

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Agave spp.* POR ORGANOGÊNESE INDIRETA

Palavras-Chave: Agave, Biocombustível, Transformação Gênica, Regeneração de Plantas

Autores:

Camila Santos Woloche - UNICAMP

Aline V. Corim Marim (coautora) - UNICAMP

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (orientador) - UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Carolina Rossi De Oliveira (co-orientadora) - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O uso de combustíveis fósseis é atualmente um dos principais catalisadores das mudanças climáticas. A emissão de gases de efeito estufa resultante da queima desses combustíveis contribui diretamente para o fenômeno do aquecimento global (Rocha *et al.*, 2013). Nesse contexto, a utilização de biocombustíveis, como o bioetanol, o biodiesel e o biogás, para geração de energia, emerge como uma alternativa aos combustíveis fósseis, auxiliando na atenuação dos efeitos negativos associados a eles (Bizerra, Queiroz e Coutinho, 2018).

Os biocombustíveis apresentam vantagens em relação aos combustíveis fósseis por serem provenientes de fontes de energia renováveis e menos poluentes. Além disso, considera-se que a emissão de carbono decorrente da combustão de biocombustíveis é neutra, uma vez que derivam de plantas, responsáveis pela absorção do carbono presente na atmosfera (Srivastava *et al.*, 2021). Assim, a crescente importância dos biocombustíveis na matriz energética os encaminha para um status mais sustentável, limpo e racional, resultando em um menor impacto ambiental.

Estudos têm apontado aspectos desfavoráveis no cultivo de certas culturas como a cana-de-açúcar, devido o uso de áreas previamente dedicadas à produção de alimentos, reduzindo assim a disponibilidade de terras para culturas destinadas à alimentação humana, ou até mesmo invadindo áreas de preservação de mata nativa (Moreira e Pessanha, 2009; Zajonz *et al.*, 2019). Nesse contexto, uma solução promissora é a produção de biocombustíveis a partir do Agave, uma planta originária do México, já conhecida por seu potencial fermentativo na produção de álcool, a tequila (Regeneration International, 2019), pois ao contrário da cana-de-açúcar, o Agave é uma planta perene xerófila, adaptada a regiões áridas e semiáridas, o que poderia torná-la uma opção viável para ocupar o sertão nordestino no Brasil, uma região pouco explorada e não comumente utilizada para o

cultivo de alimentos, devido a características edafoclimáticas pontuais, como elevadas temperaturas e pouca precipitação.

Atualmente, na região semi-árida nordestina é cultivada a espécie *Agave sisalana*, que é utilizada em larga escala para produção de fibras de sisal, indicando que o desenvolvimento destas plantas nestas regiões é difundido. Embora *Agave sisalana* tenha características de produção de fibras, seu potencial fermentativo existe e é pouco explorado. Além disso, indica a possibilidade de utilização de outras espécies do gênero *Agave* para ampliação da produção de biocombustíveis de forma sustentável e explorando as características das plantas deste gênero (Silva, 2022).

Diante do potencial de cultivo do *Agave* em regiões semi-áridas, é importante explorar a obtenção de variedades de *Agave* resistentes ou tolerantes à entressafra de cultivo, como matocompetição, pragas, doenças, resistência à seca, aumento de teores de açúcar, entre outros. Uma alternativa neste sentido, é a produção de plantas transgênicas, que apresentam a inserção de transgenes que conferem características de interesse agrônomo, gerando plantas com maior adaptabilidade. Entretanto, o gênero *Agave* apresenta característica genótipo-dependente (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011, Gao *et al.*, 2014) o que dificulta a obtenção de plantas transgênicas, uma vez que são necessários estudos específicos de regeneração de plantas *in vitro* para cada espécie do gênero.

O *Agave* é um grupo de mais de 200 espécies, originado no México e amplamente disseminado no país e em regiões áridas e semiáridas da América Latina. A domesticação do *Agave* pelo ser humano remonta a épocas tão antigas quanto a do milho, e até os dias de hoje a planta mantém significativa relevância econômica (Davis, Dohleman e Long, 2011).

