



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

ELDER MIGUEL ESPERIDIÃO SILVA BORGES

**DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DO SISAL (*Agave sisalana*
Perrine) PARA O CULTIVO *IN VITRO*.**

**SUMÉ - PB
2018**

ELDER MIGUEL ESPERIDIÃO SILVA BORGES

**DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DO SISAL (*Agave sisalana*
Perrine) PARA O CULTIVO *IN VITRO*.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dr^a. Ana Verônica do Nascimento.

Co-orientadora: Dr^a. Julita Maria Frota Chagas Carvalho.

**SUMÉ - PB
2018**

B732d Borges, Elder Miguel Esperidião Silva.
Desinfestação dos explantes do sisal (*Agave sisalana* Perrine)
para o cultivo *in vitro*. / Elder Miguel Esperidião Silva Borges. - Sumé
- PB: [s.n], 2018.

40 f.

Orientadoras: Professora Dr^a. Ana Verônica do Nascimento.
Professora Dr^a. Julita Maria Frota Chagas
Carvalho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro
de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso Superior de
Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. *Agave sisalana* Perrine. 2. Fungicida. 3. Micropropagação. I.
Título.

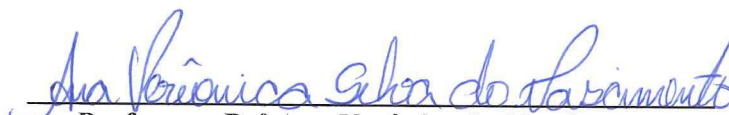
CDU: 632.932(043.1)

ELDER MIGUEL ESPERIDIÃO SILVA BORGES

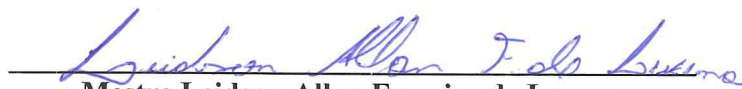
**DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DO SISAL (*Agave sisalana*
Perrine) PARA O CULTIVO *IN VITRO*.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

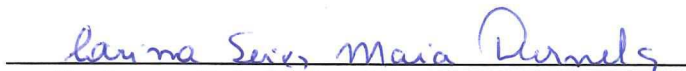
BANCA EXAMINADORA:



**Professora Dr^a Ana Verônica do Nascimento.
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG**



**Mestre Leidson Allan Ferreira de Lucena.
Examinador I – Técnico em Laboratório UAEB/CDSA/UFCG**



**Professora Dr^a. Carina Seixas Maia Dornelas.
Examinador II – UATEC/CDSA/UFCG**

Trabalho aprovado em: 21 de junho de 2018.

*Dedico este trabalho a minha
família, que nunca mediu
esforços para me proporcionar
uma boa educação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida e por toda força, saúde e coragem concedidas durante toda minha caminhada.

Aos meus pais, Manoel Esperidião Sobrinho e Maria da Glória Silva Esperidião, que sempre me ensinaram os verdadeiros valores de um homem, cultivando a educação e o respeito em primeiro lugar, por nunca medirem esforços para estarem dispostos a me ajudar, com paciência e incentivo, em cada uma das coisas que faço, mesmo na distância. Aos meus irmãos Emanuelton, Emanuel e Elaine, pela parceria e convivência durante esses anos. Vocês são minha fortaleza!

As minhas amigas e companheiras de apartamento, Catarina Buson e Jéssica Leite, pela confiança e companheirismo durante todo o tempo que estivemos juntos. Compartilhamos tristezas e muitas alegrias. A nossa convivência me fez bem. Amo vocês.

Ao meu eterno QG: Caio Azevedo, Canígia Galvão, Darlyson Guimarães, Felipe Ravelly, Laura Araújo e Mônica Rocha, que me acompanharam durante toda a graduação e estão presentes na minha vida até hoje. O apoio e ajuda de vocês foram essenciais para a realização desse trabalho. Sem vocês essa caminhada teria sido ainda mais difícil. Obrigado pelo apoio e inesquecíveis momentos de descontrações.

A Lívia Malta, Breno Lino e Geórgia Machado, pelos grandes laços de amizade que se fortalecem cada vez mais e por toda força e ajuda.

Aos professores, do CDSA, pelas experiências trocadas, ajudas concedidas e oportunidades oferecidas.

Ao Professor Dr. Bruno Nunes, um profissional no qual eu procuro me espelhar, que sempre me ajudou nos mais diversos problemas da vida acadêmica. Um profissional impar e com uma integridade sem igual. Foi pouco o tempo de nossa convivência, mas o aprendizado foi e está sendo gigante. Torço muito pelo seu sucesso.

A EMBRAPA pela disponibilidade do Laboratório de Cultivo de Tecidos Vegetais, onde esta pesquisa foi desenvolvida.

A Dione e Juarez, pelas inúmeras contribuições para este trabalho. Obrigado por toda ajuda e por sempre estarem de prontidão.

A minha coorientadora Dra. Julita Carvalho, por ter aberto os caminhos da cultura de tecidos vegetais, me deixando um legado de conhecimentos dessa área de atuação.

A minha orientadora Professora Dra. Ana Verônica, por me acompanhar desde sempre, me incentivando e oferecendo grandes oportunidades de aprendizado e crescimento profissional. Obrigado por toda confiança em mim depositada, e por ser essa magnífica professora. Aprendi bastante com a Senhora.

Ao Dr. Leidson Allan por todo auxílio e paciência. Sem sua ajuda esse trabalho não seria o mesmo. Muito obrigado.

A banca examinadora: Professora Dra. Carina Seixas Maia Dornelas e o Dr. Leidson Ferreira de Lucena. Obrigada pelas contribuições.

A todos que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho, meu muito obrigado.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou”.

Eclesiastes 3:1-2

RESUMO

Sisal, ou *Agave sisalana* Perrine é conhecida no mundo inteiro pelo alto teor de fibras, onde são aplicáveis nos mais variados setores da indústria (automotiva, química e civil). Essa Agavácea possui extrema importância socioeconômica para todo o mundo, principalmente para o Brasil, o qual se destaca como maior exportador de fibras de sisal do mundo. A propagação convencional dessa planta se dá por meio de bulbilhos em sua fase de inflorescência, depois do oito a nove anos de cultivo. Nesse contexto, objetivou-se com esse trabalho, realizar a desinfestação dos explantes de *Agave sisalana* Perrine através da utilização de diferentes fungicidas e antibióticos para o cultivo *in vitro*. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultivo de Tecidos Vegetais da Embrapa Algodão, no período de outubro de 2017 à maio de 2018. Para a desinfestação dos explantes, foi realizado a lavagem dos bulbos em água corrente e detergente neutro, em seguida foram deixados numa solução de detergente neutro a 4% (v/v). Após enxágue completo e já em câmara de fluxo laminar, os explantes foram submersos em solução de álcool 70% (v/v), em seguida em solução de formaldeído a 1% (v/v) e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (v/v). Logo após, foram separados: em gemas apicais e gemas laterais, e em seguida foram submetidos a nove tratamentos utilizando antibióticos (0,01% (m/v)) e fungicidas (0,3% (m/v)). Em seguida foram cultivados em meio básico $1/2$ MS suplementados com 1,5% de glicose e 0,23 % de Phytigel[®] e pH ajustado para 5,7. Os frascos foram armazenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16h de luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os tratamentos foram avaliados quanto a sobrevivência e contaminação dos explantes após 10, 20 e 30 dias de cultivo. Após a análise estatística, foi observado que o fator tempo não apresentou diferença significativa, quanto que o fator tratamento apresentou. O tratamento que mostrou melhor resultado foi o Tratamento T4 (fungicida Euparen[®] e nenhum antibiótico) com uma taxa de desinfestação de 55,95% e uma taxa de brotos vivos de 40%. Com isso, a utilização de antibióticos e fungicidas no mesmo tratamento, não é eficaz para a desinfestação de explantes, enquanto que o uso em separado se comporta de modo eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: *Agave sisalana* Perrine. Desinfestação. Fungicida. Micropropagação.

