



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LIC. PLENA E BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AUTORA:

CLAUDIANE VITOR DA SILVA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE SISAL

Campina Grande – PB

2012

CLAUDIANE VITOR DA SILVA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE SISAL

Trabalho apresentado ao Curso de Bacharelado e Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento as exigências necessárias para obtenção do grau de Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas.

ORIENTADORES:

DSc. Julita Maria Frota Chagas Carvalho

DSc. Humberto Silva

Campina Grande –PB

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

S586p Silva, Claudiane Vitor da.
Propagação in vitro de sisal [manuscrito] /
Claudiane Vitor da Silva. – 2012.
42 f.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da
Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
2012.
“Orientação: Profa. Dra. Julita Maria Frota
Chagas Carvalho, EMBRAPA Algodão”.
“Co-Orientação: Profa. Dr. Humberto Silva,
Departamento de Biologia”

1.Sisal. 2. Planta ornamental. 3. Fitorreguladores.
I. Título.

CDD 21. ed. 583

CLAUDIANE VITOR DA SILVA

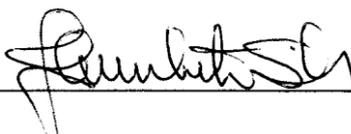
PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE SISAL

Aprovado em: 20/01/2012

BANCA EXAMINADORA



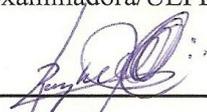
DSc. Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Orientadora/EMBRAPA-PB



DSc. Humberto Silva
Orientador/UEPB-PB



DSc. Valéria Veras Ribeiro
Examinadora/UEPB-PB



DSc. Odilon/Reny/Ribeiro Ferreira da Silva
Examinador/EMBRAPA-PB

Campina Grande – PB

2012

Dedicatória

A toda minha família que me acompanhou e me ajudou em toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela glória e benção de ter chegado até aqui sem desanimar diante dos obstáculos vividos durante toda a graduação.

Aos meus orientadores Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Prof. Dr. Humberto Silva pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e execução do meu estágio e deste trabalho de conclusão de curso.

Em especial ao Prof. Dr. Humberto Silva por ter me dado a oportunidade maravilhosa de estagiar na Embrapa Algodão e me fazer descobrir a minha verdadeira vocação.

Ao Dr. José Wellington dos Santos, pesquisador da Embrapa Algodão, que mesmo tão ocupado se dispôs a fazer a análise estatística desta pesquisa.

Aos meus pais Fernando Antonio e Cleonice Santana, que com muita dedicação não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida me apoiando nas minhas maiores dificuldades e lembrando que quando passamos pelos grandes obstáculos sempre temos Deus em nossa vida nos apoiando.

A todos meus irmãos e irmãs, Crênia, Cleidiane, Christianne, César, Aildo e Aldenir pelo total apoio e que de alguma forma ou de outra contribuíram para toda minha formação acadêmica e pessoal, além do companheirismo e fortalecimento quando eu mais precisei.

A todos os meus cunhados e cunhadas, Edinho, Adriano, Pedro, Lorinha, Fernanda e Larrilda que de igual forma me auxiliaram direta ou indiretamente nas horas de sufoco.

Agradeço em especial a minha irmã Cleidiane e ao meu cunhado Adriano por me receberem de maneira tão acolhedora na casa deles por todos esses quatro anos de curso, me fazendo tão feliz em acompanhar o crescimento das minhas três sobrinhas Hellen, Hemanuely e Hevelyn.

Em especial também para minha irmã Crênia e meu cunhado Edinho por todo carinho, presteza e apoio financeiro e moral quando mais precisei. Devo muito a vocês e de coração meu total reconhecimento.

As minhas queridas AMIGAS da graduação Aline, Brygida e Katty que sempre estiveram comigo me apoiando, me incentivando, me ajudando nas minhas maiores dificuldades e mostrando o que é ter uma amizade verdadeira.

Aos laboratoristas Dione Márcia e Amaro por todo o auxílio prestado em laboratório, por todas as conversas, desabafos e cafezinhos diários e por todos os ensinamentos adquiridos com vocês.

As minhas amigas e amigos estagiários: Alanne Rayssa, Ákyla, Raquel, Jessica, Taíza, Flávia, Otonilson, pelo apoio, amizade e auxílio prestado na execução dos experimentos.

A todos os meus professores pelo conhecimento, dedicação e paciência prestados ao longo dessa jornada acadêmica.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa e que não foram citados aqui, mas que sabem estão no meu coração meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE SISAL

SILVA, C. V.; CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA. H.

