

# DESINFESTAÇÃO DE BULBILHOS E USO DE 6-BENZILAMINOPURINA EM *AGAVE SISALANA* NO CULTIVO *IN VITRO*

**Palavras-Chave:** AGAVE SISALANA, MICROPROPAGAÇÃO, CULTIVO *IN-VITRO*

**Autores(as):**

**Giovanna Rafaeli Rezende (autora), IB – UNICAMP**

**Me. Camila Gomes Cabral (coautora), IB – UNICAMP**

**Dr. Pollyana Karla da Silva (coorientadora), IB – UNICAMP**

**Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador), IB – UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

O gênero *Agave* compreende plantas monocotiledôneas da família *Agavaceae* e subfamília *Agavoidea*. Endêmicas das Américas, essas plantas robustas têm caule encurtado e grosso, com folhas em formato de rosetas, e são capazes de crescer em regiões semiáridas, com solos pobres em nutrientes. O Agave é amplamente utilizado para diversas finalidades: produção de fibras, bebidas, biomoléculas e ornamentação, e é dessa versatilidade aliada à grande quantidade de biomassa que surge a possibilidade de produzir biocombustível de qualidade e com capacidade de gerar menos impacto ambiental que a cana-de-açúcar (Baungratz, K. L. F. *et al.*, 2000); Goergen, L. 2015). No Brasil, a fibra de sisal, extraída de *Agave sisalana*, é amplamente cultivada no Nordeste, principalmente na Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte (da Silva, O. *et al.*, 2008).

Além da relevância econômica, o Agave também possui importância social, visto que seu cultivo é feito, em sua maioria, por pequenos produtores, fixando pessoas nesses locais, gerando emprego e ajudando a expandir o comércio em cidades no interior. Desse modo, a planta apresenta grande potencial de impactar positivamente comunidades do semiárido brasileiro (de Oliveira Cavalcante, G. 2022).

O cultivo *in vitro* é uma técnica biotecnológica amplamente utilizada no cultivo de tecidos vegetais, visto que permite que ocorra crescimento e multiplicação de células, órgãos e tecidos desses organismos. A partir dessa técnica, é possível a propagação de espécies com características desejadas, acelerando o processo de desenvolvimento e permitindo a produção em larga escala. No caso do Agave, essas técnicas são essenciais, já que naturalmente seu ciclo de vida é longo e demora de 8 a 9 anos para que uma inflorescência seja produzida em condições favoráveis ao crescimento (Borges, E. 2018; Bautista-montes, E et al J, 2022).

Embora a técnica de cultivo *in vitro* esteja bem estabelecida, seu uso requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada genótipo a ser trabalhado. Entre as etapas cruciais estão as de obtenção do material, desinfecção, introdução em meio de cultura adequado para o crescimento e subcultivo. A etapa de desinfecção consiste na remoção de microrganismos das amostras com o uso de desinfestantes químicos

adequados, visando evitar o crescimento concomitante de fungos e bactérias, que se multiplicam quando entram em contato com os nutrientes dos meios de cultivo (Sousa, G. *et al.*, 2007; da Silva, O. *et al.*, 2008). Esses fatores evidenciam a importância do cultivo *in vitro*, visto que se utilizando dessas técnicas é possível selecionar indivíduos saudáveis.

Na cultura de tecidos frequentemente são empregados reguladores de crescimento vegetais: substâncias de ocorrência natural ou sintética que, em pequenas quantidades, são capazes de induzir a proliferação celular, alongamento das células e diferenciação celular em tecidos específicos. Uma das substâncias amplamente utilizada é a 6-Benzilaminopurina (BAP), que é um hormônio sintético de ação citocinina que promove o crescimento por induzir a divisão celular e quebra de dominância apical (de Melo, N. F, 2002).

Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo otimizar um protocolo de desinfestação de bulbilhos de *Agave sisalana* que seja eficiente e economicamente viável para que seu cultivo *in vitro* seja eficaz, visando menores contaminações e melhores taxas de crescimento. Ademais, o estudo também visa analisar o impacto de diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP no tamanho das plântulas, quantidade de brotos e estabelecimento de raízes.