ABSTRACT

Sisal, or *Agave sisalana* Perrine is known throughout the world for its high fiber content, where it is applicable in a wide range of industries (automotive, chemical and civil). This Agavácea has extreme importance socioeconomic for the whole world, mainly for Brazil, which stands out as the largest exporter of sisal fibers in the world. The conventional propagation of this plant occurs through bulbs in its inflorescence phase, after eight to nine years of cultivation. In this context, the objective of this work was to disinfect the *Agave sisalana* Perrine explants through the use of different fungicides and antibiotics for in vitro culture. The research was carried out in the Laboratory of Vegetable Tissue Culture of Embrapa Cotton, from October 2017 to May 2018. For disinfection of the explants, the bulbs were washed in running water and neutral detergent, then left in a 4% (v / v) neutral detergent solution. After complete rinsing and in a laminar flow chamber, the explants were submerged in 70% (v / v) alcohol solution, then in 1% (v / v) formaldehyde solution and sodium hypochlorite solution (NaOCl) to 2% (v / v). Afterwards, they were separated into apical buds and lateral buds, and then were submitted to nine treatments using antibiotics (0.01% (m / v)) and fungicides (0.3% (m / v)). They were then cultured in 1/2 MS basic medium supplemented with 1.5% glucose and 0.23% Phytigel® and pH adjusted to 5.7. The vials were stored at 25 ± 2 ° C under a photoperiod of 16 h light and light intensity of $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Treatments were evaluated for survival and contamination of explants after 10, 20 and 30 days of culture. After the statistical analysis, it was observed that the time factor did not present significant difference, as much as the treatment factor presented. The treatment that showed the best result was the T4 Treatment (Euparen® fungicide and no antibiotic) with a disinfection rate of 55.95% and a 40% live sprout rate. Thus, the use of antibiotics and fungicides in the same treatment is not effective for the disinfection of explants, while the use in a separate way behaves efficiently

KEY WORDS: *Agave sisalana* Perrine. Disinfection. Fungicide. Micropropagation.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>A. sisalana</i> (Sisal).....	19
Gráfico 1. Cluster obtido a partir dos nove tratamentos em seus respectivos intervalos de tempos, a partir do teste PERMANOVA.....	29
Gráfico 2. Análise da Frequência de amostras desinfestadas e contaminadas por fungos, bactérias e fungos + bactérias ao longo dos tempos.....	29
Figura 2. Explantes de <i>A. sisalana</i> (Sisal) após o processo de desinfestação.....	32
Gráfico 3. Frequência dos explantes sobreviventes ao final de cada tratamento.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos aplicados na desinfestação dos explantes de <i>A. sisalana</i> (Sisal).....	26
Tabela 2 - Análise de permutação multivariada (PERMANOVA) entre os tipos de tratamentos x tempo.....	28

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CDSA Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

DNA cido Desoxirribonucleico

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

MS Meio de Cultura Murashige & Skoog (1962)

RNA cido Ribonucleico

UFCG Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	SISAL: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CONFLITOS NA SUA PRODUTIVIDADE.....	18
3.2	CULTIVO DE TECIDOS.....	20
3.3	MICROPROPAGAÇÃO.....	21
3.4	MEIO DE CULTIVO.....	21
3.5	ASSEPSIA PARA O CULTIVO DE TECIDOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	LOCAL E PERÍODO DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	25
4.2	EXPLANTES.....	25
4.3	DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES.....	25
4.4	MEIO DE CULTIVO.....	26
4.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6	CONCLUSÕES.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

As regiões áridas e semiáridas no mundo são caracterizadas pelas frequentes estiagens, devido ao baixo período de precipitação anual, que limita o recurso da água nestes locais. Assim, o sistema agrícola no semiárido brasileiro (e.g. Caatinga) enfrenta dificuldades em atingir sua potencialidade produtiva. Isso se deve principalmente à falta de acesso à água nestas regiões. Assim, a busca de mecanismos que contribuam para potencializar a economia nas sociedades que dependem dos sistemas agrícolas para sua subsistência torna-se um desafio (SILVA *et al.*, 2014). O gênero *Agave* possui aproximadamente 200 espécies, destas 150 são relatadas no México (Garcia-Mendoza, 2007, apud CANDEIAS *et al.* 2016). A espécie *Agave sisalana* Perrine é a mais cultivada no Brasil, pois possui características que a tornam mais adaptadas às condições de clima seco e altas temperaturas. A fibra contida em suas folhas é amplamente utilizada na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft (de alta resistência) e outros tipos de papel fino, cordas, tapetes e utensílios, até mesmo sendo utilizada na indústria química, civil e automobilística (VARGAS *et al.*, 1996).

Silva & Beltrão (1999, apud ALVES *et al.*, 2005) mencionam que o potencial produtivo do sisal está intimamente ligado à capacidade genética da planta, as condições edafoclimáticas, sanidade e aos tratamentos culturais. Sua produtividade vem sendo ameaçada por fungos como o *Aspergillus niger*, patógeno facultativo causador da doença podridão vermelha que, quando em contato com a planta hospedeira, faz com que ela perca sua capacidade de produzir fibras de qualidades, causando muitos problemas que interferem na cadeia produtiva, por exemplo, desgaste na área de plantio e enfraquecimento das plantas, tornando-as mais suscetíveis a outras doenças. Em certos casos levando o agricultor a abandonar a lavoura (ALVES, 2005).

A propagação convencional desta planta ocorre principalmente por bulbilhos produzidos na inflorescência. Esta forma de propagação é dificultada pela lentidão do processo de floração que ocorre depois de 8 a 9 anos de cultivo em solo, mesmo assim não produzindo sementes viáveis (SILVA *et al.*, 2013). Processos biotecnológicos, em especial as técnicas de cultura de tecidos vegetais, representam uma alternativa para a propagação dessa espécie (CARNEIRO *et al.*, 2014). A exemplo, técnicas de micropropagação tem possibilitado a manipulação de plantas de maneira mais controlada.

Nelas podemos controlar os fatores abióticos e bióticos propiciando um maior potencial germinativo das espécies vegetais estudadas, possibilitando assim, a obtenção e sustentação de bancos de espécies vegetais livres de doenças (CARNEIRO *et al.*, 2014). Porém, como estas

técnicas utilizam o cultivo *in vitro*, um fator crucial a ser controlado é a contaminação por bactérias e fungos. Logo, a assepsia, tanto dos explantes quanto do material, torna-se necessária para a realização do cultivo (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2010). Pierik (1997) menciona quatro fatores que interferem diretamente no sucesso do cultivo: (i) a fonte do explante; (ii) o meio de cultivo; (iii) o ambiente; e (iv) as habilidades do operador. Hirata & Mancini-Filho (2002) falam ainda que para a realização da desinfestação dos explantes, várias substâncias químicas são utilizadas e podem ser adicionadas no meio de cultivo, por exemplo, o uso de hipoclorito de sódio ou de cálcio, etanol (geralmente na concentração de 70% ou 80%), soluções a base de formol ou carvão ativo e, também, substâncias que possuem ação germicidas ou bacteriostáticas (e.g. antibióticos e fungicidas). Além dos explantes, o material utilizado para a desinfestação e para o cultivo *in vitro* deve estar totalmente esterilizado e livre de qualquer microrganismo exógeno. Basicamente são duas as fontes de esterilização, por meio de calor (seco e úmido) ou por radiação ultravioleta (PASQUAL *et al.*, 2010).

Desta forma, os meios de cultivo tem a finalidade de fornecer todos e quaisquer nutrientes e substâncias necessárias para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* dos organismos (UNEMOTO, 2007). Cada espécie possui suas particularidades e exigências quanto ao meio nutricional, esse é um fator decisivo para o estabelecimento de um meio nutritivo e que atenda a essas necessidades (PEREIRA *et al.*, 2006). Logo, desenvolver e entender mecanismos que auxiliem em uma maior eficácia das técnicas de micropopagação é fator primordial para as técnicas de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a desinfestação dos explantes de *Agave sisalana* Perrine através da utilização de diferentes fungicidas e antibióticos para o cultivo *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar qual(is) tratamento(s) fornece(m) uma maior taxa de descontaminação dos explantes de Sisal;
- Analisar a influência dos diferentes fungicidas e antibióticos na desinfestação;
- Verificar a porcentagem de explantes sobreviventes ao final de todos os tratamentos.

3 REFERENCIEL TEÓRICO

3.1 SISAL: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E CONFLITOS NA SUA PRODUTIVIDADE

O Sisal, é perfeitamente adaptada a sobreviver em regiões desérticas ou semidesérticas. É uma planta endêmica da América Central, mais precisamente na zona árida e semiárida de Yucatã, México Central (CARVALHO & SENA, 2008; MEDINA, 1954). Por se adaptar muito bem ao clima quente, com pouca precipitação e muita luminosidade, o sisal foi levado do México para outras regiões do mundo, e a partir daí começou a ser mundialmente cultivado e comercializado (MEDINA, 1954).