O sisal, ou agave constitui a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo. Perfeitamente adaptada à região semiárida do Nordeste, a cultura sisaleira constitui importante agente de fixação do homem à região semiárida. A propagação convencional desta planta é muito lenta ocorrendo principalmente por bulbilhos produzidos na inflorescência, depois de 8 a 9 anos de cultivo, raramente produzindo sementes férteis. Nesse contexto, objetivou-se com esse trabalho regenerar plantas do agave Híbrido 11648 cultivado nos campos experimentais da Embrapa Algodão utilizando-se combinações de reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurine) e 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) na micropropagação de rebentos e a auxina AIB (ácido indolil-3-butírico) para indução a rizogênese. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultivo de Tecidos, da Embrapa Algodão no período de fevereiro a dezembro de 2011. Para o estudo das combinações dos reguladores de crescimento foi feita a inoculação dos explantes em meio MS, suplementado com 3% de glicose, 0,62% de Gelrite e pH ajustado para 5,7, com diferentes concentrações de hormônios. Os frascos foram armazenados em câmara de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob o fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os explantes foram diferenciados em tipo 1 e tipo 2 (gemas apicais e gemas laterais, respectivamente) e avaliados após 45 dias considerando-se a presença de broto, o número de brotos, o tamanho do broto e se houve superbrotamento. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 5×2 , totalizando 10 tratamentos (cinco concentrações de fitoreguladores e dois tipos de explantes), com 5 repetições por tratamento para os explantes tipo 1 e 10 repetições para os explantes tipo 2, sendo cada uma constituída por um frasco de cultivo, com um explante por frasco. Na rizogênese foram testadas três concentrações diferentes da auxina 4-indol-3-butírico (AIB) visando observar a resposta que estas apresentavam na formação de raízes. Depois de transferidos para o meio de enraizamento os brotos foram avaliados após 15 e 30 dias, observando duas variáveis: número de raízes e tamanho do broto. Nesta etapa utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 3×2 , totalizando 6 tratamentos (três concentrações de auxina e dois períodos de avaliação, com um 10 repetições por tratamento, sendo cada uma formada por um tubo de ensaio, com um broto por tubo. De acordo com as análises estatísticas dos dados obtidos verificou-se que não foram registradas diferenças significativas entre as diferentes concentrações estudadas, porém houve significância no fator tipo de explante para todas as variáveis. Concluindo-se que a combinação dos fitoreguladores BAP e 2,4D, mesmo em menores taxas induzem a multiplicação de gemas de sisal. Foi observado ainda que na rizogênese apenas houve variação significativa quanto ao fator concentração para a variável número de raízes, enquanto que no fator período esta só foi vista na variável tamanho de broto. Contudo, conclui-se que todas as concentrações da auxina utilizada responderam igualmente a contento no desenvolvimento do sistema radicular.

Palavras-chave: Híbrido 11648, micropropagação, rebento, rizogênese, fitoreguladores

ABSTRACT

SILVA, C. V.; CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA. H.

The sisal, or agave is the main source of hard fibers extraction plant in the world. Perfectly adapted to the semiarid region of the Northeast, sisal culture is an important agent for fixing the man in semi-arid region. Conventional propagation of this plant is very slow going mainly produced bulbils in the inflorescence after 8-9 years of cultivation, rarely producing fertile seeds. In this context, the aim with this work to regenerate the agave plants grown in Hybrid 11648 Embrapa Cotton field trials using combinations of growth regulators BAP (6-benzylaminopurine) and 2.4 D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in the micropropagation shoots and auxin IBA (indolyl-3-acid butyric acid) to induce rooting. The research was developed at the Laboratory of Tissue Culture, Embrapa Cotton from February to December 2011. For the study of combinations of growth regulators was made inoculation of the explants on MS medium supplemented with 3% glucose, 0.62% Gelrite and the pH adjusted to 5.7 with different concentrations of hormones. The bottles were stored in a growth chamber at 25 ± 2 ° C under a photoperiod of 16 h of light and light intensity of $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The explants were differentiated into type 1 and type 2 (apical buds and lateral buds, respectively) and evaluated after 45 days considering the presence of bud, bud number, bud size and whether superbudding. We used a randomized design in factorial arrangement of 2 x 5, totaling 10 treatments (five concentrations of growth regulators and two types of explants) with five replicates per treatment for type 1 explants and 10 repetitions for type 2 explants, and each one consists of a bottle of cultivation, with one explant per vial. Rhizogenesis were tested in three different concentrations of auxin 4-indole-3-butyric acid (IBA) in order to observe the response they had in the formation of roots. After transfer to the rooting medium shoots were evaluated after 15 and 30 days, observing two variables: number of roots and bud size. At this stage we used a completely randomized design in factorial arrangement of 3 x 2, totaling 6 treatments (three concentrations of auxin and two assessment periods, with 10 replicates per treatment, each consisting of a test tube with one bud per tube. According to the statistical analysis of the data obtained it was found that there was no significant difference between the different concentrations studied, though there was a significant factor in the type of explant for all variables. It was concluded that the combination of growth regulators BAP and 2.4 D, even at lower rates induce bud multiplication of sisal. It was also observed that the only significant variation was rooting on the concentration factor for the variable number of roots, while a factor in this period was seen only in variable bud size. However, it is concluded that all auxin concentrations also responded satisfactorily used in root development.