No México, *Agave tequilana* é empregado na produção de tequila e outras bebidas como pulque e mezcal, todas derivadas dos açúcares presentes na planta. No Brasil, *Agave sisalana* é cultivado para a produção de sisal, uma fibra resistente, obtida das folhas da planta (Davis, Dohleman e Long, 2011). O Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo, com a Bahia contribuindo com 95% da produção (Sousa, 2015). O cultivo do *Agave* no sertão nordestino é fundamental para a economia local e para a fixação da população na região.

Apesar de o sertão nordestino apresentar condições desfavoráveis para o cultivo da maioria das plantas de interesse econômico, devido a fatores como solo pobre em nutrientes, altas temperaturas e baixa pluviosidade, o *Agave* prospera nessas condições. A eficiência da fisiologia do *Agave* em conservar água permite que suas plantações sejam mantidas sem necessidade de irrigação (Davis, Dohleman e Long, 2011). Além disso, o *Agave* também consegue se desenvolver normalmente em ambientes de alta pluviosidade.

Diversos fatores contribuem para a resistência do *Agave* à seca, uma característica dos ambientes áridos. O metabolismo CAM, por exemplo, possibilita que a planta realize a assimilação de carbono durante a noite, otimizando o uso da água de maneira mais eficiente do que em plantas com metabolismo C3 e C4 (como a cana-de-açúcar) (Duarte *et al.*, 2018). Adaptações como epiderme com cera, criptas estomáticas, reservatórios de água no mesófilo e raízes retráteis são outras

características do Agave que evitam a sua desidratação (Davis, Dohleman e Long, 2011). Além disso, ao contrário da maioria das plantas, cujo polissacarídeo de reserva é o amido, o agave armazena preferencialmente açúcares na forma de frutanos, chamados inulina e agavina. O acúmulo de frutanos no hidrênquima da planta também se mostra como uma adaptação à vida em climas áridos, associada à formação de grandes conchas de solvatação e até mesmo a propriedades de proteção biológica (Peréz-López e Simpson, 2020).

Diante disso, é evidente que o Agave se apresenta como uma matéria-prima promissora para a geração de energia, pois além de ser rico em carboidratos, também está altamente adaptado a climas áridos e semiáridos. Isso oferece vantagens como possibilidade de cultivar uma planta destinada à produção de energia sem competir com a produção de alimentos e a garantia de sua produtividade mesmo em um contexto de aquecimento global.

Em suma, dependendo do uso pretendido, o desenvolvimento de protocolos de regeneração para espécies de Agave está focado em vias regenerativas específicas (organogênese direta ou indireta) e o uso de reguladores de crescimento específicos também corresponde à resposta esperada. Além disso, é importante considerar que os resultados podem variar dentro do mesmo gênero sob condições de cultivo semelhantes (Ramirez-Malagón *et al.*, 2008; Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011, Gao *et al.*, 2014) e até mesmo genótipos diferentes da mesma espécie podem influenciar as respostas obtidas. Portanto, é fundamental estabelecer protocolos específicos para cada espécie de interesse comercial de Agave.

METODOLOGIA:

A partir da coleta de bulbilhos, estruturas oriundas da inflorescência de Agave, originados da propagação vegetativa de plantas (Gondim e Souza, 2009), obteve-se as amostras que passaram por limpeza: corte da raiz, corte da parte aérea e retirada das primeiras folhas a fim de diminuir partes contaminadas do material. Assim, esse material de aproximadamente 5 cm de altura, foi desinfetado em fluxo laminar pela seguinte ordem de lavagem: 1 minuto em álcool 70%, 1 lavagem com água destilada e esterilizada, 12 minutos em solução 1:1 cloro e água destilada e esterilizada, com uma gota de detergente e por último 3 lavagens com água destilada e esterilizada.