Esta cultura foi difundida em muitos países como: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Espanha, Itália, Panamá, Peru e Venezuela. Além da importância ornamental do sisal, muitas espécies possuem alto valor agregado na indústria por ser uma grande fonte de matéria prima na síntese de diversos subprodutos de importância comercial (DEVESA, 1997).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de sisal. Estima-se que 80% da produção brasileira de sisal destina-se ao mercado externo (CONAB, 2015). No Brasil, O estado pioneiro a cultivar e trabalhar com o sisal foi a Paraíba no ano de 1903. Atualmente, três estados do nordeste se destaca em sua produção de sisal: Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte, isso devido as suas favoráveis condições climáticas (SILVA, 2010).

O Sisal é considerada a maior fonte de fibras vegetais duras do mundo, e sua aplicabilidade é imensa, perpassa desde as indústrias de celulose, alimentos, farmacêuticas e química até aos mais diversos artesanatos. Um bom comparativo entre as fibras sintéticas e do sisal, é que a primeira dura em média 150 anos para degradar na natureza, já a segunda precisa apenas de poucos meses e quando já está em fase de decomposição atua como biofertilizante natural para o solo (JUNIOR, 2006; GONDIM & SOUZA, 2009).

De acordo com Silva *et al.*, (2008), o sisal apresenta as seguintes características morfológicas: folhas rígidas, lisas, esverdeadas e com sua terminação pontiaguda, com aproximadamente 10cm de espessura e 1,5cm de comprimento, onde as mesmas se desenvolvem em torno de um bulbo central (Figura 1).

Figura 1 - Exemplar de *A. sisalana* (Sisal).



Fonte: Silva, 2008.

No Nordeste, basicamente tem-se dois tipos de sisal a ser plantado: *A. sisalana* e o Híbrido 11648, ambos amplamente cultivados na região (SOUZA SOBRINHO *et al.*, 1985). A diferença do híbrido e da *A. sisalana* é que o híbrido possui melhor produção de fibras, maior resistência à seca, a pragas e a enfermidades (e.g. a podridão vermelha). Porém, o Híbrido 11648 possui uma desvantagem em relação a *A. sisalana* é quanto a extração das folhas, pois são muito largas o que demanda mais esforço na operação de máquinas no desfibramento das folhas (SILVA & BELTRÃO, 1999; SOUZA SOBRINHO *et al.*, 1985).

Apesar de sua importância, nos últimos anos houve um decaimento contínuo desta cultura causando boa redução de área cultivada, produção e produtividade. São vários os fatores que influenciaram na queda da cadeia produtiva do sisal. O baixo índice de aproveitamento da planta ($\leq 4\%$), concorrência com as fibras sintéticas, o alto custo inicial na implantação de zonas de produção, o número reduzido de linhagens adaptadas às zonas produtoras, o não aproveitamento de resíduos gerados após o desfibramento, a falta de manejo apropriado, a ausência de máquinas adequadas para o beneficiamentos e, mais recentemente, a podridão do tronco, doença que tem prejudicado ainda mais o uso desta cultura, são exemplos que tem interferido na produção e produtividade da planta (ALVES *et al.*, 2004). Porém, as doenças que interferem no mecanismo fisiológico da planta tem preocupado os produtores dessa agavácea, pois elas causam danos irreversíveis podendo levar o organismo vegetal a morte (COUTINHO *et al.*, 2006). A podridão do tronco é

uma enfermidade que causa escurecimento do tecido interno do tronco. As áreas que são infectadas pelo agente causador da doença apresentam coloração que varia desde o cinza escuro até o rosa pálido e se estende desde a base das folhas até a base do tronco. Plantas em estágio avançado desta doença ficam com as folhas amareladas e o tronco apodrece por completo (BOCK, 1965).

3.2 CULTIVO DE TECIDOS

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta originada a partir da biotecnologia onde células, tecidos, órgãos e/ou até mesmo plantas inteiras são desconexos de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados de modo asséptico em um meio nutritivo, sob condições controladas de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e temperatura (CARVALHO, 2011). Para que se obtenha um bom resultado no cultivo *in vitro*, se faz necessário considerar alguns fatores como composição do meio de cultivo, ambiente de cultivo e o genótipo estudado. Objetivando sempre obter uma planta nova porém idêntica à original, essa técnica pode ser definida como uma propagação de células a fim de se obter um novo indivíduo, desde que se mantenha seu genótipo exatamente igual ao seu ancestral (TORRES *et al.*, 2000). Esta técnica possibilita a obtenção de um grande número de plantas em um reduzido espaço físico e tempo, sendo então uma boa forma de multiplicação de indivíduos (SANTOS, 2003).

Elucidada em 1838 por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, a teoria da totipotencialidade afirma que cada célula possui autonomia, ou seja, contém seu potencial necessário para originar um novo organismo completo; no caso, uma planta completa (BARRUETO CID, 2001), sendo este um dos primeiros fundamentos do cultivo *in vitro*. Deste modo, é de se esperar que a exposição dos explantes a um ambiente *in vitro* excite algumas reações em diversos tipos celulares, fazendo com que haja resposta dessas células e leve à regeneração de um novo indivíduo. Entretanto, todas essas reações e estímulos devem ocorrer em meio e condições que favoreçam os mesmos (TAMBARUSSI, 2009; BARRUETO CID, 2001).

O cultivo de tecidos se mostra uma ferramenta de destaque para a clonagem de plantas em escala mais ampla, além de contribuir nos estudos de transformação genética e na criação e manutenção de bancos de germoplasma resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores. A partir da segunda metade do século XX é que foi possível enxergar os inúmeros avanços que esta técnica fornece, desde a descoberta dos reguladores de

crescimento, germinação e crescimento *in vitro*, conservação de germoplasma, fusão de protoplastos, diferenciação, produção de metabólitos secundários, mutagênese, hibridação, entre outros, provando que esta técnica possui potencial para inúmeras áreas de pesquisa (QUISEN & ANGELO, 2008).

3.3 MICROPROPAGAÇÃO

Micropropagação ou propagação *in vitro* de plantas, é uma técnica que objetiva propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou quaisquer similares de vidro (por isso, o termo *in vitro*), sob boas condições de nutrição, assepsia e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (BARRUETO CID, 2001; CARVALHO, 2006).

É de grande relevância destacar a importância do tipo de explante a ser utilizado, assim como a sua manipulação. Logo, a micropropagação *in vitro* pode ser aplicada a partir da multiplicação da proliferação das gemas axilares, propagação mediante indução de gemas adventícias utilizando organogênese direta ou indireta e a multiplicação por meio de embriogênese somática (GRATTAPABLIA & MACHADO, 1998; CARVALHO, 1999; TAKAHASHI, 2002).

Para a propagação do sisal, é escolhido duas fontes da planta: os rebentos que se originam dos rizomas subterrâneos a partir de uma planta-mãe ou os bulbilhos que após as quedas das flores, são produzidos no escapo floral (SILVA & BELTRÃO, 1999). Quando se trata de propagação *in vitro* de agaváceas, tem-se aplicado diversos artifícios: usando segmentos caulinares e foliares, bulbilhos, sementes, calos, meristemas, gemas ou embriões zigóticos. A maior parte dessas técnicas focaliza principalmente na grande multiplicação através de gemas adventícias e axilares (conjunto de células meristemáticas que quando estimuladas se desenvolvem, gerando novos indivíduos) (CARVALHO & SENA, 2008).

3.4 MEIO DE CULTIVO

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem todas e quaisquer substâncias fundamentais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de organismos. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, devem ser conservadas em material *in vitro*.

Os meios de cultivo fundamentam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais que as mesmas necessitam para um bom desenvolvimento (UNEMOTO, 2007). A busca por alternativas quanto à composição dos meios de cultivo que se atendam às necessidades do organismo vem crescendo cada vez mais. O meio de cultura adequado depende basicamente de cada espécie, pois cada uma delas tem suas exigências a serem supridas. Embora se conheçam diferentes métodos adequados no cultivo de tecidos vegetais, o mais conhecido e mais utilizado é o meio MS, por se destacar pela alta concentração de sais minerais (MURASHIGE & SKOOG, 1962; PEREIRA *et al.*, 2006).