Keywords: Hybrid 11648, micropropagation, shoot, root formation, growth regulators

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos reguladores de crescimento utilizados.....	26
Tabela 2. Resumo da análise de variância referente às variáveis presença de broto, número de brotos, tamanho de broto e superbrotamento após 45 dias de cultivo. Campina Grande-PB, 2012.....	29
Tabela 3. Valores médios dos fatores concentração e explante. Campina Grande-PB, 2012.....	32
Tabela 4. Resumo da análise de variância referente às variáveis número de raízes e tamanho de broto. Campina Grande-PB, 2012.....	33
Tabela 5. Valores médios dos fatores concentração e período. Campina Grande-PB, 2012.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área demonstrativa do agave Híbrido 11648 cultivado em fileira simples na Embrapa Algodão de Campina Grande, PB.....	17
Figura 2. A. Sisal emitindo o escapo floral. B. Bulbilhos.....	18
Figura 3. Rebentos de sisal em casa de vegetação.....	18
Figura 4. Estágios de desenvolvimento de explantes tipo 1 (gemas apicais) de rebento de sisal em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP combinado com 2,4D e visualizados sob 3 períodos diferentes.....	30
Figura 5. Estágios de desenvolvimento de explantes tipo 2 (gemas laterais) de rebento de sisal em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP combinado com 2,4D e visualizados sob 3 períodos diferentes.....	30
Figura 6. Brotos enraizados após 15 dias em meio MS suplementado com diferentes concentrações da auxina AIB.....	34
Figura 7. Brotos enraizados após 30 dias em meio MS suplementado com diferentes concentrações da auxina AIB.....	34
Figura 8. Aclimação de plântulas de sisal que apresentaram desenvolvimento satisfatório.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	15
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1. <i>O Sisal</i>	16
3.2. <i>Cultura de Tecidos</i>	18
3.2.1. <i>Micropropagação</i>	19
3.2.2. <i>Assepsia para o cultivo de tecidos</i>	20
3.2.3. <i>Meio de cultivo</i>	20
3.2.4. <i>Reguladores de crescimento</i>	21
3.2.5. <i>Organogênese</i>	22
3.2.6. <i>Enraizamento</i>	23
3.2.7. <i>Aclimação</i>	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. <i>Local e Período de Realização da Pesquisa</i>	25
4.2. <i>Explantos</i>	25
4.3. <i>Desinfestação dos explantes</i>	25
4.4. <i>Meio de cultivo</i>	25
4.5. <i>Cultivo</i>	26
4.6. <i>Temperatura e Luz</i>	26
4.7. <i>Enraizamento in vitro dos brotos</i>	26
4.8. <i>Aclimação</i>	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. <i>Multiplicação dos brotos</i>	29
5.2. <i>Enraizamento in vitro dos brotos</i>	32
5.3. <i>Aclimação</i>	35
6. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Entre os produtos de grande importância para a humanidade, as fibras naturais vêm assumindo destaque como matéria prima para novos empregos da mesma e aproveitamento de subprodutos (GONDIM; SOUZA, 2009).

O sisal, ou agave, se destaca como uma das fibras duras de maior importância no país tendo em vista, ser o Brasil o maior exportador mundial do produto, porém apesar de ser considerado um vegetal polivalente, até pouco tempo atrás, só era aproveitado no território apenas como fibra (MOREIRA et al., 1996).

A cultura de sisal, nos últimos anos, teve um acentuado declínio, tanto na área plantada como na produção. Carvalho et al. (2008) afirmam como causas de tal declínio: o mau aproveitamento da planta de sisal; a concorrência com fibras sintéticas; o elevado custo inicial para a produção da monocultura sisaleira; a falta de variedades adaptadas às regiões produtoras; o não aproveitamento dos resíduos do desfibramento; a ocorrência de doenças e o manejo deficitário da fertilidade dos solos. Em decorrência destes fatos, existe um interesse no desenvolvimento de cultivares para a criação de um banco de germoplasma.

