acreditar em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, coragem e perseverança, que me permitiu vencer todos os obstáculos e realizar mais um sonho.

À Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho, pela confiança e pelo incentivo constante, inclusive nos momentos mais difíceis. Obrigada, pela valiosa transmissão de conhecimento, pelo apoio, amizade, paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Alberto Soares de Melo, pelo auxílio estatístico na execução deste trabalho e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Humberto Actis Zaidan e à Dra. Liziane Maria de Lima por gentilmente aceitarem participar da banca de defesa deste trabalho.

Ao meu amado pai Josenilson e sua esposa, por acreditarem mais uma vez em meu sonho, permanecendo ao meu lado, não me deixando fraquejar em um só momento. Obrigada, meu pai, pelo grande exemplo de pessoa que és, o espelho para a construção do meu ser.

Ao meu noivo, Thassio, pelas constantes palavras de incentivo, apoio e compreensão e, sobretudo, pelo amor e dedicação em todos os momentos. Obrigada, meu amor, por fazer parte da minha vida.

A meus irmãos, Lucas e Fabricia, pela força, confiança e carinho.

Aos companheiros de laboratório: Taíza, Akylla, Raquel e Jéssica, pelos momentos descontraídos, atenção e carinho. Obrigada por me receberem tão bem e auxiliarem nesta nova caminhada.

Aos funcionários do Laboratório de Cultivo de Tecidos da Embrapa Algodão, Dione e seu Amaro, pelo auxílio na execução dos meus experimentos.

Aos colegas de mestrado, especialmente a Elizandra, Vandré, Lucimara, Marcelo e Fabianne, pelo apoio constante.

À Universidade Estadual da Paraíba, à Embrapa Algodão e a todos os docentes da Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela constante transmissão de conhecimento.

À Capes, pela concessão de bolsa durante a execução do mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo geral	15
1.2 Objetivos específicos	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A podridão do colo	16
2.2 Cultura de tecidos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Definição de protocolo de desinfestação	21
3.2 Indução do superbrotamento de rebentos de sisal	22
3.3 Ensaio de enraizamento	24
3.4 Aclimatização	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Definição de protocolo de desinfestação	25
4.2 Indução ao superbrotamento de sisal utilizando TDZ e ANA	29
4.3 Indução ao superbrotamento de sisal utilizando diferentes combinações de BAP e ANA	34
4.4 Ensaio de enraizamento <i>in vitro</i>	40
5. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos a serem utilizados na desinfestação de rebentos de sisal	21
Tabela 2 – Descrição dos tratamentos utilizados para indução ao superbrotamento de sisal utilizando-se diferentes combinações de TDZ e ANA.....	22
Tabela 3 – Descrição dos tratamentos utilizados para indução ao superbrotamento de sisal utilizando diferentes combinações de BAP e ANA	23
Tabela 4 – Descrição dos tratamentos utilizados para o enraizamento dos brotos de sisal.	24
Tabela 5 – Análise de variância considerando-se a contaminação bacteriana em explantes de sisal.	26
Tabela 8 – Efeito de diferentes concentrações do antibiótico Citrofloxacino com o fungicida Baytan [®] na descontaminação de rebentos de sisal, referentes ao número médio de rebentos contaminados por fungos em diferentes períodos de avaliação	28
Tabela 9 – Análise de variância considerando-se a relação TDZ/ ANA e destes em relação ao tempo para o número de brotos por explantes de sisal.	30
Tabela 10 – Efeito do TDZ e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal referente ao número médio de brotos (NMB) em diferentes períodos de avaliação	31
Tabela 11 – Análise de variância considerando-se a relação TDZ/ ANA e desses quanto ao tempo para o tamanho de brotos por explantes de sisal.	32
Tabela 12 – Efeito do TDZ e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal, referente ao tamanho médio dos brotos (TMB) em diferentes períodos de avaliação	32
Tabela 13 – Análise de variância considerando-se a relação BAP / ANA e desses em relação ao tempo para o número de brotos por explantes de sisal	35
Tabela 14 – Efeito do BAP e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal, referente ao número médio de brotos (NMB) em diferentes períodos de avaliação	36
Tabela 15 – Efeito do BAP e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal, referente ao tamanho médio dos brotos (TMB) em diferentes períodos de avaliação.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Rebento de híbridos de sisal de 20 cm de comprimento utilizado como fonte doadora de explante. (B) Rebentos de híbridos de sisal após a retirada das folhas para utilização no cultivo <i>in vitro</i>	20
Figura 2 – Explantes de sisal em diferentes etapas do processo de desinfestação. (A) Explante 7 dias, após o processo de desinfestação; (B) Explante com contaminação fúngica, 15 dias após o processo de desinfestação; (C) Explante com contaminação bacteriana, 7 dias após o processo de desinfestação; (D) Explante sadio 30 dias após o processo de desinfestação.....	25
Figura 3 – Taxa de contaminação dos explantes de sisal, utilizando-se diferentes concentrações de fungicida e antibiótico.....	29
Figura 4 – Efeito do TDZ associado ao ANA em diferentes concentrações no número de brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.....	30
Figura 5 – Multibrotações em explantes de sisal utilizando-se 10,0 mg.L ⁻¹ TDZ + 0,1 mg.L ⁻¹ ANA aos 105 dias de cultivo.	31
Figura 6 – Efeito do TDZ associado ao ANA em diferentes concentrações no tamanho dos brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.	33
Figura 7 – Efeito do BAP associado ao ANA em diferentes concentrações no número de brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.....	35
Figura 8 – Efeito do BAP associado ao ANA em diferentes concentrações no tamanho dos brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.	36
Figura 9 – Explantes de sisal cultivados em meio suplementado com BAP e ANA ao longo do período de cultivo: (A) 35 dias de cultivo, (B) 70 dias de cultivo e (C) 105 dias de cultivo	38
Figura 10 – Comparativo entre os diferentes fitorreguladores utilizados (BAP e TDZ), associados a concentrações semelhantes de ANA, em relação ao número de brotos (NB) por explantes de sisal	39
Figura 11 – Comparativo entre os diferentes fitorreguladores utilizados (BAP e TDZ), associados a concentrações semelhantes de ANA, em relação ao tamanho dos brotos (TB) por explantes de sisal.....	40
Figura 12 – Explantes de sisal em meios de enraizamento suplementados com AIA e AIB em diferentes concentrações após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sendo: (A) Isento de fitorreguladores; (B) 0,25 mg.L ⁻¹ AIB; (C) 0,50 mg.L ⁻¹ AIB; (D) 0,25 mg.L ⁻¹ AIA; (E) 0,50 mg.L ⁻¹ AIA	41
Figura 13 – Número médio de raízes por explante de sisal	41
Figura 14 – Tamanho médio de explante de sisal em meio de enraizamento	42
Figura 15 – Aclimatização de plântulas de sisal, após período de enraizamento	43

RESUMO

SALES, Flavia Monique da Silva. M.R.S. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, Agosto, 2012. **Morfogênese in vitro de rebentos de sisal.** Julita Maria Frota Chagas Carvalho.

O sisal (*Agave sisalana*) é conhecido em todo o mundo pelo seu alto teor de fibras, as quais são amplamente utilizadas na fabricação de utensílios, na indústria automotiva, na indústria química e na construção civil. Esta monocotiledônea possui grande importância econômica para diversos países, incluindo o Brasil, o qual é considerado o maior produtor e exportador de sisal do mundo. No entanto, alguns fatores podem inviabilizar o desenvolvimento desta cultura, a exemplo de doenças como a antracnose e a podridão do colo. Visando à obtenção de mudas saudáveis e livres de patógenos, buscou-se, com este trabalho definir um protocolo eficiente para a desinfestação de rebentos de sisal, bem como induzir o superbrotamento *in vitro* a partir da utilização dos fitorreguladores N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ylureia (TDZ) e 6-benzilaminopurina (BAP) em diferentes combinações com o Ácido naftaleno acético (ANA) e definir um protocolo de enraizamento *in vitro*. Para o ensaio de desinfestação os rebentos foram submetidos a soluções com diferentes concentrações do fungicida Baytan® e do antibiótico citrofloxacino combinados e em seguida cultivados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Foram realizadas avaliações aos 7, 15 e 21 dias após o cultivo, para análise da taxa de contaminação bacteriana e fúngica; para os ensaios de indução ao superbrotamento foram utilizados meio MS suplementado com TDZ e ANA (ensaio 1), e meio MS suplementado com BAP e ANA (ensaio 2) em diferentes concentrações. Em ambos os ensaios foram realizadas avaliações aos 35, 70 e 105 dias após o cultivo, considerando-se o número de brotos (NB) por explante e o tamanho dos brotos (TB). Para o enraizamento *in vitro* foram utilizados meio MS suplementado com os fitorreguladores ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB), bem como livres de qualquer fitorregulador. Ao final dos 30 dias de cultivo avaliou-se o tamanho do explante e o número de raízes. Observou-se, portanto, que a utilização de 0,5% do fungicida Baytan® associado a 1% do antibiótico citrofloxacino foi mais eficiente na descontaminação de explantes de sisal. Quando se considerou a indução à morfogênese, a melhor combinação de TDZ e ANA foi 10 mg.L⁻¹ e 0,1 mg.L⁻¹ respectivamente. Já quando utilizados os fitorreguladores BAP e ANA, as concentrações de 12,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA foram as mais indicadas para a indução ao superbrotamento de explantes de sisal. No enraizamento *in vitro*, a utilização de fitorreguladores é dispensável uma vez que o surgimento de raízes ocorreu independente da sua utilização.

PALAVRAS-CHAVE: Superbrotamento. Fitorreguladores. *Agave sisalana*

ABSTRACT

SALES, Flavia Monique da Silva. M.R.S. State University of Paraíba / Embrapa Cotton, August, 2012. **In vitro morphogenesis of shoots sisal.** Julita Maria Frota Chagas Carvalho.

The sisal (*Agave sisalana*) is known worldwide for its high fiber content, which are widely used in the manufacture of utensils, in the automotive industry, chemical industry and construction. This monocot has great economic importance for many countries, including Brazil, which is considered the largest producer and exporter of sisal in the world. However, some factors may prevent the development of this culture, such diseases as anthracnose and stem rot. In order to obtain seedlings healthy and free of pathogens it was sought to with this work define an efficient protocol for the disinfection of shoots sisal, as well as induce the overbudding in vitro from the use of growth regulators N-phenyl -N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylureia (TDZ) and 6-benzylaminopurine (BAP) in different combinations with naphthalene acetic acid (NAA) and define a protocol for in vitro rooting. For the testing of disinfestation the shoots were subjected to solutions with different concentrations of the fungicide Baytan citrofloxacino ® and antibiotics and then cultured on MS medium (Murashige & Skoog, 1962). Evaluations were done at 7, 15 and 21 days after cultivation, to analyze the rate of bacterial and fungal contamination, for the tests to induce multiple shoots were used MS medium supplemented with TDZ and NAA (test 1) and MS medium supplemented with BAP and NAA (test 2) in different concentrations. In both tests were evaluated at 35, 70 and 105 days after culture, considering the number of bud (NB) per explant and the size of bud (TB). For in vitro rooting were used MS medium supplemented with growth regulators indole-3-acetic acid (IAA) and butyric acid (IBA), and free of any plant regulator. At the end of 30 days of culture was evaluated the size of the explant and the number of roots. It was found the use of 0.5% of fungicide Baytan® associated 1% of antibiotic citrofloxacino was more efficient in decontaminating explants sisal. When we consider the induction of morphogenesis, the best combination of TDZ and NAA was 10 mg.L⁻¹ and 0.1 mg l⁻¹ respectively. Already when we used the growth regulators BAP and NAA concentrations of 12.0 mg l⁻¹ BAP and 0.1 mg l⁻¹ NAA were most suitable for induction of multiple shoots from explants of sisal. In rooting, the use of growth regulators may be dispensed once the emergence of root occurred regardless of their use.