Os componentes fundamentais de um meio de cultivo são elegidos de acordo com as necessidades de cada planta, sendo eles compostos de: macronutrientes (nitrogênio, potássio, ferro, cálcio, fósforo e magnésio), micronutrientes (cobre, zinco, cloro, iodo, cobalto, níquel, alumínio, boro, manganês e molibdênio), fonte de carbono (glicose, sacarose, açúcar, etc.), vitaminas (biotina, tiamina, mioinositol, etc.) além de reguladores de crescimento que vai depender basicamente do objetivo do trabalho (BARRUETO CID, 2001).

Outro componente básico para os meios de cultivo é o agente solidificante. Existem na forma líquida, sólidos e semissólidos. No meio dos sólidos e semissólidos são utilizados como solidificante o ágar (obtido a partir de algas marinhas), o phytigel (extraído de algumas bactérias) e o amido, por exemplo. A seleção do agente geleificante depende da espécie da planta que se está manuseando e também das condições de cultivo (FERREIRA *et al.*, 1998).

3.5 ASSEPSIA PARA O CULTIVO DE TECIDOS

Na cultura de tecidos vegetais a assepsia é um dos fatores de maior impacto na qualidade dos resultados. Ela possui um conjunto de técnicas e procedimentos para tornar o cultivo do explante totalmente livre de impurezas e microrganismos (leveduras, fungos filamentosos, fungos, bactérias etc.) (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2010).

Existem basicamente quatro fontes de contaminação: (i) a origem do explante; (ii) o meio de cultivo; (iii) o ambiente; e (iv) o operador (habilidade de manuseio) (PIERIK, 1997). Com isso, o explante deve ser totalmente desinfestado antes da realização do cultivo evitando contaminações por microrganismos exógenos.

No processo de esterilização é de fundamental importância o uso de agentes germicidas e bacteriostáticos (e.g. uso de hipocloritos de sódio - encontrado em formulações comerciais de água sanitária; ou hipoclorito de cálcio - encontrado na forma de pó em lojas especializadas) (GRATTAPALIA & MACHADO, 1998). Outros compostos utilizados na desinfestação são os diversos tipos de álcoois, antibióticos, antifúngicos, formol e carvão ativo na tentativa de minimizar a contaminação (PASQUAL *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2007). O material a ser utilizado nos cultivos, assim como no meio de cultura, devem estar totalmente esterilizados, seja por calor úmido (através de autoclave) ou por calor seco (utilizando estufas), afim de eliminar totalmente os microrganismos presentes. Com relação aos demais aparelhos necessários para o cultivo como pinças, bisturis e tesouras estes devem ser sempre flambados no interior da câmara de fluxo laminar, sendo este um ambiente totalmente estéril, entretanto deve-se sempre limpá-la com álcool 70% e esterilizá-la com radiação UV antes de se iniciar quaisquer trabalhos, tudo isso para eliminar qualquer microrganismo que venha a surgir, causando contaminação e perda de material (PASQUAL *et al.*, 2010).

Outro problema no cultivo *in vitro* é a porcentagem de contaminação por fungos e bactérias durante a propagação, o que podem gerar inviabilidade econômica, perda de material e até mesmo o surgimento de espécies cada vez mais resistentes aos agentes inibitórios destes microrganismos, tendo em vista que a aplicação indevida de agentes antimicrobianos leva a mutações gerando microrganismos resistentes (LONG *et al.*, 1988). Leifert *et al.* (1994) verificaram que em laboratórios da Alemanha, Inglaterra e Holanda, houve cerca de 10% a 35% de contaminação causada por fungos, gerando assim perda de material. Em laboratórios brasileiros, a taxa de contaminação foi superior a 30%, isso devido à presença tanto de fungos como de bactérias oportunistas, mesmo como todo o protocolo de assepsia já bem definido (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

A contaminação por bactérias afeta de modo negativo no desenvolvimento dos indivíduos. Esse tipo de contaminação se caracteriza por ser o mais comum e a mais problemática, pois essas podem ser sistêmicas e de difícil detecção. A aplicação de antibióticos de amplo espectro para o controle e eliminação de microrganismos contaminantes é de fundamental importância para o sucesso do cultivo *in vitro*, podendo-se adicionar ao meio de cultivo ou realizar lavagem dos explantes. Os antibióticos mais utilizados no cultivo de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não propriamente bactericida (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Outro modo de minimizar a contaminação por microrganismos no cultivo *in vitro*, é através da utilização de fungicidas, que age diretamente na destruição ou na inibição do crescimento fúngico. A aplicação de fungicidas sistêmicos, que se caracterizam por serem absorvidos para o interior da planta, é o mais eficaz para o cultivo, tendo em vista que o mesmo se distribui de forma uniforme ao longo do explante (ISAAC, 1992). Os fungicidas agem diretamente na inibição da divisão celular dos fungos impedindo a ocorrência da mitose (HAMMERSACHLAG & SISLER, 1973).

Três são os fungos que interferem de forma mais agressiva as plantações e o cultivo do sisal: o *Aspergillus niger* (WALLACE & DIEKMAHNS, 1952); *Pythium aphanidermatum* (BOCK, 1965) e *Lasiodiplodia theobromae* (LIMA *et al.*, 1998). Até o ano de 1998, acreditava-se que no Brasil, apenas a espécie *L. theobromae* era causadora da podridão. Entretanto, *A. niger*, já relatado em trabalhos desenvolvidos na África, ocorria em campos de sisal no Brasil (LIMA *et al.*, 1998). As podridões causadas pelos fungos são geradas por lesões de origem mecânica ou fisiológica, que propiciam a entrada do parasita no hospedeiro (WALLACE & DIEKMAHNS, 1952; LOCK, 1962; LIMA *et al.*, 1998; BOCK, 1965). Associadas a essas lesões, há também os fatores ambientais, como estresse hídrico, excesso de água no solo, falta de drenagem, deficiência de minerais e também a umidade relativa que favorecem a infecção (BOCK, 1965).

A. niger é o fungo de maior destaque quando se trata de podridão do sisal, tanto por ser muito frequente em contaminações em sisaleiros quanto pelo seu alto grau de severidade nas plantações (LOCK, 1962). Este microrganismo se distingue dos outros por causar dois tipos de podridão (a seca - causada somente por fungos; e a úmida - uma associação de fungos e bactérias). A podridão úmida é caracterizada pela relação mutualística entre o fungo *A. niger* e bactérias do gênero *Erwinia*, elas degradam todo o tecido da planta (BOCK, 1965).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultivo de Tecidos, no setor de Biotecnologia da Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB, no período de outubro de 2017 a maio de 2018.

4.2 EXPLANTES

Foram utilizados como plantas-mãe, 36 indivíduos do gênero *Agave*, Híbrido 11648 cultivado nos campos da Embrapa Algodão. Plantas jovens de 25 a 40 cm de altura foram selecionadas no campo, em seguida foram retiradas suas folhas, cortadas as raízes e levadas ao laboratório para a utilização nas etapas subsequentes.

4.3 DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Os bulbos foram lavados em água corrente e detergente a fim de se retirar todo o excesso de solo. Em seguida foram imersos em solução de detergente a 4% (v/v) durante 2h. Logo após, foram lavados em água corrente para a retirada total do excesso de detergente. Os bulbos foram levados até a capela de fluxo laminar previamente desinfestada e foram deixados em água estéril por 24h. Após esse tempo, foram submersos em solução de álcool 70% (v/v) durante 1min, em seguida em solução de formaldeído a 1% (v/v) por 1 min e em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (v/v) por 20min. Após esses procedimentos de desinfestação os explantes foram separados em gemas apicais e gemas laterais e, em seguida, ambas foram submetidas a nove tratamentos utilizando as combinações de 02 antibióticos (0,01% m/v) durante 10min e 02 fungicidas (0,3% m/v) durante 20min, como segue na Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos aplicados na desinfestação dos explantes de *A. sisalana* (Sisal). Sendo: Fungicida 1: Vitavax[®] (Carboxin 200g/L + Thiram 200g/L); Fungicida 2: Euparen[®] (Tolifluanida 50%); Antibiótico 1: Bactrim[®] (Sulfametoxazol 800mg + Trimetoprima 160mg) e Antibiótico 2: Cipro XR[®] (Cloridato ciprofloxacino monoidratado 338,4mg + ciprofloxacino 253mg).