Existe uma importância comercial de destaque para duas espécies no gênero: a *Agave sisalana* e a *A. fourcroydes*, a partir das quais origina-se o grosso das fibras duras produzidas no mundo. O sisal cultivado no Nordeste pertence à primeira das espécies citadas e sua introdução no Brasil verificou-se primeiramente na Bahia, de bulbilhos vindos da Flórida, nos primórdios deste século. O Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, importou outros exemplares da França, em 1906. No Estado da Paraíba, as primeiras mudas foram introduzidas em 1911, de um material originário da Bahia e, conseqüentemente, da Flórida, que foi o ponto de partida para a entrada do sisal no Brasil (MOREIRA et al., 1999).

A propagação mais utilizada na cultura do sisal é a vegetativa por conservar as características genéticas e pelo fato das plantas se desenvolverem mais rapidamente e serem vigorosas (BINH et al., 1990).

A propagação convencional desta planta ocorre principalmente por bulbilhos produzidos na inflorescência, o que se converte em um problema devido a lentidão do processo de floração que ocorre depois de 8 a 9 anos de cultivo em solo e raramente produz sementes férteis. Em vista da importância econômica desta planta e da lenta propagação convencional da mesma, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam protocolos para realizar propagação rápida e maciça, ampliando a técnica de cultivo de tecidos *in vitro* (CARVALHO et al., 2006).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não necessariamente, no desenvolvimento direto de novos cultivares. Mas podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas (FERREIRA et al., 1998).

As técnicas de engenharia genética, amplamente baseadas no cultivo de tecidos, possibilitam a superação dos limites ambientais e de tempo, no cultivo de espécies de ampla difusão, contribuindo para a solução de numerosos impasses relacionados aos países subdesenvolvidos e aos industriais ameaçados do perigo de contaminação ambiental.

Grattapaglia e Machado (1998), assim como Gonzáles et al., (2002) destacam a importância do tipo de explante, bem como a espécie utilizados e sua subsequente manipulação nos resultados obtidos, desta forma, a micropropagação pode ser conduzida por: multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares; multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta e indireta e multiplicação via embriogênese somática.

A organogênese constitui um importante método de propagação *in vitro* de plantas em que a multiplicação mediante indução de gemas adventícias se dá de forma indireta ou direta, nesta, ocorre o surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressam. Já a fase de organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A propagação *in vitro* auxilia na obtenção de plântulas livres de microorganismos e puras em um curto período de tempo (POWERS, 1988). Através desta prática vários milhares de plantas clonadas podem ser propagadas em poucos meses, a partir de uma única planta mãe. Um método eficiente permite a seleção de materiais de alto rendimento, propagação rápida e de alta qualidade, seleção dos clones indesejados (com mínima variabilidade genética) e produção das unidades saudáveis para o plantio (ROBERT, et al., 2008).

Ainda de acordo com Ferreira et al. (1998), a cultura *in vitro* permite que o material genético possa ser enviado a diferentes regiões do território nacional ou utilizado em intercâmbio internacional.

A técnica de cultivo *in vitro* de sisal tem como finalidade primária dirigir o crescimento e o desenvolvimento do explante manipulado em seu redor. Este controle se exerce, basicamente, mediante a adição de substâncias de diversas naturezas, principalmente reguladores de crescimento, ao meio de cultivo, como também variando a concentração de

determinados nutrientes e, também, através do controle das condições de iluminação e temperatura (CARVALHO, 1999).

Ao final tem-se um grande número de plantas com as mesmas características da planta mãe, inclusive com a mesma produtividade. É isto que se espera do sisal: plantas saudáveis, vigorosas, de alta produtividade e fibra de qualidade superior.

Por fim vale reiterar que a propagação *in vitro*, apesar de requerer um grande custo benefício, tendo em vista os gastos com a montagem de um laboratório apropriado com mão-de-obra qualificada e com os equipamentos e produtos necessários, é uma técnica que possibilita uma ampla produção em escala comercial de plantas de qualidade, selecionadas e livres de patógenos, além do elevado número de plantas obtidas em um curto período de tempo, o que torna esse dispendioso valor justificável.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral:*

Regenerar plantas do sisal Híbrido 11648 de campos experimentais da Embrapa Algodão através de rebentos utilizando-se a micropropagação.