KEYWORDS: Overbudding, Phytohormones, *Agave sisalana*

1. INTRODUÇÃO

O sisal, planta pertencente à classe monocotiledônea, família Agavaceae, tem sua origem na América Central, na região da península de Yucatã, no México, sendo caracterizada pela presença de folhas grandes dispostas em espiral, que variam de 1,0 a 2,0 metros de comprimento e que resultam em fibras de até 1,20 m de comprimento. Suas propriedades são conhecidas desde as épocas mais remotas, pelos primitivos habitantes desta região, que utilizavam suas preciosas fibras para a fabricação de diversos utensílios como tapetes, redes e cordas, dentre outros (SILVA & BELTRÃO, 1999). Atualmente, a fibra do sisal vem ganhando espaço também no campo industrial fornecendo compostos para a indústria automobilística, de móveis, eletrodomésticos, construção civil e para a indústria química como matéria-prima para a produção de ceras, gorduras, álcool, glicosídeos e adubos, entre outros compostos (GONDIM & SOUZA, 2009).

A reprodução de *Agave sp.* pode ocorrer de forma sexuada, por meio de sementes, ou de forma assexuada, por bubilhos ou, ainda, por ramificações dos rizomas (rebentos). Os bubilhos são pequenas plantas que se originam nos pendões florais após a queda das flores e que, em contato com o solo, se desenvolvem dando origem a uma nova planta enquanto os rebentos nascem ao lado da planta-mãe, a ela se mantendo ligada por meio de estolões. Tanto os bubilhos quanto os rebentos apresentam a mesma constituição genética da planta-mãe, o que pode ser uma desvantagem do ponto de vista fitopatológico, uma vez que podem aumentar a probabilidade de doenças genéticas ou adquiridas (ABREU, 2010).

O sisal possui grande adaptabilidade às regiões semiáridas caracterizadas por altas temperaturas e baixo índice pluviométrico (entre 600 e 1.500 mm anuais). Sendo, então, consideradas plantas com elevado grau de xerofilismo e dotadas de mecanismo fisiológico do tipo CAM (Crassulacean Acid Metabolism), as quais mantêm seus estômatos fechados durante o dia a fim de evitar a perda de água para o ambiente, fixando CO₂ à noite e reduzindo assim o gasto energético e potencializando o mecanismo fotossintético.

A introdução do sisal no Brasil ocorreu por volta de 1903; no entanto, apenas na década de 30 foi aplicado como cultura nos estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, tornando a região Nordeste a principal responsável pela concentração da cultura sisaleira no País (SILVA & BELTRÃO, 1999). Em 1946, o Brasil tornou-se excelência como exportador de sisal do mundo.

Nas décadas de 1960 e 1970 a cultura sisaleira teve seu apogeu econômico, tornando o estado da Bahia o principal produtor brasileiro, seguido da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Ceará (SILVA & BELTRÃO, 1999). Atualmente, a Bahia é responsável por 96,2% da produção da fibra nacional, cujo cultivo atinge cerca de 270 mil hectares distribuídos em 75 municípios, com uma produção média de 1.200 kg/há, enquanto a Paraíba é responsável por 3,2% da produção total de sisal do País, possuindo cerca de 9 mil hectares de área plantada (BRASIL, 2011).

O cultivo de sisal no Brasil é baseado na agricultura familiar, o que permite a geração de renda e emprego para cerca de 600 mil pessoas, gerando mais de 80 milhões de dólares (por ano) em divisas para os estados produtores (CARVALHO & SENA, 2008). Em 2011 a produção de fibra de sisal atingiu cerca de 267 mil toneladas (IBGE, 2011), sendo grande parte desta produção (cerca de 80%) exportada para países como Estados Unidos, China, México e Portugal.

Deste modo, o desenvolvimento de técnicas que facilitem a propagação desta agavácea é de fundamental importância para o progresso econômico das regiões produtoras.

1.1 Objetivo geral

Induzir o superbrotamento *in vitro* a partir de rebentos de sisal (*Agave sisalana*) provenientes da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, por meio de técnicas de micropropagação.

1.2 Objetivos específicos

- Definir um protocolo eficiente de desinfestação de rebentos de sisal para o cultivo *in vitro*;
- Avaliar os efeitos dos fitorreguladores 6-benzilaminopurina (BAP) e N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ylureia (TDZ) em diferentes combinações com o ácido naftaleno acético (ANA) afim de estabelecer um protocolo de multiplicação de sisal *in vitro*;
- Definir um protocolo de enraizamento de brotos de sisal *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A podridão do colo

Apesar da grande relevância econômica do sisal para o Brasil, sobretudo para estados da região Nordeste, alguns fatores podem interferir no desenvolvimento desta cultura, a exemplo de doenças como a Antracnose e a podridão do colo, as quais são em geral provocadas por fungos como *Colletotrichum agaves* Cavo; *Aspergillus niger*; *Botryodiplodia theobromae* Pato (LIMA et al, 1998), ameaçando então a sustentabilidade econômica da cultura sisaleira.

No Brasil, a podridão do colo foi relatada pela primeira vez por volta dos anos 50, em lavouras localizadas no estado da Paraíba, causada por infecções de *B. theobromae* (LIMA et al, 1998); no entanto, relatos desta doença também foram feitos em lavouras na Venezuela.

Atualmente, a podridão do colo é a doença que mais afeta as plantações de sisal em nosso país, com incidência em até 40% das plantas cultivadas nas lavouras (ALVES et al, 2004); apesar disto, esta doença também pode afetar culturas como a cana-de-açúcar, café, citrus, mamão, banana, seringueira, cacau, amendoim e algodão (LIMA et al, 1998). Este mal provoca o amarelecimento e a murcha das folhas, tal como também o escurecimento dos tecidos internos, impossibilitando o aproveitamento da planta, podendo até resultar na morte do organismo vegetal que, segundo Sá (2009), pode ocorrer em até 15 dias depois da inoculação do agente causador. A infecção ocorre a partir dos tecidos lesionados, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo as ferramentas de trabalho no campo os principais mecanismos de transmissão; no entanto, a infecção também pode ocorrer em função da reprodução assexuada das plantas, onde os rebentos originados da planta-mãe em contato com o solo contaminado também podem adquirir a doença.

De acordo com Coutinho et al (2006), outros dois fungos podem atuar como patógenos da doença: *Pythium aphanidermatum* e *Lasiodyplodia theobromae*. Todos os agentes causadores da doença podem estar presentes nos solos, o que dificulta ainda mais o controle da doença.

Distúrbios fisiológicos decorrentes da carência de alguns nutrientes no solo como o potássio e o cálcio, podem ainda favorecer o desenvolvimento de doenças fúngicas como a

podridão do cepo, visto que torna a planta mais frágil e susceptível a infecções (SALGADO & AZZINI, 1982). Fatores como estresse hídrico ou nutricional também podem tornar os tecidos vegetais mais susceptíveis a infecções (ABREU, 2010), uma vez que o patógeno possui baixa capacidade de penetração, utilizando da sensibilidade fisiológica da planta para penetrar nos tecidos vegetais e só então causar a doença.

Não existem medidas paliativas a serem adotadas para as plantas infectadas pelo fungo, em virtude disto são recomendadas medidas, como a queima e a extração das plantas contaminadas (SILVA et al., 2008), além da utilização de mudas saudáveis. Assim, torna-se relevante o desenvolvimento de técnicas que potencializem e permitam a obtenção de mudas saudáveis livres de agentes patogênicos a fim de um aproveitamento melhor da cultura sisaleira, destacando-se, entre estas, a cultura de tecidos, técnica amplamente empregada na obtenção de mudas saudáveis e livres de patógenos em um curto espaço de tempo.

2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos é um ramo da biotecnologia que visa selecionar e multiplicar plantas com características agronomicamente desejáveis, com base na totipotência celular (CARVALHO & SENA, 2008), visando fornecer, ao produtor, mudas de alta qualidade, visto que se conservam as características do material selecionado (ROSALES et al, 2008).

A utilização da micropropagação de tecidos vegetais oferece inúmeras vantagens para a prática agrícola, como maior rapidez na obtenção de grande número de mudas e erradicação de pragas e doenças (RODRIGUES et al, 2009), além de ser relevante para a produção de espécies cujo ciclo reprodutivo é muito longo, como o sisal.

A constante melhora dos protocolos de multiplicação *in vitro* e o alto controle de qualidade das mudas produzidas, atrelados à redução dos custos de produção no campo (diminuição da utilização de inseticidas e de outros insumos) facilitam a aceitação das mudas produzidas em laboratório pelo mercado (LIMA & MORAES, 2006), viabilizando, assim, a produção das fibras de sisal e um aproveitamento maior do produto, tanto na agricultura como na indústria de construção civil, farmacêutica e química.

O sucesso da regeneração *in vitro* depende, entretanto, de vários fatores, como: desinfestação, genótipo, tipo, idade e tamanho dos explantes, composição dos meios de cultura, condições de cultivo e tipos e dosagens de reguladores de crescimento adicionados ao meio, os quais, de acordo com Silva et al. (2008), são considerados os principais controladores da morfogênese *in vitro*. Os meios de cultivo fornecem substâncias essenciais ao crescimento

vegetal e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Neste processo, as vias bioquímicas e metabólicas básicas são conservadas; no entanto, mecanismos como a fotossíntese podem ser inativados pelas condições de cultivo ou pelo estágio de diferenciação celular (CARVALHO & ROCHA, 2006). A composição desses meios é baseada nas exigências orgânicas e minerais das plantas, as quais buscam juntamente com as substâncias biossintéticas, suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais.

Dentre os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* se destaca o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), comumente empregado para a indução e formação de brotos meristemáticos e composto por macro e micronutrientes, bem como vitaminas, fonte de carbono, suplementos orgânicos, como água de coco e fitorreguladores. De acordo com Unemoto et al (2007), a deficiência ou o excesso desses elementos pode interferir parcial ou completamente no sucesso do cultivo *in vitro*.

Elementos como as vitaminas e os carboidratos são de grande relevância haja vista que podem atuar como fonte extra de aminoácidos, a exemplo das vitaminas ou ainda atuar no enraizamento vegetal, como os carboidratos (LEITE et al, 2000). De acordo com Calvete et al (2002) o fornecimento de carbono exógeno serve como fonte de energia, influenciando diretamente na fisiologia da planta e na diferenciação celular.

Já os fitorreguladores favorecem diretamente o crescimento vegetal atuando como fatores essenciais no crescimento e no desenvolvimento de explantes submetidos a condições de cultivo *in vitro* (SANTOS et al, 2005). Entre os fitorreguladores mais utilizados se destacam o Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ylureia), BAP (6-benzilaminopurina), ANA (ácido naftaleno acético), AIA (ácido indol-3-acético) e IBA (ácido indolbutírico).

Citocininas como o Thidiazuron e o BAP, são fitorreguladores sintéticos derivados de fenilureia e adenina, respectivamente, amplamente utilizadas na indução de respostas fisiológicas, tais como: crescimento celular e diferenciação de tecidos e órgãos, bem como a síntese de clorofila, quando combinados às condições adequadas de luz e temperatura (FLORES et al, 2009).