TRATAMENTO	COMBINAÇÃO
T1	SEM FUNGICIDA X SEM ANTIBIÓTICO
T2	FUNGICIDA 1 X SEM ANTIBIÓTICO
T3	SEM FUNGICIDA X ANTIBIÓTICO 1
T4	FUNGICIDA 2 X SEM ANTIBIÓTICO
T5	FUNGICIDA 1 X ANTIBIÓTICO 1
T6	FUNGICIDA 1 X ANTIBIÓTICO 2
T7	FUNGICIDA 2 X ANTIBIÓTICO 1
T8	FUNGICIDA 2 X ANTIBIÓTICO 2
T9	SEM FUNGICIDA X ANTIBIÓTICO 2

Fonte: autor.

4.4 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado foi o meio básico $1/2$ MS (MURASHIGE & SKOOG; 1962) suplementado com 1,5% de glicose e 0,23 % de Phytigel[®] e pH ajustado para 5,7. Depois de dissolvido e distribuído 25 mL por frasco, os meios foram autoclavados a 121°C e 1 atm durante 20 min e devidamente vedados a fim de evitar contaminação. No interior da câmara de fluxo laminar e com material cirúrgico (pinças e bisturis) e placas de petri, previamente esterilizados em estufa, os explantes foram separados e cultivados. Cada frasco recebeu um explante, totalizando 20 frascos por tratamento. Os frascos foram armazenados em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16h de luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para comparar diferenças nos tratamentos utilizados (Tabela 1) ao longo do tempo de 10, 20 e 30 dias com base nos contaminantes observados, análises multivariadas não-paramétricas foram realizadas usando o Primer 6 (v.6.1.13) com extensão PERMANOVA+ versão 1.0.3 (CLARKE & GORLEY, 2006; ANDERSON *et al.*, 2008).

Uma matriz quantizada foi montada baseada nos tipos de contaminantes relacionada ao

longo do tempo. Assim, atribuiu-se valores para as amostras não contaminadas (1), contaminadas apenas por fungo (2), apenas por bactéria (3) e com fungo + bactéria (4), desta forma quantizando os dados (*quantitizing data*), o que possibilitou extrair informações mais precisas do experimento. Os dados foram transformados pela raiz quadrada.

Na matriz foram considerados dois fatores fixos (Tratamento x Tempo). Uma análise de agrupamento pelo vizinho mais próximo e mais distante foi feita, pretendendo realçar em grupos os dois fatores testados, por meio de uma análise de similaridade através da distância Euclidiana. Para testar os efeitos das interações das similaridades entre Tratamento x Tempo (fatores fixos), uma análise permutacional de variância (PERMANOVA), com 999 permutações aleatórias não restritivas, foi aplicada para testar diferenças entre os sintomas observados no delineamento experimental. O teste de Monte- Carlo foi aplicado para validação da PERMANOVA. Verificou também a frequência de ocorrência por contaminantes ao longo do tempo e a frequência de indivíduos vivos no final do experimento, indivíduos estes que conseguiram sobreviver ao processo de assepsia e ataque dos microrganismos.

Uma análise de cluster com a matriz de similaridade dos dados quantizados foi realizada para discriminar quais tratamentos contribuíram na variação dos indivíduos ao longo do tempo. Este teste foi realizado utilizando o Primer 6 (v. 6. 1. 13) com a extensão PERMANOVA+ versão 1.0.3 (CLARKE & GORLEY, 2006; ANDERSON *et al.*, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de permutação multivariada (PERMANOVA) mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ($p = 0,001$), porém não mostrou diferenças ao longo do tempo ($p = 0,146$). Os diferentes tipos de tratamentos utilizados foi o fator principal que interferiu no processo de desinfestação, sem levar em consideração o tempo analisado (Tabela 2).

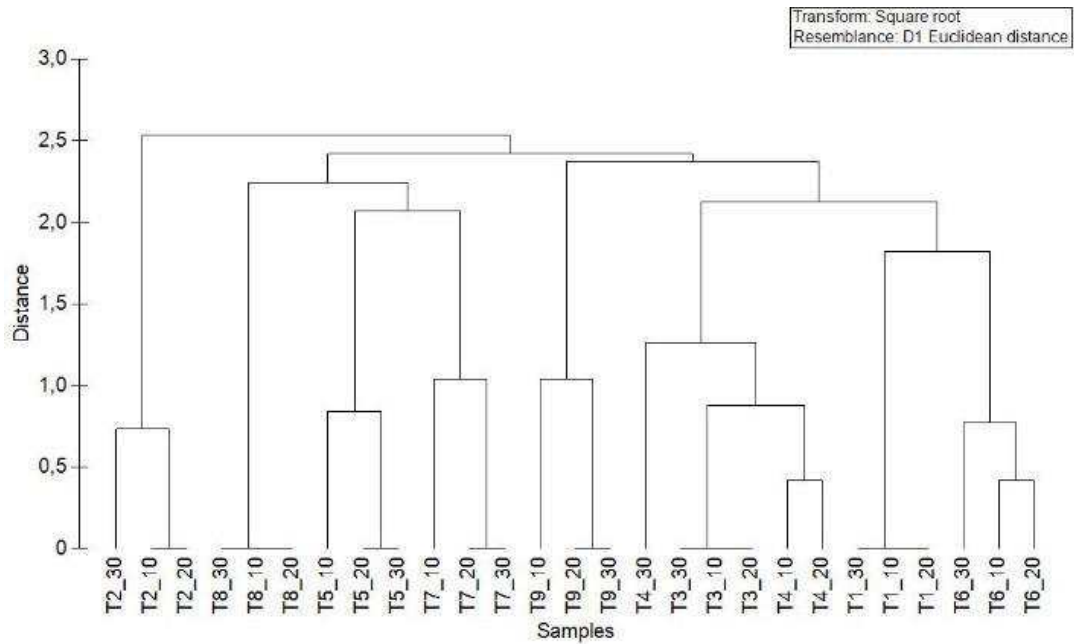
Tabela 2. Análise de permutação multivariada (PERMANOVA) entre tipos de tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T9) x tempo (10, 20 e 30 dias). Onde: GL – Graus de Liberdade; DP – Desvio Padrão; QM – Quadrado Médio; p (MC) – Teste de Monte Carlo; ns – não significativo; * - significativo.

	GL	DP	QM	Pseudo-F	p (perm)	Permutações	p (MC)
Tempo	2	0,5406	0,2703	1,4398	0,129	996	0,146 ^{ns}
Tratamento	8	63,507	7,9384	42,284	0,001	998	0,001*
Resíduos	16	3,0038	0,1877				
Total	26	67,051					

Fonte: autor.

O Gráfico 1, mostra o desempenho dos nove tratamentos ao longo do tempo através de uma análise de similaridade pela distância Euclidiana com a formação de um *cluster*. Percebemos a formação de grupos bastante similares ao longo do tempo, porém divergindo entre os tratamentos, com exceção dos tratamentos T3 e T4 que apresentaram um desempenho mais similar, quando comparados a T1, T2, T5, T6, T7, T8 e T9.

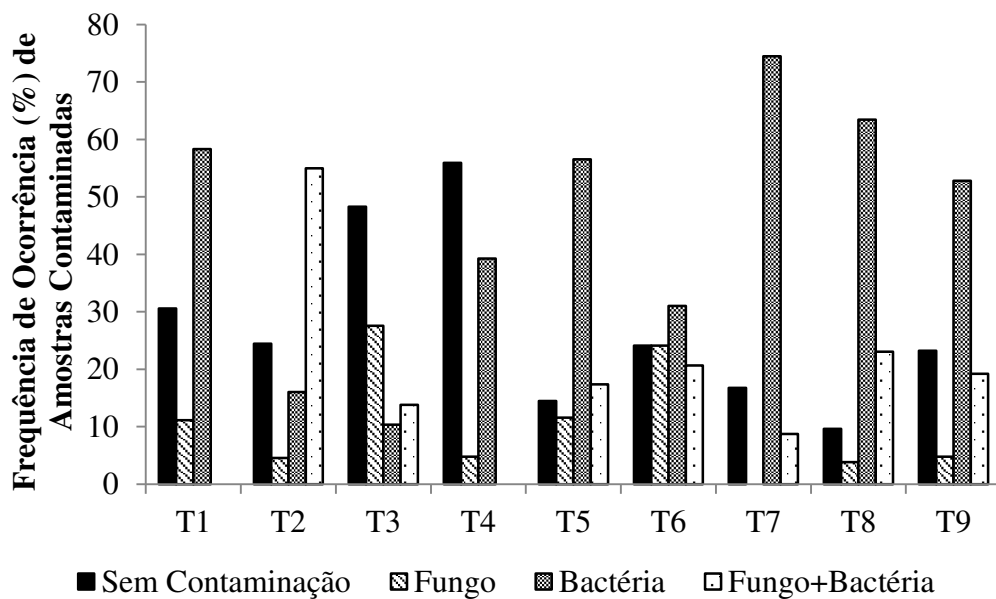
Gráfico 1 - Cluster obtido a partir dos nove tratamentos em seus respectivos intervalos de tempos, a partir do teste PERMANOVA.