Os bulbilhos limpos foram cortados em rodela horizontalmente em tamanhos de 0,5 a 1 centímetro em meio MS (Murashigue & Skoog, 1962) líquido e colocados em placas de petri em meio de cultura a base de Maltose. Foram utilizados 30 bulbilhos por experimento de calogênese e cada bulbilho foi inoculado em uma placa, resultando assim em 30 placas por experimento. Os subcultivos dos explantes ocorreram a cada 2 semanas, sem alterar o tipo de meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A primeira calogênese realizada foi utilizado três bulbilhos de IAC2 originados de tecido de cultura, ou seja, totalmente estéreis e em ambiente controlado desde sua origem. No qual gerou explantes tanto da região meristemática quanto de folhas de bulbilhos. Já nos testes seguintes de

calogênese, do segundo ao nono, as espécies de *Agave* variaram entre IAC4, *A. wercley* e *A. wercley var gigante azul* conforme a disponibilidade de espécies coletadas.

Ao longo dos experimentos foram encontrados alguns entraves para o desenvolvimento de calos de *Agave*. O primeiro foi a contaminação por endobactéria da própria *Agave*, o que levou ao acréscimo de antibiótico Timentin no meio de cultura a partir da calogênese nº6. Assim como a falta de calos que levou a consulta de outras bibliografias sobre o *Agave*, no qual Leucona-Guzmán *et al.* (2017) constatou que o subcultivo foi realizado a cada 2 meses para a geração de calos em *A. angustifolia*, e assim foi modificado o tempo de trocas do meio de cultura. As calogêneses 7 e 8 ainda tiveram um repique enquanto a calogênese 9 não foi trocada nenhuma vez após sua inoculação. Ainda assim, por má aparência dos explantes foi trocado o modo de assepsia na calogênese 9, realizando mais branda.

Após 5 meses de experimentos, poucos testes obtiveram resultados positivos para o que foi considerado possíveis calos de *Agave*. Desse modo foi levantado algumas modificações feitas em cada teste que obteve resultados positivos a fim de chegar no protocolo que gerou os tais calos obtidos. A calogênese 1 obteve alguns calos após 3 meses de teste, seu diferencial foi a falta de subcultivo, mantendo os explantes no mesmo meio até gerar calos e a única que utilizou cortes de folhas inteiras, desde sua base até seu ápice, e foram nestes explantes que foi originado os calos.

A calogênese 7 resultou em poucos calos após 2 meses e meio, seu diferencial na metodologia foi a pausa na troca de meio de cultura a cada 2 semanas. O teste 7 passou pela primeira troca aos 22º dia, depois ficou 55 dias corridos sem subcultivo. Entretanto, a calogênese 8 que passou pela mesma pausa de subcultivos após a primeira troca, não gerou calos, deixando em questão se realmente foi a pausa dos repiques que possibilitou a formação de calos.

E o último resultado obtido foi a calogênese 9, que resultou em calos no menor espaço de tempo até então, com 6 semanas de experimento. Suas modificações ocorreram no modo de assepsia e também na falta de subcultivo, não realizando se quer a primeira troca de meio de cultura. Segundo Gao *et al.* (2014) e Leucona-Guzmán *et al.* (2017), a produção de calogênese em *Agave* híbrido No. 11648 e *A. angustifolia*, respectivamente, demoram em torno de 2 meses. Porém, pela planta do *Agave* ser genótipo dependente, não é possível levar esse tempo como regra para a produção de calos nas espécies trabalhadas nesta pesquisa. De qualquer forma, desde o primeiro teste até o último, o tempo de formação de calos diminuiu consideravelmente.

CONCLUSÕES:

Conclui-se assim, que os testes de calogênese estão gerando resultados ao longo do tempo, tendo em vista que outras bibliografias já relataram a demora deste processo. Mesmo assim, conforme as dificuldades foram observadas, analisadas e modificações foram feitas, os resultados obtidos foram cada vez melhores. E é esperado, que até o fim do projeto, um protocolo de organogênese indireta para as espécies de *Agave* utilizadas seja comprovado e aplicado em outros projetos. Facilitando assim a transformação gênica de *Agave*.