O Thidiazuron ou Dropp foi inicialmente desenvolvido para ser utilizado como desfoliante para algodão (GRAÇA et al, 2001); no entanto, nos últimos anos vem sendo utilizado para estimular a formação de calos, sobretudo em explantes lenhosos (ERIG & SCHUCH, 2004) podendo estar associado, ainda, ao aumento da biossíntese ou ao acúmulo de citocininas endógenas (VICTOR et al, 1999), bem como atuar como modulador do metabolismo de auxinas e possuir grande capacidade de liberação de dormências de gemas (SAJID & AFTAB, 2009). De acordo com Erig & Fortes (2002), é considerado uma citocinina de alta estabilidade no tecido vegetal permanecendo intacta em sistemas de cultura de tecidos e de efeito inibitório do

processo de enraizamento adventício. Segundo Flores (2006) em baixas concentrações o Thidiazuron pode promover a regeneração de tecidos vegetais enquanto que em altas concentrações pode induzir o desenvolvimento de calos e reduzir o crescimento e o enraizamento dos brotos, além de poder favorecer o desenvolvimento de folhas anormais.

Já o BAP apresenta grande eficácia na indução da multiplicação em inúmeras espécies, sendo considerada excelente para a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. Segundo Soares et al. (2011) esta citocinina vem sendo utilizada em cerca de 60% dos meios de cultivo *in vitro*, em função da alta eficiência e baixo custo em relação às outras citocininas. No entanto, Leontiev-Orlov et al (2000), consideram que seu excesso pode ser tóxico, resultando em redução e engrossamento do caule, diminuição do número de folhas e inibição da multiplicação afetando diretamente, portanto, o cultivo *in vitro*.

Trabalhos relatam a eficiência do BAP em relação ao TDZ, em cultivos *in vitro* em diversas culturas. Faria (1996) relatou, ao realizar estudos com o porta-enxerto Marubakaido, certa eficiência do BAP em relação ao TDZ na indução na formação de brotos e gemas, tal como Morales et al (1999) que, após estudos em macieira, observaram que o BAP, quando comparado ao TDZ, proporcionou maior taxa de multiplicação e maior comprimento dos explantes.

As auxinas, como o ácido naftaleno acético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB), também são essenciais no cultivo *in vitro*, atuando no estímulo à extensão da parede celular e na entrada de água no corpo vegetal (SARTORI et al, 2003). Estão ainda diretamente relacionadas ao processo de enraizamento, onde estimulam a divisão celular, promovendo o desenvolvimento de raízes adventícias.

Conforme Centellas et al (1999), o estímulo ao desenvolvimento de raízes em explantes cultivados *in vitro* permite a constituição de plantas completas para posterior adaptação *ex vitro*, favorecendo, assim, seu desenvolvimento. Calvete et al (2002), associam as taxas de sobrevivência das plântulas à etapa de enraizamento *in vitro*, uma vez que modificações são estimuladas nos tecidos vegetais nesta fase.

Neste contexto, buscou-se avaliar o efeito do BAP e do Thidiazuron, associados ao ANA, na morfogênese vegetal *in vitro* de rebentos de sisal, visando ao superbrotamento e, portanto, à produção de um grande número de mudas livres de doenças e de patógenos, em curto período, bem como a obtenção de um protocolo eficiente para o enraizamento de explantes de sisal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo de Tecidos da Embrapa Algodão. Foram utilizados rebentos de híbridos de sisal, cada um com cerca de 20 cm de altura (Figura 1), oriundos do banco de germoplasma de sisal da Embrapa Algodão como fonte de explantes, os quais foram desinfestados e posteriormente cultivados em meio básico Murashige e Skoog (MS) contendo macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e enriquecido com os fitorreguladores BAP, TDZ e ANA, em diferentes combinações.

O trabalho foi desenvolvido em três etapas, sendo na primeira realizados ensaios para a definição do protocolo de desinfestação, a segunda, ensaios visando à indução ao superbrotamento em meios suplementados com fitorreguladores e a terceira dedicada ao enraizamento *in vitro* e aclimatização.

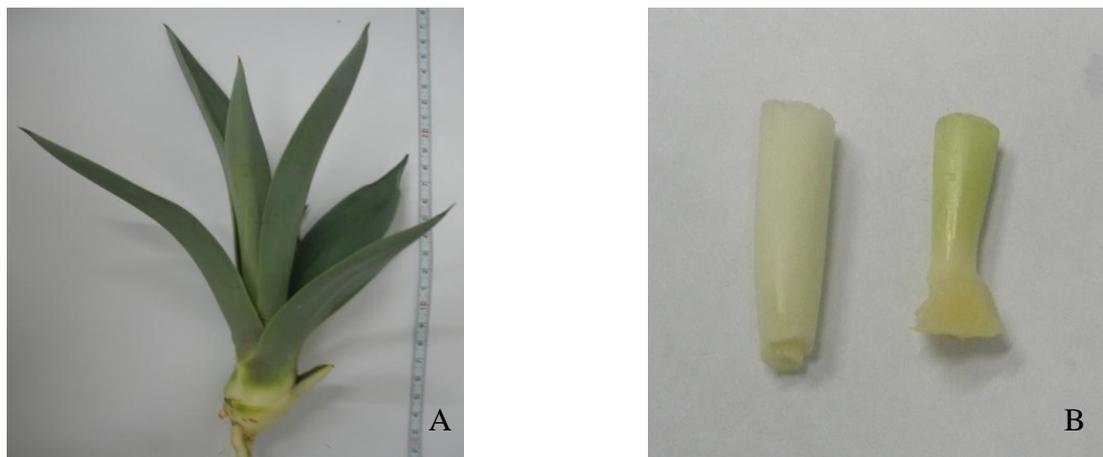


Figura 1 – (A) Rebento de híbridos de sisal de 20 cm de comprimento utilizado como fonte doadora de explante. (B) Rebentos de híbridos de sisal após a retirada das folhas para utilização no cultivo *in vitro*.

3.1 Definição de protocolo de desinfestação

Os rebentos foram originários do campo de germoplasma da Embrapa Algodão e levados para o Laboratório de Cultivo de Tecidos para serem submetidos a processos de desinfestação.

Os rebentos utilizados como fonte doadora de explantes tiveram suas folhas retiradas e lavadas em água corrente; em seguida, foram previamente submersos em solução com detergente neutro a 4% (v/v) por período determinado e só então enxaguados com água autoclavada. Em câmara de fluxo laminar os explantes foram submersos em solução de formaldeído a 1% (v/v) e em solução de hipoclorito de sódio a 5% (v/v) acrescida de 2 gotas de Tween 20, sob agitação constante e após 30 minutos, lavados três vezes em água ultra pura autoclavada; ainda na câmara de fluxo os explantes foram imersos em solução contendo o fungicida Baytan®.

Em seguida, os explantes foram imersos em solução do antibiótico Citrofloxacino por 30 minutos; por fim, foram cultivados em meio MS suplementado com 0,15% (m/v) de glicose e 0,57% (m/v) de ágar e pH ajustado para 5,8.

Os explantes foram então incubados em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 7, 15 e 21 dias de cultivo os explantes foram avaliados considerando-se a contaminação bacteriana e fúngica.

Para definição do protocolo de desinfestação foram utilizadas diferentes concentrações do fungicida Baytan® e do antibiótico Citrofloxacino conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos a serem utilizados na desinfestação de rebentos de sisal

Tratamento	Concentração do fungicida		Concentração do antibiótico	
	Baytan® (%)		Citrofloxacino (%)	
T 1	0,3		0,0	
T 2	0,3		0,5	
T 3	0,3		1,0	
T 4	0,4		0,0	
T 5	0,4		0,5	
T 6	0,4		1,0	
T 7	0,5		0,0	
T 8	0,5		0,5	
T 9	0,5		1,0	

Com vistas ao tratamento estatístico, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 3 x 3 (três concentrações de fungicida e três concentrações de antibiótico), com 10 repetições por tratamento, cada uma constituída de um frasco de cultivo com um explante por frasco. Os dados foram transformados em $\sqrt{X + 1}$, sendo X o valor obtido nas avaliações e submetido à análise de variância e analisados pelo teste de médias de Scott – Knott a 90% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAEG 9.1.

3.2 Indução do superbrotamento de rebentos de sisal

Após definido o melhor tratamento de desinfestação, os rebentos foram desinfestados e em seguida inoculados em frascos contendo meio MS suplementado com diferentes combinações dos reguladores de crescimento TDZ, BAP e ANA. Os meios ainda foram suplementados com 0,15% (m/v) de glicose, 0,57% (m/v) de ágar e pH ajustado para 5,8.

Realizaram-se dois diferentes ensaios, utilizando-se em um deles a combinação dos fitorreguladores Thidiazuron e ANA (Tabela 2) e no outro as combinações de BAP e ANA, conforme a Tabela 3.

Tabela 2 – Descrição dos tratamentos utilizados para indução ao superbrotamento de sisal utilizando-se diferentes combinações de TDZ e ANA

Tratamento	Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)	
	TDZ	ANA
T 1	0,25	0,1
T 2	0,5	0,1
T 3	1,0	0,1
T 4	2,0	0,1
T 5	3,0	0,1
T 6	5,0	0,1
T 7	10,0	0,1

Tabela 3 – Descrição dos tratamentos utilizados para indução ao superbrotamento de sisal utilizando diferentes combinações de BAP e ANA

Tratamento	Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)	
	BAP	ANA
T 1	1,0	0,10
T 2	1,0	0,25
T 3	2,0	0,10
T 4	2,0	0,25
T 5	10,0	0,10
T 6	10,0	0,25
T 7	12,0	0,10
T 8	12,0	0,25

Os explantes inoculados foram incubados em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A cada 35, 70 e 105 dias os explantes foram avaliados considerando-se as seguintes variáveis: número de brotos por explante (NBE) e tamanho dos brotos (TB).

Após 4 semanas em meio suplementado com fitorreguladores, os explantes foram subcultivados em meio MS livre de fitorreguladores, durante 8 semanas, decorrido este período, os brotos foram inoculados em meio de enraizamento.

Para o tratamento estatístico do ensaio com os fitorreguladores TDZ e ANA utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado simples enquanto que no ensaio com BAP e ANA utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4×2 (quatro concentrações de BAP e duas de ANA). Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, cada uma constituída de um frasco de cultivo com um explante por frasco. Em ambos os ensaios os dados foram transformados em $\sqrt{X + 1}$, sendo X o valor obtido nas avaliações e submetido à análise de variância e analisados pelo teste de Tukey no ensaio com diferentes combinações de TDZ e ANA e pelo teste de médias de Skott-Knott, no ensaio com diferentes combinações de BAP e ANA, ambos a 90% de confiabilidade. Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAEG 9.1.

3.3 Ensaio de enraizamento

Para o enraizamento dos brotos obtidos foram utilizadas diferentes concentrações dos hormônios vegetais AIB e AIA, conforme descrito na Tabela 4.

Os brotos foram então seccionados dos explantes após 105 dias de cultivo e então transferidos para o meio de enraizamento, onde permaneceram por 30 dias, período após o qual foram avaliados considerando as seguintes variáveis: tamanho do explante (TE) e número de raízes (NR).

Os dados foram transformados em $\sqrt{X + 1}$, sendo X os valores obtidos nas avaliações e submetidos à análise de variância. Utilizou-se o programa estatístico SAEG 9.1.

Tabela 4 – Descrição dos tratamentos utilizados para o enraizamento dos brotos de sisal.

Tratamento	Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)	
	AIB	AIA
T 1	0	0
T 2	0,25	0
T 3	0	0,25
T 4	0,50	0
T 5	0	0,50

3.4 Aclimatização

Após o período de enraizamento os explantes foram transferidos para frascos de polietileno contendo substrato composto por tufa e vermiculita, na proporção 2:1 e acondicionados em sala de aclimatização, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por 30 dias. Para criar um microclima e evitar a perda excessiva de água nas folhas, utilizaram-se frascos de polietileno transparente sobre os explantes e um explante para cada recipiente com substrato.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Definição de protocolo de desinfestação

Independentemente da concentração de antibiótico e fungicida utilizada, verificou-se nos tratamentos aplicados contaminação de alguns explantes cultivados por bactéria ou por fungos durante o período de estudo, conforme observado na Figura 2.