Fonte: autor.

O Gráfico 2 mostra o desempenho dos tratamentos frente ao percentual de desinfestação dos explantes. Observou-se que o T3 e T4 apresentaram respostas mais expressivas por possuírem menor percentagem de contaminação.

Gráfico 2 - Análise da Frequência de amostras desinfestadas e contaminadas por fungos, bactérias e fungos + bactérias ao longo dos tempos.



Fonte: autor.

O Tratamento T1 apresentou uma resposta na desinfestação dos explantes de 30,55%, apesar do mesmo não ter utilizado nenhuma das substâncias analisadas (antibióticos e/ou fungicidas) (Gráfico 2). Isso mostra que a utilização dos compostos a base de hipoclorito de sódio, álcool e formaldeído já agem na desinfestação (SILVA *et al.*, 2012; NÓBREGA *et al.*, 2015).

O hipoclorito de sódio (NaOCl), inibe o crescimento microbiano devido ao seu alto pH, que interfere totalmente na integridade da membrana plasmática dos microrganismos com inibição enzimática irreversível, além disso há alterações biossintéticas no metabolismo celular e também na degradação de fosfolipídios (ESTRELA *et al.*, 2002). O álcool na concentração de 70% age diretamente na desnaturação de proteínas (ANDRADE *et al.*, 2002) e o formaldeído atua na formação de radicais livres fazendo com que as proteínas não sejam capazes de realizar suas funções. Além do mais, a utilização de álcool e formaldeído em conjunto, potencializa ainda mais a ação de ambos (RUI *et al.*, 2011). Todavia, a aplicação dos antibióticos e fungicidas reforçam o processo de desinfestação de explantes.

O Tratamento T2, foi fundamentado na utilização do fungicida Vitavax[®] e a não utilização de antibiótico. Este apresentou uma taxa de desinfestação de 24,43%, uma taxa de contaminação por fungo de 4,58%, contaminação por bactéria de 16,03% e contaminação de fungo e bactéria de 54,96% (Gráfico 2). A aplicação do fungicida inibiu o crescimento de fungo, porém propiciou o crescimento do conjunto fungo + bactéria. Caldas, *et al.*, (2011), observou em seus trabalhos um alto índice do crescimento de microrganismos em conjunto (fungo + bactéria), mesmo utilizando fungicida na desinfestação de seus explantes.

Vitavax[®] é um fungicida sistêmico de ampla aplicação em diversas culturas, incluindo soja, feijão, trigo e sisal (CARVALHO *et al.*, 2011). Seu mecanismo de ação é baseado nos ligamentos de seus constituintes (Carboxin + Thiran) ao complexo succinato- redutase ubiquinona (complexo II) impedindo o fluxo de elétrons, que por sua vez é etapa fundamental para a respiração celular. Ou seja, o Vitavax[®] age interrompendo o ciclo de respiração das células, fazendo com que as mesmas não produzam ATP, devido à falta de energia e causando a morte celular (GHINI & KIMATI, 2002).

O Tratamento T3, onde consistiu na utilização do antibiótico Bactrim[®] e a não utilização de fungicida, apresentou uma taxa de desinfestação de 48,29%, uma taxa de contaminação por fungo de 27,58%, uma taxa de contaminação por bactéria de 10,34% e uma taxa de contaminação por fungo e bactéria de 13,79% (Gráfico 2).

A utilização deste antibiótico inibiu o crescimento bacteriano, enquanto a não utilização de fungicida propiciou o crescimento de fungos (BARRUETO CID & DURZAN, 2003; PALU, 2011). Costa *et al.*, (2007) observou vantagens na aplicação de antibióticos no cultivo *in vitro*, uma vez que esses compostos auxiliam não somente na desinfestação de explantes, mas também na sobrevivência dos mesmos após a desinfestação.

Bactrim[®] é um antibiótico composto formado por duas substâncias, o sulfametaxazol e a trimetoprima, que agem de modo sinérgico (ação conjunta, em que uma substância potencializa a ação da outra). Ambos atuam de forma bacteriostática, inibindo o crescimento microbiano ao invés de matá-los. Essas substâncias agem de modo a impedir a formação de ácido fólico, que por sua vez é um precursor para a síntese do material genético (DNA e RNA). Também é característica do Bactrim[®] atuar principalmente em bactérias Gram-negativas, aquelas que possuem uma membrana menos espessa e formada basicamente por peptídeoglicanos e por lipoproteínas (MELO *et al.*, 2012).

O Tratamento T4, se deu pela utilização do fungicida Euparen[®] e a não utilização de antibiótico. Como resposta, esse tratamento apresentou uma taxa de desinfestação de 55,95%, uma taxa de contaminação bacteriana de 39,28% e uma taxa de contaminação por fungos de 4,76%. Não houve contaminação pelo conjunto fungo e bactéria (Gráfico 2). A ação deste fungicida inibiu satisfatoriamente o crescimento de fungos, enquanto que a não utilização de antibiótico ocasionou uma menor porcentagem de amostras contaminadas por bactérias (COLOMBO, *et al.*, 2004; BRESSAN, *et al.*, 2015).

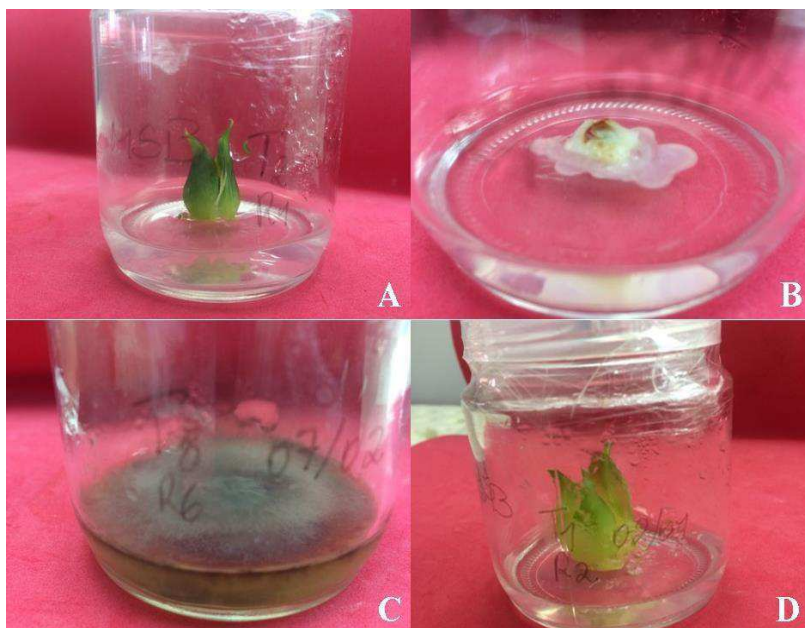
Euparen[®] é um fungicida sistêmico altamente aplicável em diversas culturas (milho, soja, sisal, algodão e feijão) e sua forma comercial é formada por 50% de tolifluanida e 50% de materiais inertes (BRESSAN *et al.*, 2015). O mecanismo de ação desse constituinte ainda é desconhecido, não se sabe ao certo sua atuação sobre os microrganismos (CARVALHO, *et al.*, 2012). Nóbrega *et al.*, (2015) obtiveram resultados bastante satisfatórios quando aplicaram o fungicida citado na desinfestação de gemas apicais e axilares de *A. sisalana*. Estes autores observaram altas taxas de desinfestação utilizando este fungicida. Uma característica marcante do Euparen[®] é que o mesmo atua de modo promissor e eficaz em três espécies de fungos: *Aspergillus spp.*, *Fusarium moniliforme* e *Penicillium oxalicum* (PINTO, 1996; COLOMBO *et al.*, 2004).