BIBLIOGRAFIA

- BIZERRA, A.M.C.; QUEIROZ, J.L.A.; COUTINHO, D.A.M. **O impacto ambiental dos combustíveis fósseis e dos biocombustíveis: as concepções de estudantes do ensino médio sobre o tema.** Revista Brasileira de Educação Ambiental (Revbea), São Paulo, V. 13, No 3: 299-315, 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/zneiman,+artigo19corrigido.pdf>
- CASTRO, E. M. **Efeitos do ácido naftalenoacético em plantas de Agave.** Documento online. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/70648/1/EFEITOS-DO-ACIDO-NAFTALENOACETICO-264.pdf>
- DAVIS, S. C., DOHLEMAN, F. G., LONG, S. P. **The global potential for Agave as a biofuel feedstock.** GCB Bioenergy, vol. 3, no. 1, pp. 68–78. 2011. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01077.x..
- DUARTE, E. A. A. *et al.* **Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil.** Front. Microbiol., vol. 9, Jun/2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.01227/full> .
- GAO, J. *et al.* **Expression of a hevein-like gene in transgenic Agave hybrid No. 11648 enhances tolerance against zebra stripe disease.** Plant Cell Tissue Organ Cult, 119, 579–585. 2014.
- GONDIM, T.M.S.; SOUZA, L.C. **Caracterização de Frutos e Sementes de Sisal.** Circular técnica nº127, Campina Grande, PB. Novembro, 2009. ISSN 0100-6460. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17804/1/CIRTEC127.pdf >
- MOREIRA, R.C.CG.S., PESSANHA, L. **Segurança alimentar e a controvérsia entre a produção de alimentos e a de bioenergia no Brasil.** Xx Congresso Brasileiro De Economia Doméstica. Fortaleza - CE. 2009. Disponível em: <http://www.xxcbcd.ufc.br/arqs/public/t_24.pdf>
- PERÉZ-LÓPEZ, A. V. e SIMPSON, J. **The Sweet Taste of Adapting to the Desert: Fructan Metabolism in Agave Species.** Front. Plant Sci., vol. 11, no. March, pp. 1–5. 2020. doi: 10.3389/fpls.2020.00324.
- Ramírez-Malagón, R. *et al.* **In vitro propagation of three Agave species used for liquor distillation and three for landscape.** Plant Cell Tiss Organ Cult 94, 201–207 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Regeneration International. **Billion Agave Project - Regeneration International.** 2019. Disponível em: <https://regenerationinternational.org/billion-agave-project>
- REIS, I.N.R.S., LAMEIRA, O.A, CORDEIRO, I.M.C.C. **Efeito do 2,4-D na Indução de Calos in vitro de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby).** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, supl. 2, p. 498-500. Porto Alegre. jul. 2007. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82612/1/452-2301-1-PB.pdf >
- ROCHA, G.O. *et al.* **Química sem fronteiras: o desafio da energia.** Química Nova. São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1540-1551, 2013.
- RODRÍGUEZ-SAHAGÚN *et al.* **Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of Agave tequilana Weber var. Azul.** Plant Cell Tiss Organ Cult (2011) 104:271–275
- SILVA, T.C. **Uso de metanálise para avaliação do potencial energético do uso da biomassa residual da extração da fibra de sisal.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco. 2022. Disponível em: https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/4474/1/tcc_tassiacristinadasilva.pdf
- SOUSA, E.J.S. **Ocupação e uso do solo pela cultura do agave sisalana no território de identidade do sisal – semiárido da bahia.** UFRB. Bahia. 2015. Disponível em: https://www.ufrb.edu.br/pgsolos/images/DISSERTA%C3%87%C3%95ES/2015/Disserta%C3%A7%C3%A3o_SQE_-_Elane__Joise_Sales_de_Sousa.pdf
- SRIVASTAVA, R.K., SHETTI, N.P., REDDY, K.R., KWON, E.E., NADAGOUDA, M.N., e AMINABHAVI, T.M. **Biomass utilization and production of biofuels from carbon neutral materials.** Environ. Pollut., vol. 276, p. 116731, 2021, doi: 10.1016/j.envpol.2021.116731.
- ZAJONZ, B.T., LANZA, T. PAULI, R.I.P., FREITAS, C.A. **Biocombustíveis e segurança alimentar: uma análise crítica.** Santa Maria, RS. Universidade Federal de Santa Maria. 2019. Disponível em: <https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/533/2019/05/BIOCOMBUST%C3%8DVEIS_E_SEGURAN%C3%87A_ALIMENTA.pdf>