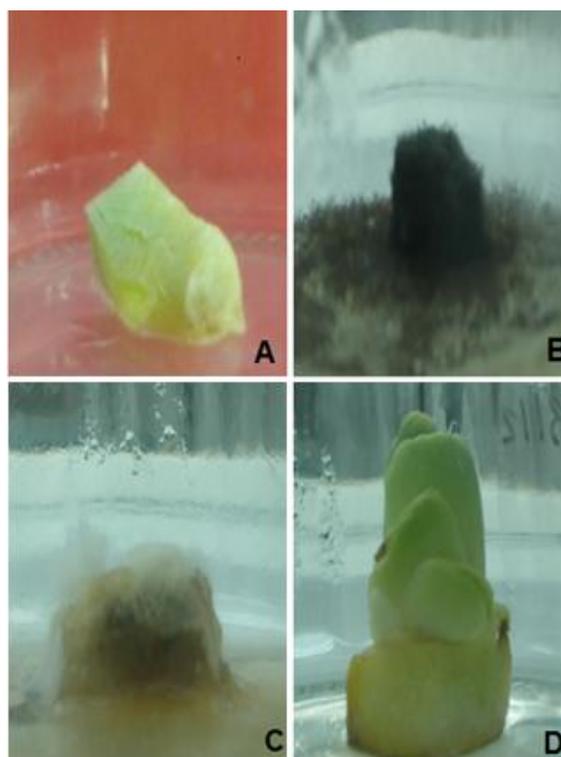


Figura 2 – Explantes de sisal em diferentes etapas do processo de desinfestação. (A) Explante 7 dias, após o processo de desinfestação; (B) Explante com contaminação fúngica, 15 dias após o processo de desinfestação; (C) Explante com contaminação bacteriana, 7 dias após o processo de desinfestação; (D) Explante sadio 30 dias após o processo de desinfestação.

A dificuldade no processo de desinfestação de explantes de sisal pode estar intimamente relacionada à origem da planta doadora de explantes, visto que as plantas foram obtidas diretamente do campo, sujeitas, portanto, a condições ambientais diversas, e à presença de contaminantes endógenos. Erig & Schuch (2003), afirmam que a utilização de plantas matrizes mantidas em condições fitossanitárias controladas, facilita o processo de descontaminação e a eliminação de micro-organismos possivelmente existentes nos explantes durante sua introdução *in vitro*.

Considera-se, ainda, que os meios de cultivo sejam amplamente favoráveis ao desenvolvimento de bactérias e fungos devido à sua alta carga de nutrientes e às condições de pH, passando esses a competir com o explante por nutrientes minerais e carboidratos presentes no meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento do explante (PEREIRA et al, 2003).

Quando considerada a contaminação bacteriana, observou-se diferença significativa entre os tratamentos aplicados (Tabela 5), assim como, quando considerada a contaminação por fungos (Tabela 6); no entanto, quando considerada a relação contaminação-tempo, observou-se que este tempo não atuou de forma determinante para o desenvolvimento de colônias bacterianas nos explantes, em contrapartida foi significativa para o aparecimento de maiores taxas de contaminação por fungos (Tabela 6).

Tabela 5 – Análise de variância considerando-se a contaminação bacteriana em explantes de sisal.

Fonte de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamento	8	3.739947	0.4674934	16.406*
Tempo	2	0.3410296E-01	0.1705148E-01	0.598 ^{ns}
Trat/Tempo	16	0.1446304	0.9039398E-02	0.317 ^{ns}
Resíduo	243	6.924540	0.2849605E-01	
CV = 15.06%				

*: significante; ^{ns}: não significante

Tabela 6 – Análise de variância considerando-se a contaminação fúngica em explantes de sisal.

Fonte de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamento	8	4.056133	0.5070167	16.304*
Tempo	2	0.1592289	0.7961444E-01	2.560*
Trat/Tempo	16	0.2884644	0.1802903E-01	0.580 ^{ns}
Resíduo	243	7.556760	0.3109778E-01	
CV = 15.28%				

*: significante, ^{ns}: não significante

No tratamento em que se utilizou 0,5% Baytan[®] + 1% de Citrofloxacino, observou-se a menor média de contaminação bacteriana (Tabela 7) e fúngica (Tabela 8) ao final dos 21 dias de cultivo. Já quando se utilizou apenas 0,5% e 0,4% do fungicida Baytan[®], foram verificadas as maiores taxas de contaminação por bactérias, conforme Tabela 7. Em contrapartida, as maiores taxas de contaminação fúngica foram observadas quando utilizado 0,5 % Baytan[®] + 0,5 % Citrofloxacino, cerca de 90 % (Figura 3).

Tabela 7 – Efeito de diferentes concentrações do antibiótico Citrofloxacino com o fungicida Baytan[®] na descontaminação de rebentos de sisal, referente ao número médio de rebentos contaminados por bactéria em diferentes períodos de avaliação

Descontaminantes		Contaminação bacteriana (dias)		
Citrofloxacino	Baytan [®]	7	15	21
(%)	(%)			
0	0,3	1,0410 c	1,0410 b	1,0410 c
0,5	0,3	1,0000 c	1,0410 b	1,1230 c
1	0,3	1,0000 c	1,0410 b	1,0820 c
0	0,4	1,2050 b	1,1050 b	1,2050 b
0,5	0,4	1,0820 c	1,0820 b	1,0820 c
1	0,4	1,2050 b	1,2050 b	1,2050 b
0	0,5	1,4100 a	1,4100 a	1,4100 a
0,5	0,5	1,0410 c	1,0410 b	1,0410 c
1	0,5	1,0410 c	1,0410 b	1,0410 c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 90% pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 6 – Efeito de diferentes concentrações do antibiótico Citrofloxacino com o fungicida Baytan® na descontaminação de rebentos de sisal, referentes ao número médio de rebentos contaminados por fungos em diferentes períodos de avaliação

Descontaminantes		Contaminação fúngica (dias)		
Citrofloxacino (%)	Baytan® (%)	7	15	21
0	0,3	1,0000 b	1,2050 a	1,2460 b
0,5	0,3	1,0000 b	1,1640 a	1,2050 b
1	0,3	1,3280 a	1,3280 a	1,3280 a
0	0,4	1,0410 b	1,0820 b	1,0820 c
0,5	0,4	1,0820 b	1,1230 a	1,1620 b
1	0,4	1,2050 a	1,2050 a	1,2050 b
0	0,5	1,0000 b	1,0000 b	1,0000 c
0,5	0,5	1,3280 a	1,3690 a	1,3690 a
1	0,5	1,0000 b	1,0410 b	1,0410 c

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 90% pelo teste de Scott-Knott.

As altas taxas de contaminação bacteriana nos tratamentos em que se utilizou apenas o fungicida com 0,5 e 0,4% do fungicida Baytan® (Figura 3) estão associadas ao fato de nesses tratamentos não ter sido aplicada solução antibiótica, o que elevou a probabilidade de contaminação dos explantes por bactérias diversas. De acordo com Pereira et al (2003), os maiores problemas em relação a contaminação no cultivo *in vitro* dizem respeito à contaminação bacteriana, uma vez que estas apresentam um maior período de latência, e desenvolvimento assintomático, tornando-se visíveis após algum tempo de cultivo.

Já a alta taxa de contaminação fúngica observada quando utilizada 0,5% de fungicida + 0,5% de antibiótico, reforça o fato dos contaminantes do explante serem de origem endógena e de possuírem alta resistência, visto que neste tratamento foi administrada a maior concentração do fungicida e esta ainda se mostrou ineficiente.

O fato da fonte doadora de explantes, ter sido obtida diretamente do campo, pode ter aumentado as chances de contaminação. De acordo com Erig e Fortes (2002), maiores taxas de contaminação são observadas quando utilizadas plantas doadoras de explantes diretamente do campo.

Em contrapartida, quando utilizado 1% Citrofloxacino + 0,5% de Baytan® a concentração máxima do antibiótico e do fungicida ampliaram o espectro de atuação e, conseqüentemente o

desenvolvimento de explantes saudáveis ao longo do período de estudo reduzindo, desta forma a taxa de contaminação bacteriana e fúngica a 10 % do total de explantes cultivados (Figura 3).

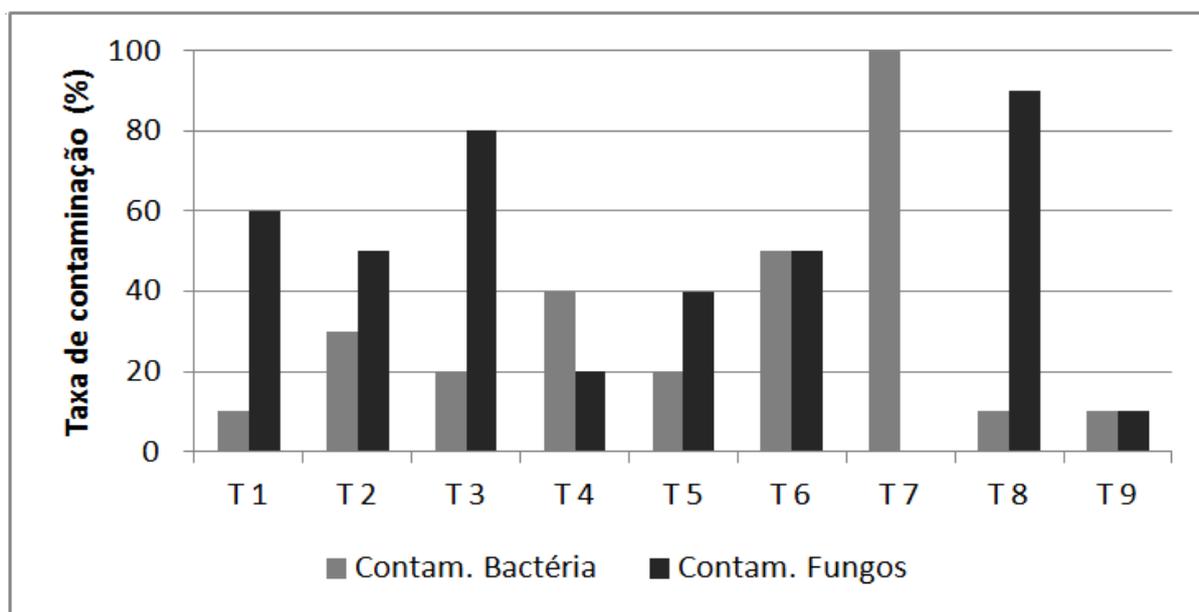


Figura 3 – Taxa de contaminação dos explantes de sisal, utilizando-se diferentes concentrações de fungicida e antibiótico.

Quando contrabalanceadas as taxas de contaminação por bactérias e por fungos, definiu-se o tratamento em que se utilizou 0,5% Baytan[®] + 1% Citrofloxacino, como sendo o tratamento mais indicado para o processo de descontaminação de explantes de sisal visto que taxas entre 5 e 10% de contaminação são aceitáveis na cultura de tecidos.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a afirmativa proposta por Montarroyos (2000) e por Erig e Schuch (2003) da necessidade de um controle das condições fitossanitárias da planta utilizada como fonte doadora de explantes.

4.2 Indução ao superbrotamento de sisal utilizando TDZ e ANA

O número de brotos por explante foi baixo em todos os tratamentos aplicados conforme observado na Figura 4, não havendo diferença significativa entre os tratamentos quando aplicado o teste de variância, conforme Tabela 9.