## METODOLOGIA:

Duas variedades de *A. sisalana* foram utilizadas: *A. sisalana* var.VNM e *A. sisalana* var. FTR16. Os bulbilhos *A. sisalana* var.VNM, (60 amostras vindas de Salvador - BA), e *A. sisalana* var. FTR16 (42 amostras vindas de Holambra - SP), tiveram suas folhas retiradas e a região meristemática mantida, sendo esta que será submetida ao processo de desinfestação. Os bulbilhos desfolhados passaram por sucessivas lavagens de acordo com os 4 protocolos testados, apresentados na tabela 1. Em seguida foi realizado corte transversal dos segmentos de bulbilho e sua introdução em meio Murashige e Skoog (Sais MS com vitaminas e nutrientes 4,44 g/L, sacarose 30 g/L, ágar 6,5 g/L, pH 5,8) acrescido das diferentes concentrações de BAP: BAP 0 (0 uM), BAP 1 (44.34 uM), BAP 3 (133.02 uM), BAP 5 (221.70 uM), BAP 7 (310.38 uM), e BAP 10 (443.40 uM).

Quanto aos protocolos de desinfestação foram avaliados os seguintes parâmetros de efetividade: presença ou não de microrganismos crescendo, tipo de microrganismo, crescimento da planta após à exposição ao protocolo de desinfestação. Nas diferentes concentrações de BAP foram observados o tamanho da plântula, presença/ausência de raiz e quantidade de brotos.

Após 80 dias de crescimento, as plântulas são transferidas para meio MS contendo 1mg/L de ácido indolbutírico (AIB) visando estimular o desenvolvimento de raízes. As raízes foram analisadas após 30 dias.

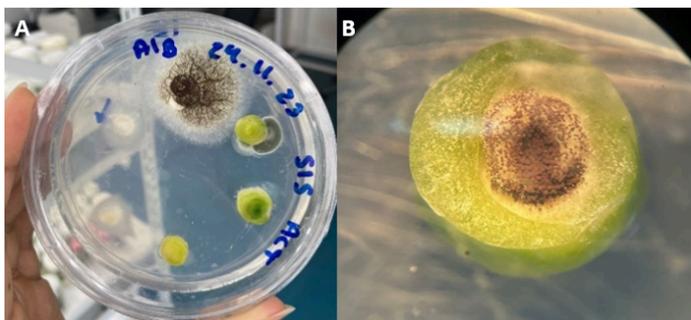
**Tabela 1:** Apresentação agentes, suas concentrações e tempo de exposição em cada protocolo

Agente	Concentração (%)	Tempo de exposição (min)	Protocolos			
			1	2	3	4
Detergente	-	5	X	X	X	X
Etanol	70%	2,5		X		
		3	X			X
Acetona	50%	2,5			X	
Hipoclorito de sódio	50%	20	X	X	X	
Hipoclorito de cálcio	0,01%	30				X

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram utilizadas diferentes concentrações de agentes químicos previamente reportados pela literatura com ação desinfestante - fungicida, bactericida -, tais como: hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, etanol, acetona e detergente. Concomitantemente, foi avaliada também a resposta de *A. sisalana* à diferentes concentrações da citocinina sintética 6-Benzilaminopurina (BAP).

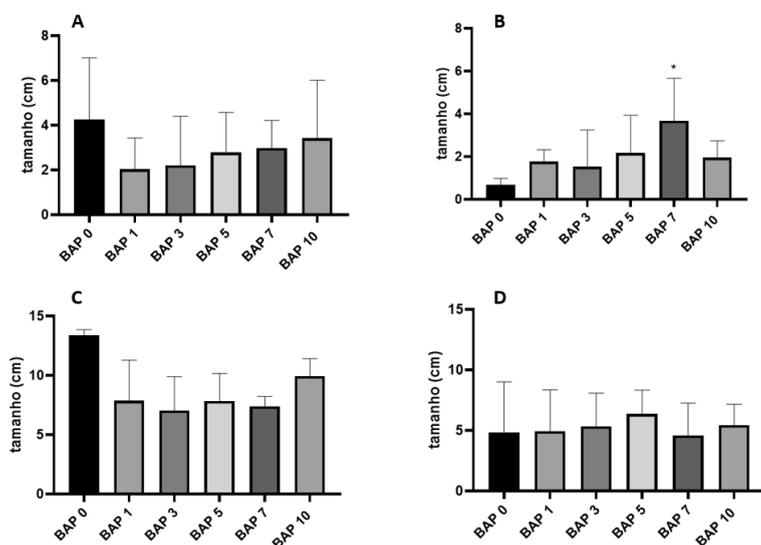
Quanto aos protocolos de desinfestação testados, os mesmos se mostraram efetivos para bactérias, mas não para alguns fungos filamentosos de aparente origem endógena. A literatura reporta que mesmo quando há a inserção de antibióticos e antifúngicos a taxa de contaminação é muito semelhante aos protocolos que somente se utiliza materiais como detergentes, hipoclorito de sódio e álcool (Nobrega, F. M. *et al.*, 2015). Uma possível relação entre tempo de armazenamento e intensidade de contaminação fúngica foi percebida, no entanto mais investigações são necessárias para concluir se esses são de fato fatores determinantes para maiores taxas de contaminação *in vitro*.