Oliveira *et al.*, (2004), observaram que a utilização de fungicidas no processo de desinfestação desempenha um bom resultado na inibição do crescimento de microrganismo oportunistas (fungos e bactérias).

Os Tratamentos T5, T6, T7 e T8, que consistem na interação entre os antibióticos Bactrim® e Cipro XR® e os fungicidas Euparen® e Vitavax® (Tabela 1), apresentaram as taxas de desinfestação de 15%, 25%, 17% e 10% respectivamente (Gráfico 2).

Apesar de se ter utilizado a combinação dos compostos (antibióticos e fungicidas), foi observado uma resposta bem inferior quando comparado aos outros tratamentos (Gráfico 2). Cabral *et al.* (2003), observaram perda de quase 100% de explantes por contaminação fúngica e bacteriana devido a aplicação de antibiótico e fungicida no mesmo processo de desinfestação. Fernandes *et al.*, (2005), também verificou a combinação desses dois compostos e concluiu que os mesmos quando utilizados em conjunto são ineficazes na desinfestação (Figura 2). É necessário um estudo antes de se estabelecer quais antibióticos e quais fungicidas serão aplicados para o cultivo, tendo em vista que a reação de ambos é algo que reduz o sucesso do desenvolvimentos dos explantes e podem chegar a causar perda total de material (CALDAS, *et al.*, 2011).

Figura 2 - Explantes de *A. sisalana* (Sisal) após o processo de desinfestação. A – Explante saudável. B- Explante com contaminação bacteriana. C- Explante com contaminação fúngica. D – Explante sadio. Todos observados após o processo de desinfestação de 30 dias



Fonte: autor.

A utilização de antibióticos e fungicidas em um mesmo tratamento acabou gerando uma inibição química. Esse fenômeno acontece devido ao fato de que grupamentos químicos que não possuem afinidade entre si, acabam neutralizando a ação um do outro. Os tratamentos citados anteriormente (T5, T6, T7 e T8), propiciaram uma taxa de contaminação maior, justamente devido a essa anulação dos compostos.

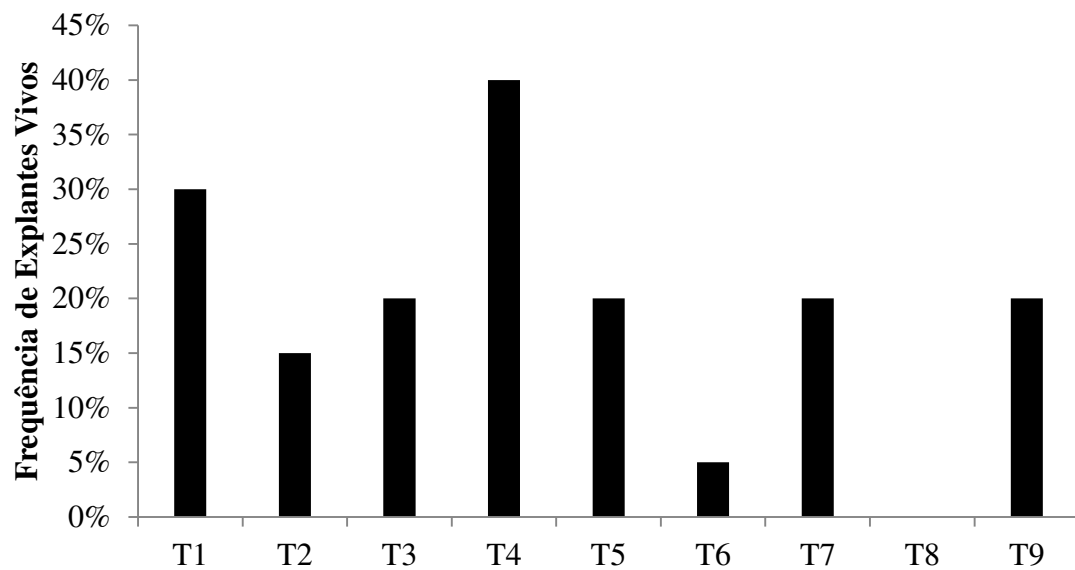
O Tratamento T9 se deu pela a utilização do antibiótico Cipro XR[®] e pela não utilização de fungicida. De acordo com o Gráfico 2, foi verificado que o mesmo apresentou uma taxa de desinfestação de 23,22%, taxa de contaminação por fungo de 4,8%, taxa de contaminação por bactéria de 52,8% e contaminação de fungo e bactéria de 19,2%. Leone (2013) verificou a eficiência de vários antibióticos no cultivo *in vitro* concluindo que o Cipro XR[®] apresenta baixa ação inibitória contra bactérias, ou seja, não é eficaz.

Cipro XR[®] é um antibiótico que possui atividade contra uma gama de microrganismos (gram-negativos e gram-positivos). Sua ação bactericida se dá pela inibição da topoisomerase bacteriana do tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV, que são constituintes necessários para a replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano. Uma vez que essa rota é interrompida, o microrganismo não consegue sobreviver (MELO *et al.*, 2012). Algumas bactérias conseguem ainda adquirir resistência ao Cipro XR[®], isso se dá pelo fato do surgimento de mutações espontâneas e em uma alta frequência, ou seja, o antibiótico em questão não consegue atuar de forma inibitória quando há mutações consecutivas (MELO *et al.*, 2012).

Outro fator importante a ser ressaltado, é o número de brotos sobreviventes a cada tratamento (Gráfico 3). Todos esses compostos químicos utilizados, de certa forma são agressivos aos explantes e em alguns casos pode chegar a matá-los (SILVA *et al.*, 2012; NÓBREGA *et al.*, 2015; BARRUETO CID & DURZAN, 2003; COSTA *et al.*, 2007; PALU *et al.*, 2011).

O Gráfico 3 mostra a porcentagem de explantes vivos ao final dos tratamentos. O Tratamento T1, apresentou uma boa porcentagem de explantes sobreviventes (30%). O Tratamento T4, mostrou a melhor porcentagem de brotos vivos (40%), mesmo aplicando o fungicida Euparen[®]. Os demais tratamentos, se comportaram de modo agressivo aos explantes, demonstrando uma taxa de brotos vivos igual ou inferior a 20% (COLOMBO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2013).

Gráfico 3 - Frequência dos explantes sobreviventes ao final de cada tratamento.



Fonte: autor.

Mesmo com a utilização do composto Euparen[®] no Tratamento T4, a resposta obtida para o número de brotos vivos foi bem satisfatória (Gráfico 3), isso mostra que a aplicação desse constituinte químico não somente desinfestou os explantes, mas também possibilitou sua sobrevivência após o tratamento. Silva *et al.*, (2013), ao aplicar o fungicida citado obtiveram resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho para o cultivo de *A. sisalana*, mostrando que a utilização deste fungicida foi eficaz no processos de desinfestação de *A. sisalana*.

6 CONCLUSÕES

- Os Tratamentos que apresentaram maior taxa de desinfestação foram o Tratamento T3 (antibiótico Bactrim[®] e nenhum fungicida) com uma taxa de desinfestação de 48,29% e o Tratamento T4 (fungicida Euparen[®] e nenhum antibiótico) com uma taxa de desinfestação de 55,95%;
- Os Tratamentos formados pela combinação dos antibióticos (Bactrim[®] e Cipro XR[®]) e fungicidas (Euparen[®] e Vitavax[®]), apresentaram uma taxa de desinfestação muito baixa (em média 22,23%), implicando que quando aplicados em conjunto no mesmo tratamento, propiciam o crescimento de microrganismos oportunistas, aumentando assim a taxa de contaminação;
- O Tratamento T4, forneceu uma taxa de brotos vivos de 40%, sendo este o tratamento mais eficaz, pois apresentou a melhor taxa de desinfestação e a melhor taxa de brotos vivos.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Documentos do etene: diagnósticos socioeconômico do setor sisaleiro do nordeste brasileiro**. 4. ed. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 91 p, 2005.

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, 75 p, 2004.

ANDERSON, M. J.; GORLEY, R. N.; CLARKE, K. R. **PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to software and Statistical Methods**. Institute of Information and Mathematical Sciences. Massey University. 2008.

ANDRADE, D.; SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, B. A.; BERALDO, C. C. Álcoois: a produção do conhecimento com ênfase na sua atividade antimicrobiana. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 7-13, 2002.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isto? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 3, n. 19, p 16-21, 2001.