Os explantes cultivados em meio suplementado com $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA, foram os menos responsivos à indução de brotos, não sendo observado o desenvolvimento de brotações nesses tratamentos, em todo o período de avaliação, conforme Figura 4.

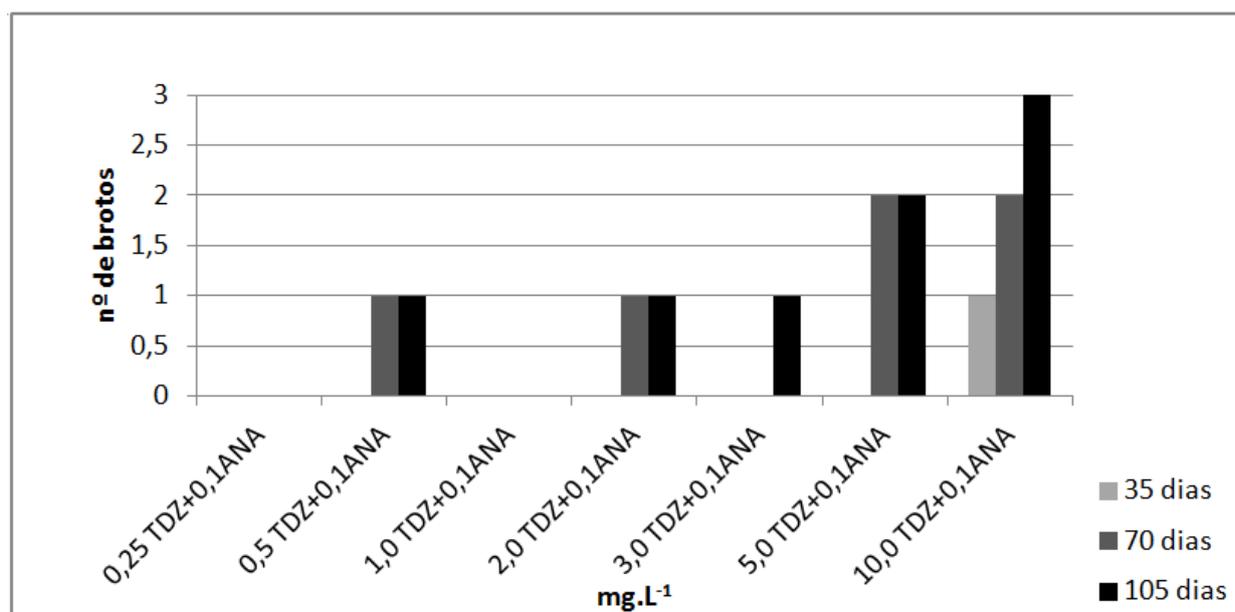


Figura 4 – Efeito do TDZ associado ao ANA em diferentes concentrações no número de brotos por explante de sisal, ao longo do tempo

Tabela 7 – Análise de variância considerando-se a relação TDZ/ ANA e destes em relação ao tempo para o número de brotos por explantes de sisal.

Fonte de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F
TDZ / ANA	6	0.1616962	0.26949337E-01	2.558 ^{ns}
Tempo	2	0.6243714E-01	0.3121857E-01	2.964 ^{ns}
Resíduo	201	2.117260		

CV = 9.97%

*: significante; ^{ns}: não significante

Constatou-se, porém, que o maior número de brotações (três) ocorreu quando utilizado meio MS suplementado com $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA ao final dos 105 dias de cultivo, conforme ilustrado na Figura 5.

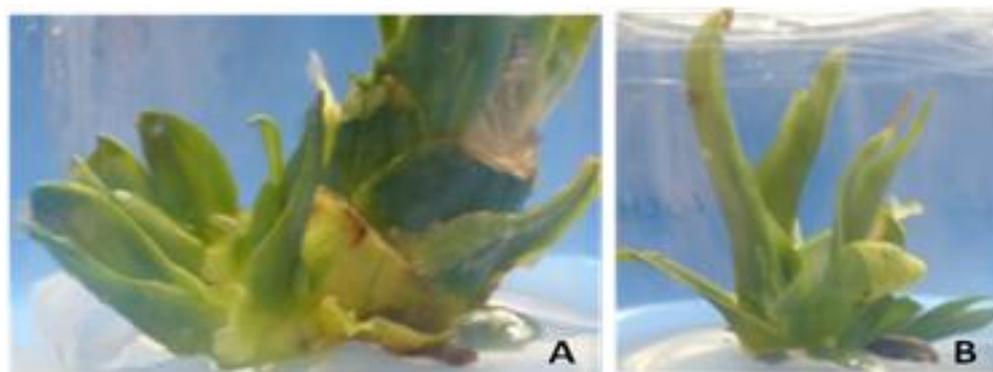


Figura 5 – Multibrotações em explantes de sisal utilizando-se $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA aos 105 dias de cultivo.

Os tratamentos não diferiram estatisticamente durante os 70 primeiros dias de cultivo *in vitro*, quando aplicado o teste de Tukey, havendo diferença apenas ao final do período de avaliação (105 dias), sendo os explantes cultivados em meio suplementado com $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA, o que apresentaram melhores resultados, com média de 1,123 brotos, por explante (Tabela 10).

Tabela 8 – Efeito do TDZ e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal referente ao número médio de brotos (NMB) em diferentes períodos de avaliação

Fitorreguladores (mg.L^{-1})		NMB (dias)		
TDZ	ANA	35	70 (dias)	105
0,25	0,1	1,0000 a	1,0000 a	1,0000 a
0,5	0,1	1,0000 a	1,0410 a	1,0410 a
1,0	0,1	1,0000 a	1,0000 a	1,0000 a
2,0	0,1	1,0000 a	1,0410 a	1,0530 a
3,0	0,1	1,0000 a	1,0000 a	1,0410 a
5,0	0,1	1,0000 a	1,0820 a	1,0820 a
10,0	0,1	1,0000 a	1,0820 a	1,1230 b

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 90% pelo teste de Tukey.

Quanto ao tamanho das brotações também não houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados, conforme mostra a Tabela 9.

Tabela 9 – Análise de variância considerando-se a relação TDZ/ ANA e desses quanto ao tempo para o tamanho de brotos por explantes de sisal.

Fonte de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F
TDZ / ANA	6	0.2722562	0.2694937E-01	0.03971 ^{ns}
Tempo	2	0.1062752	0.3121857E01	0.07389 ^{ns}
Resíduo	201	4.046928		

CV = 9.97%

*: significante; ^{ns}: não significante

As diferentes concentrações de TDZ nos meios de cultivo pouco favoreceram o crescimento dos brotos, que variaram de 0,5 cm quando utilizado meio MS suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ TDZ + 0,1 mg.L⁻¹ ANA a 2,0 cm quando utilizado 0,5 mg.L⁻¹ TDZ + 0,1 mg.L⁻¹ ANA, não diferindo estatisticamente entre si quando aplicado o teste de Tukey até os 70 dias de cultivo, no entanto aos 105 dias houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados, conforme observado na Tabela 10.

É importante considerar que o tratamento que melhor favoreceu o alongamento dos explantes, não foi o mesmo que induziu o maior número de brotos, sendo esta última variável mais relevante para o cultivo *in vitro*.

Tabela 10 – Efeito do TDZ e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal, referente ao tamanho médio dos brotos (TMB) em diferentes períodos de avaliação

Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)		TMB (cm)		
TDZ	ANA	35	70 (dias)	105
0,25	0,1	1,0000 a	1,0000 a	1,0000 b
0,5	0,1	1,0000 a	1,0670 a	1,0730 b
1,0	0,1	1,0000 a	1,0000 a	1,0000 b
2,0	0,1	1,0000 a	1,0520 a	1,0580 b

3,0	0,1	1,0000 a	1,0000 a	1,0220 b
5,0	0,1	1,0000 a	1,0990 a	1,1030 b
10,0	0,1	1,0410 a	1,1280 a	1,1420 a

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 90% pelo teste de Tukey.

A variação temporal favoreceu o crescimento das brotações em alguns tratamentos merecendo destaque os brotos cultivados em meio suplementado com 10 mg.L⁻¹ TDZ + 0,1 mg.L⁻¹ ANA (Figura 6).

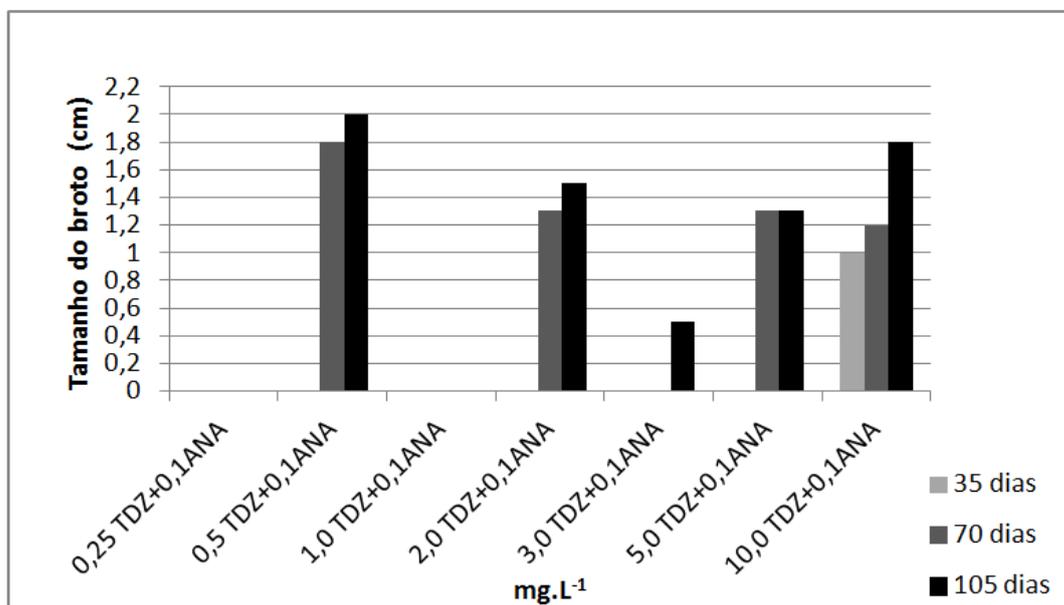


Figura 6 – Efeito do TDZ associado ao ANA em diferentes concentrações no tamanho dos brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.

Esses resultados estão em contraste com outros trabalhos nos quais se utilizou o TDZ como fitorregulador e cujas baixas concentrações deste hormônio são altamente responsivas em virtude da citocinina ser considerada forte e de grande poder indutor. Segundo Ribeiro et al (2010), a alta atividade do TDZ se deve ao aumento da atividade da fosfatase ácida, enzima responsável pela conversão nucleotídeo-nucleosídeo o que torna a enzima biologicamente mais ativa.

Ribeiro et al (2010) também observaram, ao utilizar TDZ na indução da organogênese em mamona que as menores concentrações de TDZ promoveram os melhores resultados, assim

como Flores et al (2009) em estudos com *Ptaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Morales et al (1999) afirmam ainda, que os melhores resultados na multiplicação *in vitro* são obtidos quando utilizadas concentrações entre 0,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de TDZ; no entanto, deve-se considerar que fatores como a cultura a ser trabalhada, tal como as características genéticas e morfofisiológicas, podem exercer influência na ação dos fitorreguladores e em consequência no desenvolvimento *in vitro*.

Morales et al (1999) observaram que elevadas concentrações de TDZ podem causar efeitos fitotóxicos, passíveis de afetar o desenvolvimento e o crescimento dos explantes, e causar ainda, anormalidades morfofisiológicas como hiper-hidria, desenvolvimento anormal das folhas e de gemas, além de diminuição ou ausência de enraizamento (SOARES et al, 2011). Trabalhos desenvolvidos por Choer et al (1997) a partir de explantes de kiwi, mostraram que concentrações entre 8 e 16 mg.L⁻¹ de TDZ causaram a morte de explantes desta cultivar, durante o período de ensaio; apesar disto, para indução ao superbrotamento em explantes de sisal, maiores concentrações de TDZ são mais indicadas para a indução de brotos, embora ainda se mostre ineficiente devido à baixa taxa de proliferação.