Dos 60 bulbilhos de VNM que foram introduzidos, 28 foram acometidas por contaminação fúngica filamentosa, de macromorfologia muito semelhante à do fungo *A. welwitschiae* causador da podridão vermelha (*Aspergillus welwitschiae*) (figura 1), uma doença que causa apodrecimento dos tecidos internos da planta, culminando em morte (Quintanilha-Peixoto, G., *et al.* 2022). No

experimento com FTR16 e na repetição do experimento com VNM, ambas responderam bem à desinfestação de acordo com o protocolo 2 (tabela 1), com exceção de alguns bulbilhos utilizados que apresentaram crescimento fúngico em seu interior.

Após 40 e 80 dias de crescimento foram observados o tamanho médio das plântulas, quantidade média de



brotos e média de plântulas com raiz das variedades estudadas (figura 2).

É notável que o tamanho médio das plântulas não varia muito nas diferentes concentrações de BAP, em contrapartida, a quantidade de brotos tem um aumento expressivo proporcional ao aumento da concentração da citocinina. Algo que também pôde ser observado é que a espessura das plantas também é maior nas que foram expostas à maiores concentrações de BAP. As plântulas de VNM em

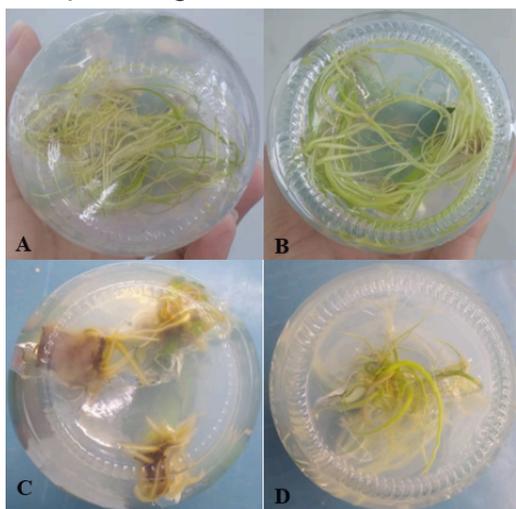
concentração de BAP 7 apresentaram crescimento estatisticamente relevante nos primeiros 40 dias, mas após 80 dias todas as concentrações utilizadas resultaram em tamanhos semelhantes (figura 2B e 2D). Fato semelhante foi reportado por Queiroz e colaboradores (2007), onde, além disso, foi descrito que houve uma queda no crescimento de brotos adventícios, mas grande formação de brotos laterais e crescimento dos mesmos.

Em relação ao enraizamento, todos os explantes foram inseridos na mesma concentração de AIB (1mg/L), para que fosse possível avaliar se este processo é afetado pela concentração de BAP anteriormente utilizada nos meios de cultura. Foi possível observar que na presença de AIB o enraizamento ocorre de maneira muito mais rápida do que o crescimento, visto que em menos de 30 dias já havia a presença de grandes raízes (tabela 2).

**Tabela 2:** Relação entre concentração de BAP anterior nas variedades de *A. sisalana* VNM e FTR16 e com a quantidade e tamanho médio das raízes após 30 dias de inserção no meio

Variedade de <i>Agave sisalana</i>	Quantidade de BAP (mg/mL)/L	Média de plantas por frasco	Média de raízes por planta	Tamanho médio das raízes(cm)
VNM	0	1,2	10	3,3
	1	3	10	4,1
	3	3,29	11	5,1
	5	2	11	4,8
	7	2,71	10	5,5
	10	3,25	10	4,6
FTR16	0	2	13	4,9
	1	2	12	6,9
	3	4,34	6	3,6
	5	3	5	1,8
	7	5	4	3,5
	10	4,37	4	1,6

Houveram diferentes respostas de enraizamento quando comparamos as duas variedades de *Agave sisalana* utilizadas. Com relação ao controle sem BAP, a variedade VNM na presença de BAP 1-10 apresentou grande tamanho médio de raízes independente da concentração utilizada (figuras 3A e 3B), o que pode indicar que o balanço de reguladores de crescimento endógeno da planta não foi tão afetado pela exposição prévia à