BARRUETO CID, L. P.; DURZAN, D. J. **Efeito da cefotaxima na germinação, crescimento e brotação de gemas axilares, sob condições *in vitro***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 49, 2003.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 19-25, 2010.

BOCK, K.R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

BRESSAN, C. K.; OLIVEIRA, H. E.; AKYAMA, K. R.; ZOIA, M. S.; PEREIRA, P. E. J.; NOGUEIRA, R. G. Características físico-químicas e toxicológicas da Tolifluanida. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Risco Ambiental e Sociedade**, v.8, n.3, p.08-21, 2015.

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. C. **Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria sp.*** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 101, 2003.

CALDAS, D. J.; FARIA, P. R.; MARQUES, R. D.; SIBOV, S. T. **Efeito de agentes desinfetantes na descontaminação de explantes de *Saccharum officinarum L.* (poaceae) para cultivo *in vitro***. 63ª Reunião Anual da SBPC. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CANDEIAS, E. L.; SANTOS, M. L. C.; DUARTE, E. A. A.; OLIVEIRA, T. A. S.; BEZERRA, J. L.; SOARES, A. C. F. Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao *Aspergillus niger*. **Agrotropica**, Bahia, v. 1, n. 28, p.29-36, 30 mar. 2016.

CARNEIRO, F. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PASSOS, A. R.; NASCIMENTO, M. N.;

SANTOS, K. S. Embriogênese somática em *Agave sisalana Perrine*: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, Bahia, v. 44, p.294-303, jul/set 2014.

CARVALHO, A. C. P. P. *et al.* Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.7, p.30-60, 2011.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; JPUNIOR, M. L.; SILV, C. M. Controle de *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Santo Antonio de Goiás, v. 36, n. 1, 2011.

CARVALHO, J. M. F. C.; SENA, D. V. A.; **Técnicas do cultivo in vitro no Sisal**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos, 208, 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M M. A.; MEDEIROS, M. J. L.; **Fatores inerentes à micropropagação**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos, 148, 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, Documento, 64, 1999.

CLARKE, K. R.; GORLEY, R. N. **PRIMER V6: User Manual/ Tutorial**. PRIMER-E, Plymouth, UK. 2006.

COLOMBO, A. B.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.26, n.2, p. 253-258, 2004

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Sisal 2015: Retrospectiva. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2018.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Hortic. Bras.**, v.25, n.1, p.68-72, 2007.

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

DEVESA, J. **Plantas con semillas, familia Agavaceae**. In: IZCO, J., E. BARRENO, M.; COSTA, Y. J. (Ed.). Botánica Interamericana. Madri: McGraw-Hill, 1997. 781 p.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C. E.; MARCHESAN, M. A.; PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.13, n. 28, p. 113-117, 2002.

FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 2005. p. 49- 73.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.21-43.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2. ed. São Paulo: Jaguariúna, 2002.

GONDIM, T. M. S.; SOUZA, L. C. **Caracterização de Frutos e Sementes de Sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, Circular Técnica, 127, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI/ Embrapa- CNPq, v.1 p. 183-260. 1998.

HAMMERSACHLAG, R. S.; SISLER, H. D. Benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC): biochemical cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Pestic. Biochem physiol**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 42-54. october, 1973.

HIRATA, M.H. & MANCINI-FILHO, J. 2002. **Manual de biossegurança**. Barueri: Editora Manole. 496p.

ISAAC, S. **Plant fungal interactions**. Chapman and Hall. London. 150p, 1992.

JUNIOR, J. D. M. **Fibras de Sisal: estudo de propriedades de modificações químicas visando aplicações em compósitos de matriz fenólica**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências (Físico-química)) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LEIFERT, C. MORRIS, C. E.; WAITS, W. M. **Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems *in vitro***. Crit. Rev. Plant Sci., Boca Raton, v.13, n.2, p.139-183, 1994.

LEONE, G. F. **Estabelecimento de protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto**. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 101 p. Piracicaba, 2013.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. A. N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O. R. R. F.; FARIAS, F. J. C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LOCK, G.W. **Sisal**, London: Longmans, 1962. 355p.

LONG, R. D. *et al.* **An investigation of the effects of bacterial contaminants on potato nodal culture**. Acta Horticult., The Hague, n. 225, p.83-92, 1988.

MEDINA, J. C. **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, 1954. 286 p.

MELO, V. V.; SOARES, I. P.; QUEIROZ, A. **Guia de Antimicrobianos**. Hospital das Clínicas

da Universidade Federal de Goiás, 1.ed. Goiânia, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NOBREGA, F. M. S.; SOARES, T. C.; MELO, A S.; CARVALHO, J. M. F. C. Desinfestação de rebentos de sisal para utilização *in vitro*. **Revista Univap**, São José dos Campos, v.21, n.37, p.57-61, 2015.

OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G; SILVA, S. O. Efeito da desinfestação e do uso de meios de indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. **Rev. Bras. Fruticult.**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.43-49, 2000.

OLIVEIRA, S. S.; FAVORITO, O.; DOMBROSKI, J. L. D.; GUIMARÃES, S. C.; COELHO, M. F. B. **Efeito de tratamento fungicida e de tratamento fungicida + ácido giberélico sobre a germinação de sementes de pequi**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004.

PALU, E. G.; CORREA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando a micropropagação da figueira. **Revista Bras. Frutic.**, v.33, n.2, p.587-592, 2011.

PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; ARAÚJO, A. G.; PEREIRA, A. R. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1 ed, 2010. 446 p.

PEREIRA, J.E.S. *et al.* Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de Murmuru (*Astrocaryum Ulei*). **Ciência e agrotecnologia**, v.30, n.2, p.251-256, 2006.

PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. 1ed. **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**. 1997.

PINTO, N. F. J. A. **Tratamento fungicida de sementes de milho**. p.52-57. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, Gramado, 1996. Campinas, Fundação Cargill, 1996.

QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44p.

RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. S. R.; CRUZ, L. V.; MACHADO, T. L.; LOPES, H. C. principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 9, n. 16, 2011.

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.415-426.

SILVA, A. M.; OLIVEIRA, R. L.; RIBEIRO, O. L.; BAGALTO, A. R.; BEZERRA, L. R.; CARVALHO, S. T.; ABREU, A. L.; LEÃO, A. G. Valor nutricional de resíduos da agroindústria para alimentação de ruminantes. **Comunicata Scientiae**, Bahia, v. 4, n. 5, p.370-379, 31 out. 2014.

SILVA, C. A. D. **Compósitos de polipropileno reforçados com fibras de sisal para uso na**

indústria automobilística. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Automotiva) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, C. A. D. **Ecoproject**. In: Simpósio Bahia TEC 2012. Salvador.

SILVA, C. V.; SILVA, H.; CARVALHO, J. M. F. C. Propagação de rebentos *in vitro* de Sisal. **Biofar**, Campina Grande, v. 9, n. 4, 2013.

SILVA, L. S.; CHAGAS, E. A.; ARAÚJO, M. C. R.; BRITO, N.; SOUSA, L.; SILVA, S. **Diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão na desinfestação de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro***. XXII Congresso Brasileiro de Floricultura. Bento Gonçalves – RS. 2012.

SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. M. (Ed.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa -SPI; Campina Grande: Embrapa- CNPA, 1999. p. 205.

SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V.; SOFIATTI, V.; FILHO, J. L. S.; CARVALHO, O. S.; COSTA, L. B. **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão. Circular Técnica. 123. 2008.

SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispata*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.1, p.405-407, 2007.

SOUZA SOBRINHO, J.; SILVA, D. D.; SILVA, F. A. S. Estudo sobre competição das variedades Híbrido 11648 e *Agave sisalana* na zona fisiográfica tabuleiro. Salvador: **Companhia de Celulose da Bahia**, 1985.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAMBARUSSI, E.V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009. 122 p.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

UNEMOTO, L.K. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira Agrociência**, v.13, n.2, p.267-269, 2007.

VARGAS, T. E.; GARCIA, E. Propagação clonal massiva de *Agave sisalana* (sisal). Clonal mass propagatin of *Agave sisalana* (sisal). **Acta Biológico Venez.** v.16, n.3, p. 34-44, 1996.

WALLACE, M.M.; DIECKMAHNS, E.C. Bole rot of sisal. **The East African Agricultural Journal**, v.18, n.1, p.24-29, 1952.