4.3 Indução ao superbrotamento de sisal utilizando diferentes combinações de BAP e ANA

Os tratamentos aplicados mostraram baixa eficiência para indução ao superbrotamento, produzindo poucas brotações durante todo o período de avaliação (Figura 7), produzindo no máximo 9 brotos quando utilizado 12mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA; verificou-se, porém, diferença significativa entre os tratamentos quando aplicado o teste de variância, conforme Tabela 13.

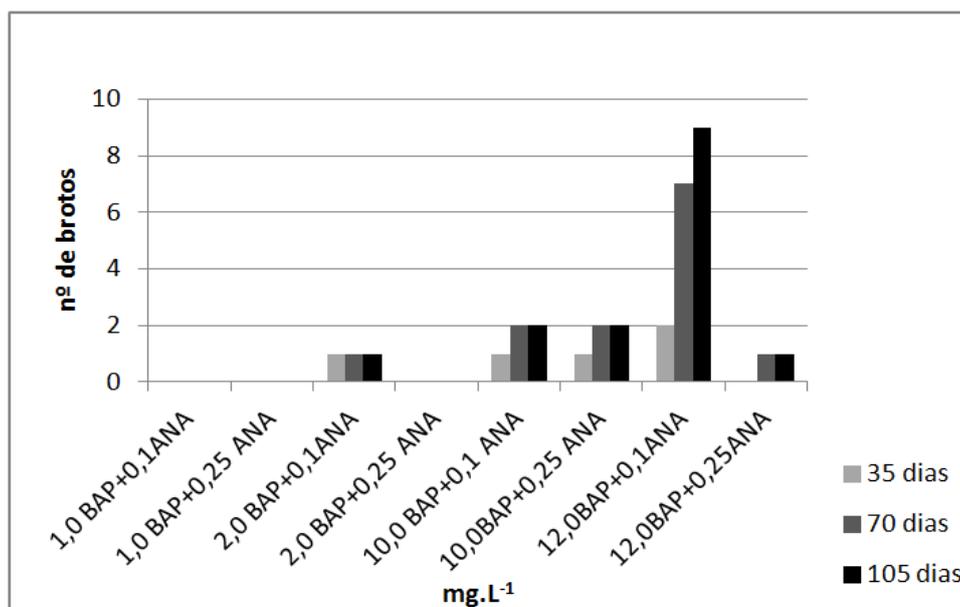


Figura 7 – Efeito do BAP associado ao ANA em diferentes concentrações no número de brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.

Tabela 11 – Análise de variância considerando-se a relação BAP / ANA e desses em relação ao tempo para o número de brotos por explantes de sisal

Fonte de Variação	G.L	S.Q	Q.M	F
BAP / ANA	7	1.016740	0.1452485	6.101*
Tempo	2	0.1245100	0.6225501E-01	2.615*
Resíduo	230	5.475539	0.2380669E-01	

CV = 14.62%

*: significante; ^{ns}: não significante

Dentre os tratamentos aplicados o maior número de brotos por explante ocorreu quando utilizados 12 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, com média de 1,3010 broto por explante ao final dos 105 dias de cultivo diferindo, portanto, dos demais tratamentos utilizados quando aplicado o teste de Scott – Knott (Tabela 12). As brotações observadas neste tratamento apresentaram os maiores comprimentos dentre todas as concentrações utilizadas, com explantes de até 4 cm e média de 2,55 cm ao final dos 105 dias de cultivo (Figura 8), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, conforme observado na Tabela 13.

Tabela 12 – Efeito do BAP e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal, referente ao número médio de brotos (NMB) em diferentes períodos de avaliação

Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)		NMB		
BAP	ANA	35	70	105
		(dias)		
1,0	0,1	1,0000 a	1,0000 b	1,0000 b
1,0	0,25	1,0000 a	1,0000 b	1,0000 b
2,0	0,1	1,0410 a	1,0410 b	1,0410 b
2,0	0,25	1,0000 a	1,0000 b	1,0000 b
10,0	0,1	1,0410 a	1,0820 b	1,0820 b
10,0	0,25	1,0000 a	1,0820 b	1,0410 b
12,0	0,1	1,1550 a	1,2960 a	1,3010 a
12,0	0,25	1,0000 a	1,0410 b	1,1890 b

* Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 90% pelo teste de Scott-Knott.

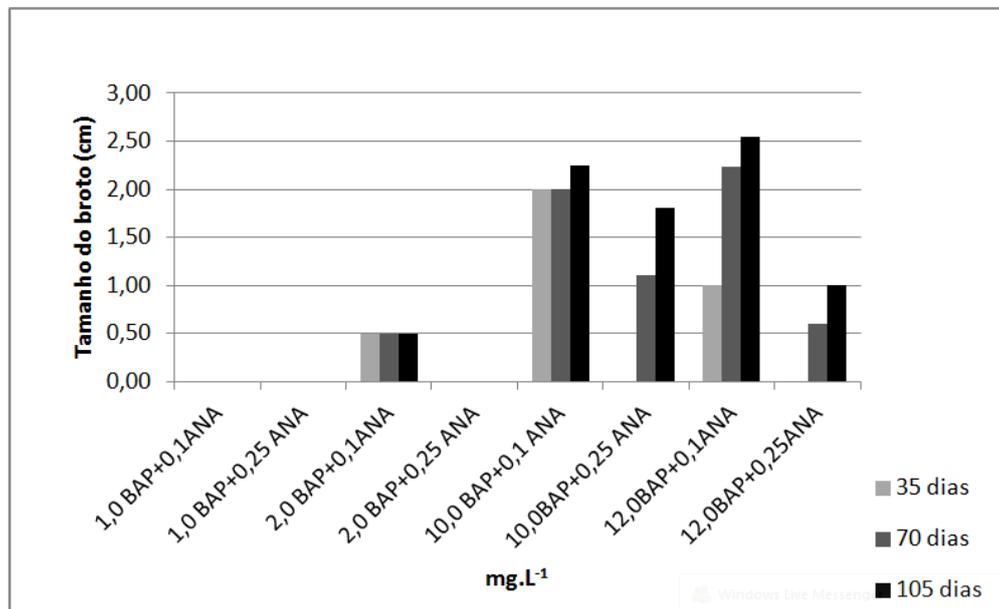


Figura 8 – Efeito do BAP associado ao ANA em diferentes concentrações no tamanho dos brotos por explante de sisal, ao longo do tempo.

Tabela 13 – Efeito do BAP e do ANA na indução do superbrotamento a partir de rebentos de sisal, referente ao tamanho médio dos brotos (TMB) em diferentes períodos de avaliação.

Fitorreguladores (mg.L ⁻¹)		TMB (cm)		
BAP	ANA	35	70 (dias)	105
1,0	0,1	1,0000 c	1,0000 b	1,0000 b
1,0	0,25	1,0000 c	1,0000 b	1,0000 b
2,0	0,1	1,0147 c	1,0200 b	1,0200 b
2,0	0,25	1,0000 c	1,0000 b	1,0000 b
10,0	0,1	1,1253 b	1,1450 b	1,1580 b
10,0	0,25	1,0577 c	1,0860 b	1,0870 b
12,0	0,1	1,3100 a	1,4560 a	1,4660 a
12,0	0,25	1,1355 b	1,0260 b	1,2805 b

*Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ao nível de 90% pelo teste de Scott-Knott.

Nos tratamentos suplementados com 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA; 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,25 mg.L⁻¹ ANA e 2 mg.L⁻¹ BAP + 0,25 mg.L⁻¹ ANA, não houve surgimento de brotações ao longo do período de cultivo, conforme observado na Figura 7.

Considera-se, ainda, que a variação temporal foi importante para o surgimento de brotações nos explantes cultivados em meios suplementados com 10,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA, 10,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,25 mg.L⁻¹ ANA, 12,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA e 12,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,25 mg.L⁻¹ ANA, bem como para o aumento do tamanho dos brotos, conforme observado na Figura 9. Segundo Fráguas et al (2009) isto se deve, provavelmente, ao efeito residual provocado pelo acúmulo de citocinina nos explantes, ao longo do período de subcultivo. O seccionamento dos explantes durante os subcultivos pode ter contribuído ainda, uma vez que estimula a divisão celular.

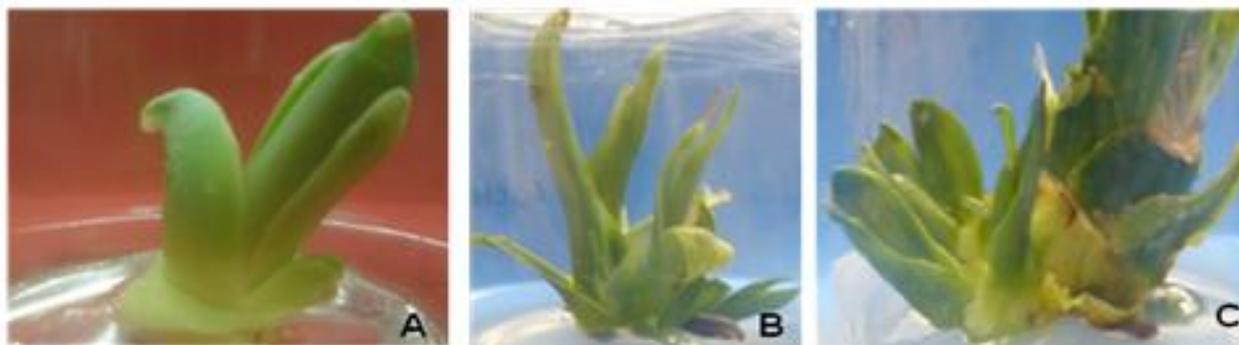


Figura 9 – Explantes de sisal cultivados em meio suplementado com BAP e ANA ao longo do período de cultivo: (A) 35 dias de cultivo, (B) 70 dias de cultivo e (C) 105 dias de cultivo

Portanto, as maiores concentrações de BAP são as mais indicadas para a indução das brotações em explantes de sisal, independentemente da concentração de ANA empregada. Conforme descrito por Flores et al (2009), a presença de citocininas como o BAP, tende a favorecer o desenvolvimento de brotações. Grattapaglia e Machado (1998) comentam que, altas concentrações desses fitorreguladores podem provocar redução no número de folhas e engrossamento do explante.

Estudos realizados por Macêdo et al (2003) em abacaxizeiro, mostram que concentrações de BAP entre 0,25 e 0,5 mg.L⁻¹ associadas a concentrações de ANA entre 0,25 e 0,12 mg.L⁻¹, são as mais indicadas para o cultivo *in vitro*, pois favorecem o desenvolvimento de brotos individualizados, o que facilita a micropropagação.

Alves et al (2004) mostram, que a associação entre BAP e ANA pode não ser benéfica para todas as culturas podendo, em algumas delas, promover menores taxas de multiplicação do que quando utilizadas isoladamente, devendo ser este um fator a ser considerado, sendo necessários estudos complementares visando esclarecer a relação BAP e ANA no cultivo *in vitro* de sisal.

É necessário, considerar também que durante os 2º e 3º subcultivos (70 dias e 105 dias, respectivamente), houve o desenvolvimento de raízes em alguns explantes dos tratamentos suplementados com 10,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,25 mg.L⁻¹ de ANA, 12,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA e 12,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,25 mg.L⁻¹ ANA, as quais foram removidas a cada subcultivo. Morales et al (1999) verificaram fato semelhante quando induziram a organogênese em macieira utilizando BAP como fitorregulador. Em contrapartida, Soares et al (2011) e Erig & Schuch (2004), observaram tal evento quando utilizaram isoladamente o fitorregulador ANA em trabalhos com *Cattleya bicolor* Lindl., *Pyrus communis*, respectivamente.