**Figura SEQ Figura \\* ARABIC 3.** Raízes de *Agave sisalana* após 30 dias em meio de cultura contendo AIB. A: *A. sisalana* var. VNM pós-BAP 1. B: *A. sisalana* var. VNM pós-BAP 10. C: *A. sisalana* var. FTR16 em pós-BAP 10. D: *A. sisalana* var. FTR16 em pós-BAP 1.

citocininas exógenas. Já na variedade FTR16, pode-se notar uma grande queda no tamanho das raízes nas plantas que tiveram seu crescimento induzido por maiores concentrações de BAP, quando comparado com o controle sem BAP, o que pode indicar maior sensibilidade a essa citocinina (figura 3C e 3D).

Foi hipotetizado que a concentração de citocinina utilizada poderia influenciar na formação de raízes por afetar o balanço endógeno de reguladores de crescimento, resultado semelhante encontrado em outras pesquisas realizadas (Nikam, T. D. *et al.*, 2003), onde foi descrito que maiores concentrações de BAP no meio causam dificuldade de enraizamento. Ao observar os dados na tabela 2, foi possível observar que a resposta à auxina AIB pode ser diferente de acordo com a variedade utilizada, visto que no período de 30 dias a variedade VNM produziu grandes raízes e

a variedade FTR16 não (figura 3).

## CONCLUSÕES:

Pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os diferentes protocolos de desinfestação testados, visto que todos foram efetivos contra bactérias, porém, fungos filamentosos ainda foram reportados, inclusive com macromorfologia similar ao *A. welwitschiae*. Estudos como o presente, são de suma importância, uma vez que foi possível reportar que protocolos de desinfestação de menor custo e menos agressivos possuem eficiência similar aqueles que utilizam antibióticos e/ou antifúngicos. Ademais, também pode-se concluir que a quantidade ideal de citocinina para estimular o crescimento difere entre variedades de Agave da mesma espécie, provando a necessidade de desenvolver protocolos para cada genótipo a ser estudado. Desse modo, percebeu-se que grandes quantidades de BAP não necessariamente resultam em mais crescimento e podem, ainda, afetar o balanço endógeno de reguladores de crescimento da planta, gerando dificuldades na etapa de enraizamento.

## BIBLIOGRAFIA

- BAUNGRATZ, K. L. F.; BISPO DE OLIVEIRA, J.; SLONGO, N.; PIRES FRIGO, E.; ZANON, E. PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE BIOMASSA RESIDUAL. *Acta Iguazu*, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 30–39, 2000.
- BAUTISTA-MONTES, E.; HERNÁNDEZ-SORIANO, L. & SIMPSON J. "Advances in the micropropagation and genetic transformation of Agave species." *Plants* 11.13 (2022): 1757.
- GOERGEN, L. "Produção de bioenergia a partir de biomassa vegetal e resíduo animal: exemplos da Alemanha e as perspectivas brasileiras." (2015).
- BORGES, E. "Desinfestação dos explantes do sisal (*Agave sisalana* Perrine) para o cultivo in vitro." (2018).
- DA SILVA, O.; et al. "Cultivo do sisal no Nordeste Brasileiro." (2008).
- DE OLIVEIRA CAVALCANTE, G. & ALMEIDA, H. "Diagnóstico socioambiental do cultivo do sisal (*agave* ssp) no recorte territorial de Pocinhos, PB." *Conjecturas* 22.8 (2022): 1092-1104.
- SOUSA, G.; et al. "Contaminação microbiana na propagação in vitro de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*." *Revista Brasileira de Biociências* 5.S1 (2007): 405-407.
- QUINTANILHA-PEIXOTO, G.; et al. "Phylogenomics and gene selection in *Aspergillus welwitschiae*: Possible implications in the pathogenicity in *Agave sisalana*." *Genomics* 114.6 (2022): 110517.
- NOBREGA, F.; et al. "Desinfestação de rebentos de sisal para utilização in vitro." (2015).
- NIKAM, T. D.; BANSUDE, G. M.; ANEESH KUMAR, K. C. "Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm)." *Plant cell reports* 22.3 (2003): 188-194.
- QUEIROZ, S. et al. "Organogênese e regeneração de brotos adventícios in vitro de sisal (*Agave sisalana* Per)." *Ornamental Horticulture* 13 (2007): 1271-1274.
- de MELO, N. F. "Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal." (2002).