O surgimento de raízes durante a indução à morfogênese pode estar, ainda associado ao fato do ANA ser uma auxina estimuladora da produção de raízes (TEIXEIRA, 2001), bem como ao acúmulo na quantidade de auxinas pelo explante, sendo parte oriundo do meio de cultivo e parte produzida pelos ápices dos explantes (SOARES et al, 2011). De acordo com Oliveira e Silva (1997), o surgimento de raízes durante o período de indução à morfogênese não é benéfico pois consome reservas que poderiam ser direcionadas para a produção de brotos.

Quando comparados os resultados obtidos nos diferentes ensaios (TDZ + ANA e BAP + ANA), em relação ao número de brotos (Figura 10), constatou-se que não houve diferença entre os fitorreguladores, pois ambos mostram-se ineficientes, produzindo baixo número de brotações, mesmo quando utilizadas altas concentrações de fitorreguladores (10 mg.L^{-1} de TDZ ou 10 mg.L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA).

Quanto ao tamanho dos brotos, observou-se pouca variação, quando utilizado meios suplementados com as mesmas concentrações dos fitorreguladores TDZ e BAP; no entanto, os melhores resultados foram observados quando utilizado o BAP (Figura 11). De acordo com Flores et al (2009), o efeito negativo do TDZ no crescimento e no comprimento das brotações é maior quando comparado a citocininas derivadas da adenina, estando intimamente associado a sua estabilidade nos tecidos vegetais.

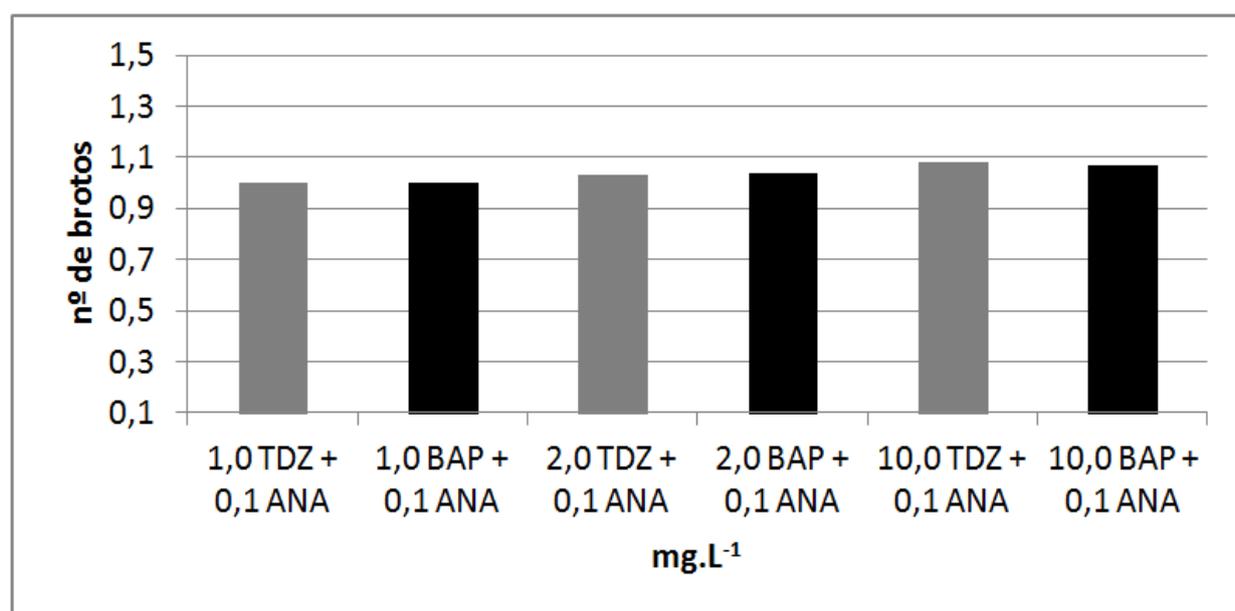


Figura 10 – Comparativo entre os diferentes fitorreguladores utilizados (BAP e TDZ), associados a concentrações semelhantes de ANA, em relação ao número de brotos (NB) por explantes de sisal

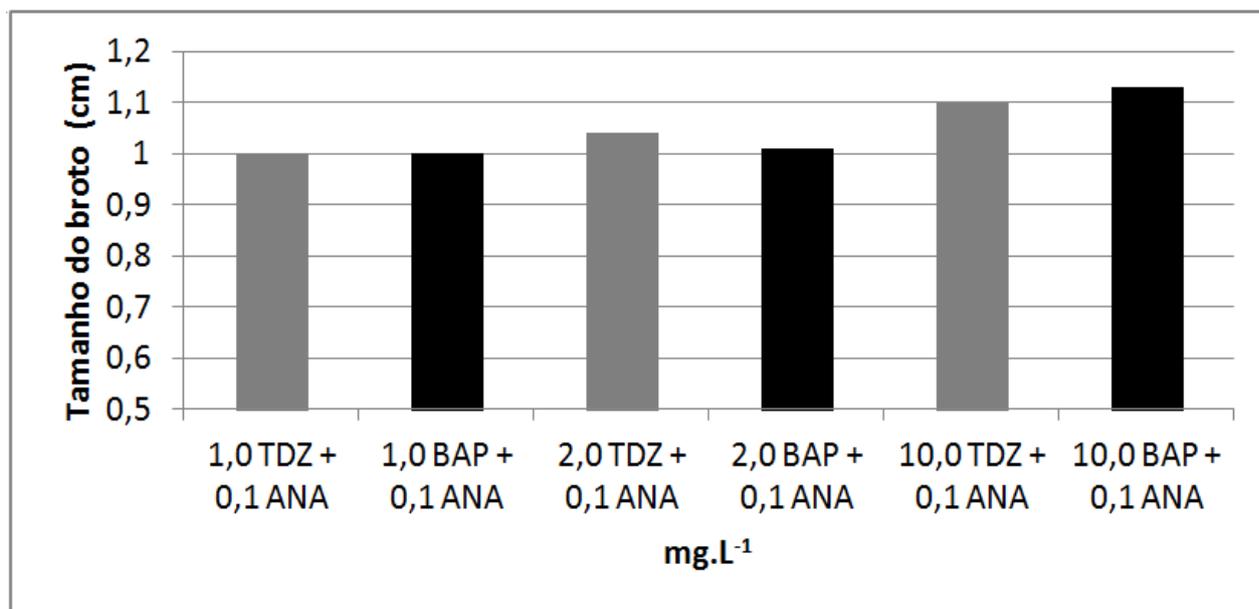


Figura 11 – Comparativo entre os diferentes fitorreguladores utilizados (BAP e TDZ), associados a concentrações semelhantes de ANA, em relação ao tamanho dos brotos (TB) por explantes de sisal

4.4 Ensaio de enraizamento *in vitro*

Verificou-se a formação de raízes em todos os tratamentos aplicados, conforme observado na Figura 12, inclusive naqueles explantes cultivados em meio isento de fitorregulador. Notando-se, no entanto, uma formação maior de raízes no tratamento em que os meios foram suplementados com 0,25 mg.L⁻¹ AIA, onde os explantes produziram em média 8 raízes por explante (Figura 13); neste tratamento foram obtidos ainda os maiores explantes com média de 4,2 cm (Figura 14). Resultados semelhantes foram obtidos por Manickam et al (2000), Sharma et al (2005) e Vengadesan et al (2000) em estudos realizados em *Artocarpus lakoocha*, *Cornus florida* e *Acacia sinuata*, onde também foram utilizados 0,25 mg.L⁻¹ de AIA.

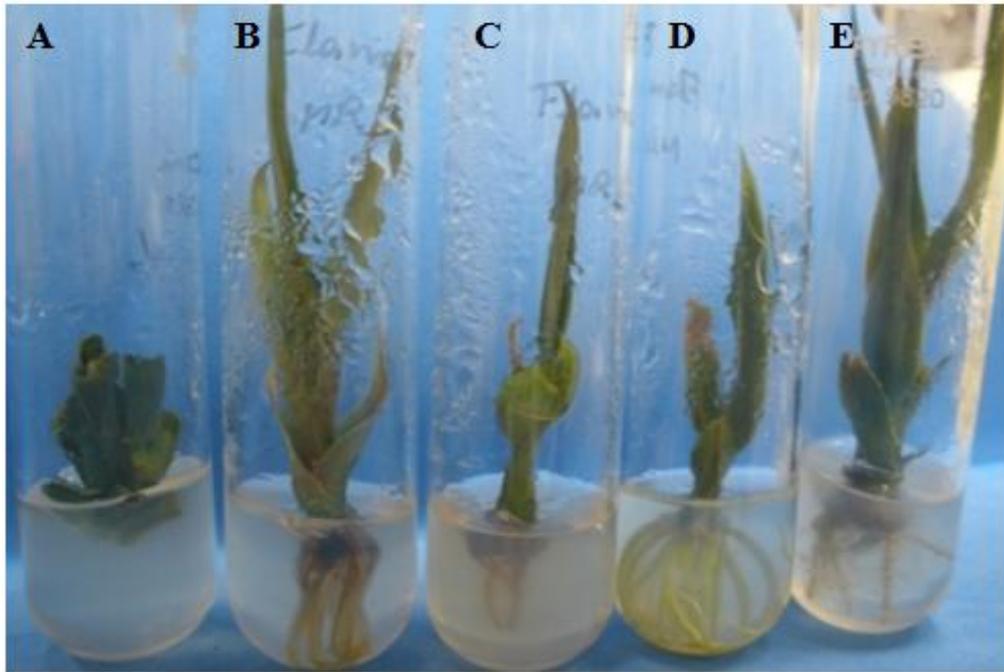


Figura 12 – Explantes de sisal em meios de enraizamento suplementados com AIA e AIB em diferentes concentrações após 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo: (A) Isento de fitorreguladores; (B) $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB; (C) $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB; (D) $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA; (E) $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ AIA

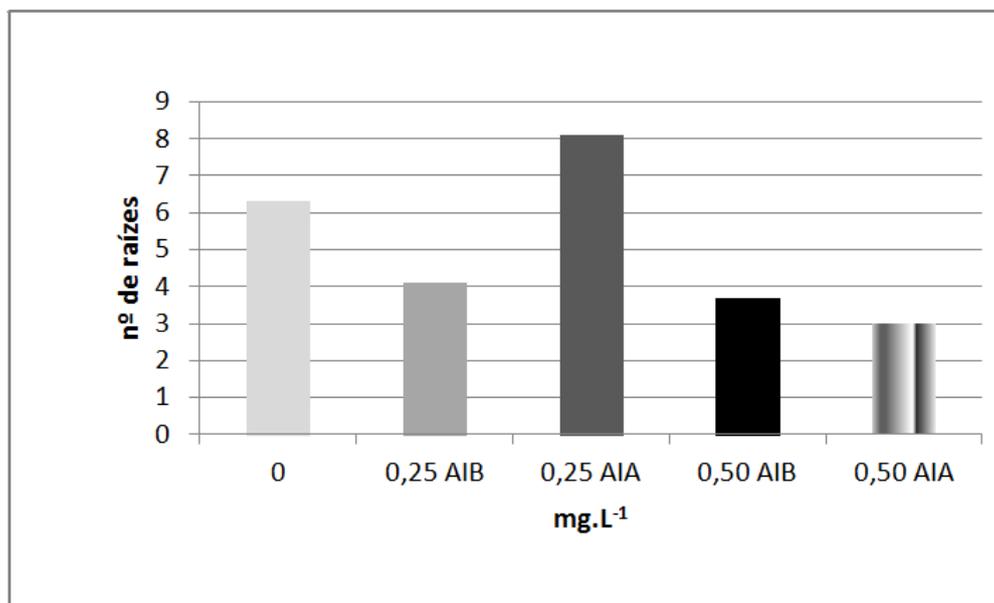


Figura 13 – Número médio de raízes por explante de sisal

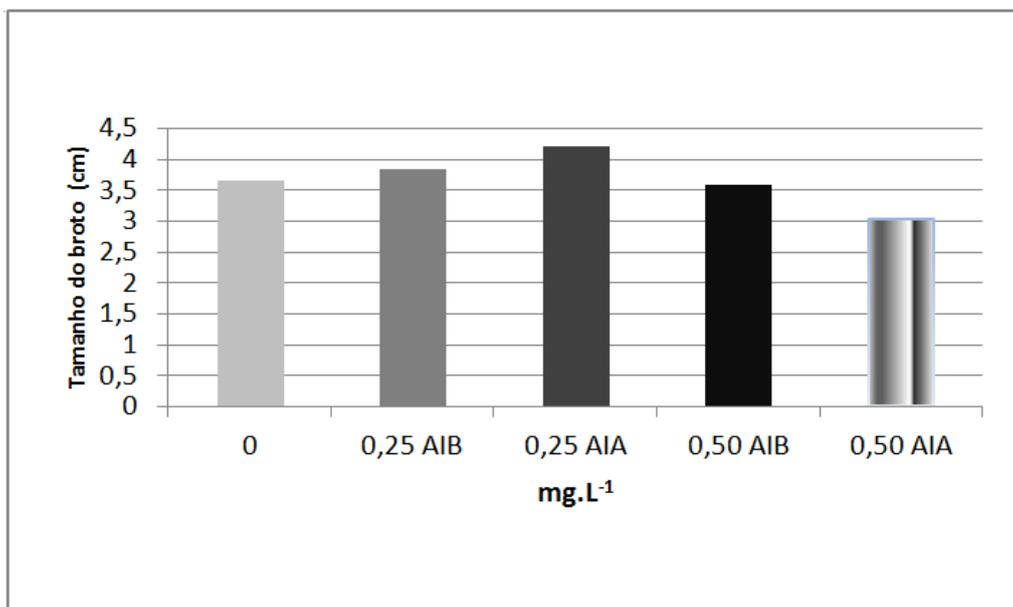


Figura 14 – Tamanho médio de explante de sisal em meio de enraizamento

Os explantes cultivados em meio MS sem fitorregulador, também apresentaram resultados satisfatórios e pouco divergentes daqueles em que se utilizou AIB ou AIA, mostrando que para o enraizamento de sisal, a presença de fitorreguladores é dispensável diminuindo, assim, os custos com o processo de cultivo *in vitro*.

O desenvolvimento de raízes nos explantes cultivados em meio livre de fitorreguladores pode ser resultado da influência direta exercida pelos fitormônios durante o período de indução a multiplicação dos explantes, uma vez que citocininas e auxinas estão diretamente envolvidas com o processo de emissão de raízes, além de permanecerem por longos períodos nos tecidos da planta. De acordo com Souza e Pereira (2007), a presença de níveis elevados de fitorreguladores endógenos pode dispensar sua utilização para o processo de enraizamento.

Após o período de enraizamento *in vitro* (30 dias), as plantas de sisal foram transferidas para recipientes individuais contendo turfa e vermiculita para período de aclimatização em câmara de crescimento durante 30 dias, conforme ilustrado na Figura 15, para só então serem transferidas para a casa de vegetação.

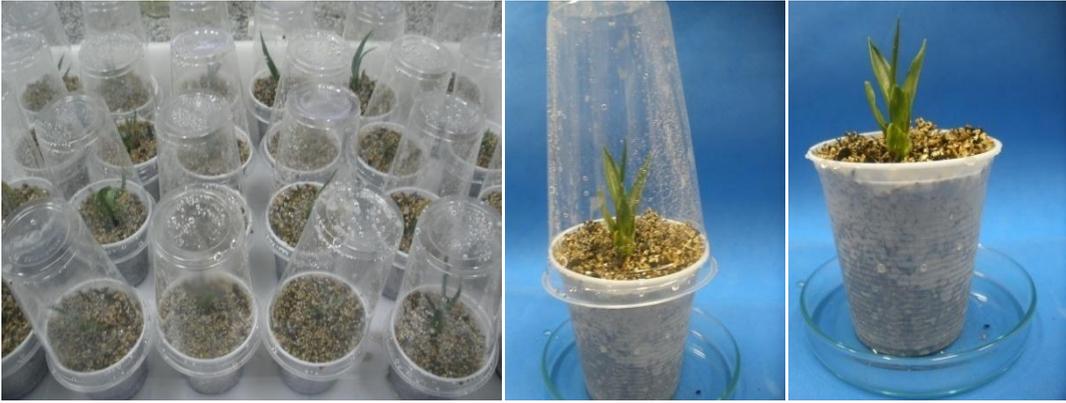


Figura 15 – Aclimatização de plântulas de sisal, após período de enraizamento

5. CONCLUSÕES

- A utilização do fungicida Baytan[®] e do antibiótico Citrofloxacino isolados e combinados, é fundamental na descontaminação de rebentos de sisal obtidos de plantas originárias do campo; sendo a combinação mais promissora 0,5% de Baytan[®] associada a 1% de Citrofloxacino;
- Concentrações de 12 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA são as mais indicadas para indução ao superbrotamento de explantes de sisal;
- A melhor combinação de TDZ e ANA para indução da morfogênese em rebentos de sisal é 10 mg.L⁻¹ TDZ e 0,1 mg.L⁻¹ ANA, respectivamente;
- No enraizamento de brotos de sisal é dispensável o uso de fitorreguladores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal**. 2010.100 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia , Bahia, 2010.

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

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola** Rio de Janeiro: Ministério do planejamento, orçamento e gestão. 126.p., 2011.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**. v. 20, n. 2, 2002.

CARVALHO, J.M.F.; ROCHA, R. W. C. **Curso de Cultivos de tecidos vegetais**. Circular técnico, DOC 157. Campina Grande: Embrapa - Algodão, 2006.

CARVALHO, J. M. F.; SENA, D. V. A. **Técnicas de Cultivo In Vitro no sisal**. Campina Grande: Embrapa – Algodão, 2008.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

CHOER, E.; MONKS, P.L.; FORTES, G.R.L. Calogênese e brotações adventícias em tecido somático de kiwi suplementados com Thidiazuron. **Ciência Rural**, v.27, n.3, p.369-373, 1997.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C.M.; SUASSUNA, N.D.; SILVA, O.R.R.F.; SUINAGA, F.A. **A Podridão do Tronco do sisal**. Circular Técnico, DOC 281. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.

ERIG, A.C.; FORTES, G.R.L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.577-582, 2002.

ERIG, A.C; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) Cvs. Galaxi, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.221-227, 2003.

- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*malus domestica* borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 575-58, 2004.
- FARIA, J.T.C. **Calogênese e Organogênese *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*)**. 1996. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1996.
- FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B . Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.292-299, 2009.
- FRÁGUAS, C. B; DORNELLES. C. M. V.; LIMA, G. P. P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-demel'. **Ciência Rural**, v.39, n.6, 2009.
- GONDIM, T. M. S; SOUZA, L. C. **Caracterização de frutos e sementes de sisal**. Circular Técnico, DOC 127. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009.
- GRAÇA, M.E.C.; KALIL FILHO, A.N.; MEDEIROS., A.C.S.; TAVARES, F.R. Efeito das citocininas benzilaminopurina e thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus Dumni Maid*. **Bol.Pesq. Fl**, n.43, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BISO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998.
- LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira oh x f971. **Ciência e agrotecnologia**, v.24, n.2, p.353-357, 2000.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CASIAN, R.L. 6-benzilaminopurina (bap) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*prunus* sp.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 n.1, 42-46, 2000.
- LIMA, E. F.; MOREIRA, J.A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, Q.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*agave sisalana* perr.) causada por *botryodiplodia theobromae* pat. **Revista Brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v.2, n.2, p.109-112, 1998.
- LIMA, J. D; MORAES, W. S. Concentração de Benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, p.13-19, 2006.
- MACÊDO, C. E. C.; SILVA, M.G.; NÓBREGA, F.S.; MARTINS, C.P.; BARROSO, P.A.V.; ALLOUFA, M.A.I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro

- L.Merril (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25,n.3, p.501-504, 2003.
- MANICKAM, V. S. ; MATHAVAN, R. E; ANTONISAMY, R. Regeneration of Indian gingeng plantlets from stem callus. **Plant Cell and Organ Culture**,v.26, p.181-185,2000.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, n.36, p.5-10, 2000.
- MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira Cv.Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.3, p.174-177, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- PEREIRA, L. V.; SILVA, C.R.R.; PINTO, J.E.B.P.; ALVARENGA, A.A. Efeito do BAP e do TDZ na produção de mudas de bananeira-“maçã” através da propagação rápida *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.230-233, 2001.
- PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.827-824, 2003.
- RIBEIRO, C. S. N.; SILVA. H.; SANTOS, J.W.; CARVALHO, J.M.F.C. Efeito do Tidiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14,n.4,p.366-371,2010.
- RODRIGUES, M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; MARTINOTTO, C.; SILVA JÚNIOR, J.M.S. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.21-26, 2009.
- ROSALES, M. S. D.; JIMÉNEZ, M.L.G.; GÓMEZ, C.R.; VALLES, C.Q.; LÉON, S.D.D.; ORDAZ, S.J.M.; BALCH, E.P.M. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conser vación de espécies del género Agave. **Investigación y Ciencia**, 2008.
- SÁ, J.O. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma spp.*** 2009., Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.
- SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.
- SALGADO, A. L. B; AZZINI, A. Efeito da omissão de macronutrientes em sisal. **Bragantia**, v.41, n.13, 1982.
- SANTOS; A. S. A; MACHADO, I.S.; LEÃO, A.L.; RAMOS, A.A. Concentração de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Anana erectifolius* L.B.Smith). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.32, 2005.

SAJID, Z. A.; AFTAB, F. Effect of Thidiazuron (TDZ) on *in vitro* micropropagation of *Solanum tuberosum* L. Cvs. Desiree and cardinal. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 1811-1815, 2009.

SARTORI, I. A.; GUERRA, D.S.; MARODIN, G.A.B. Aplicação de auxinas e incisão anelar em pessegueiros cv. Sentinela. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, 2003.

SHRAMA, A.R.; TRIGIANO, R.N.; WITTE, W.T.; SCHWARZ, O.T. *In vitro* adventitious rooting of *Cornus florida* micro shoots. **Scientia Horticulturae**. v.103, p.381-385, 2005.

SILVA, O. R. R. F; BELTRÃO, N. E. M. **O Agronegócio do sisal no Brasil**. Campina Grande: Embrapa – Algodão, 1999.

SILVA, R. P.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1331-1337, 2008.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NERY, F.C.; VARGAS, D.P.; SILVA, D.R.G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e agrotecnologia**, v.35, n.1, p.152-157, 2011.

SOUZA, A. V. ; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, F.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n.2, p. 267-269, 2007.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; ANAND, R.P.; ANBAZHAGAN, V.R. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuate*. **Plant Cell and Organ Culture**, v.61, p.23-28, 2000.

VICTOR, J.M.R.; MURCH, S.J.; KRISHNARAL.S.; SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: the role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. **Plant Growth Regulation**, 1999.