2.2. *Objetivos Específicos:*

- Induzir a organogênese direta no agave Híbrido 11648 através de rebentos;
- Otimizar a multiplicação *in vitro* de rebento de sisal através de combinações dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurine (BAP) com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D);
- Comparar as respostas dos explantes provenientes de gemas apicais com os originados de gemas laterais quanto aos tratamentos utilizados;
- Enraizar os brotos obtidos através da multiplicação utilizando diferentes concentrações da auxina ácido indolil-3-butírico (AIB);
- Aclimatar as plantas regeneradas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. O Sisal

O Sisal, *Agave sisalana*, perfeitamente adaptado para sobreviver em condições semidesérticas, é originário da América Central, onde se concentra a maior diversidade de espécies na zona de transição árida e semi-árida do México Central (CARVALHO et al., 2008).

O sisal foi levado do México para outras partes do mundo, passando a ser comercialmente cultivado (MEDINA, 1954). Atualmente, esta cultura está expandida em muitos países como: Colômbia, Bolívia, Espanha, Brasil, Equador, Itália, Peru, Panamá e Venezuela. Várias espécies são de interesse econômico, por seu valor ornamental e por ser fonte de matéria prima para subprodutos de interesse comercial (DEVESA, 1997).

Sendo a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo, o sisal, já possui relevância na indústria automobilística e na construção civil. Contudo, existem outros produtos em que o sisal pode ser utilizado, tais como: carpetes, revestimento para paredes e geotêxteis, polpa e mucilagem para papel, alimentação animal e fios de qualidade (SILVA et al., 1999). Com a indústria química são fornecidos gorduras, cera, glicosídeo, álcool, ácidos adubos, além do emprego, na alimentação animal, dos resíduos oriundos da extração da fibra (GONDIM et al., 2009).

No Brasil, esta cultura foi introduzida em 1903, no estado da Bahia, sendo posteriormente difundida para os demais estados. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de sisal do mundo, conforme dados do IBGE (LSPA – maio/2008) e FAO (2008), a produção brasileira de fibra de sisal alcançou, em 2008, 246.239 toneladas.

Devido a sua facilidade de aclimação, o sisal ajustou-se perfeitamente à região semiárida do Nordeste do Brasil. O seu cultivo ocupa uma extensa área de solos pobres na região semiárida dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte e em regiões com escassa ou nenhuma alternativa para exploração de outras culturas (CARVALHO et al., 2002).

Um sistema de plantio do sisal que é bastante utilizado em Java e que adquiriu muitos adeptos no Brasil é o sistema de fileira dupla, pois possibilita uma maior proteção do solo quanto aos efeitos da erosão, principalmente nas grandes áreas em que são utilizadas práticas de cultivo mais aperfeiçoadas, todavia, esta técnica torna os tratamentos culturais mais dispendiosos, em particular entre as fileiras duplas (SILVA; BELTRÃO, 1999 apud MEDINA, 1954; LOCK, 1962). Todavia, conforme afirma Silva e Beltrão (1999), na região

Nordeste, em especial na Paraíba, os agricultores dão prioridade ao sistema de plantio em fileiras simples, por possibilitar a implantação de culturas intercalares nos dois primeiros anos, além de permitir que algumas operações sejam tratorizadas, como por exemplo, o roço e o transporte das folhas cortadas.



Figura1. Área demonstrativa do agave Híbrido 11648 cultivado em fileira simples na Embrapa Algodão de Campina Grande, PB. Foto: C. V. da Silva.

Quanto à escolha do tipo de sisal a ser plantado, em particular no Nordeste, os agricultores possuem duas opções que são: a espécie *Agave sisalana* (material de grande cultivo na região), e o Híbrido 11648, com origem na África e importado para o Brasil após sua criação (SOUZA SOBRINHO et al., 1985).

Em relação a nossa região, quando comparados, o híbrido mostra superioridade sobre a *Agave sisalana*, em relação à produção de fibra, maior resistência à seca e a pragas e enfermidades como a podridão do tronco de sisal, entretanto os híbridos possuem desvantagem no processo de desfibramento, pois as folhas são bem mais largas, o que vai carecer de maior esforço do operador da máquina. Visando superar essa dificuldade, já existem máquinas desfibradoras automáticas disponíveis no mercado (SILVA; BELTRÃO, 1999 apud SOUZA SOBRINHO et al., 1985).

O sisal é propagado vegetativamente por bulbilhos e por rebentos. Os bulbilhos são produzidos no escapo floral, após a queda das flores, enquanto os rebentos se originam de rizomas subterrâneos emitidos pela planta-mãe (SILVA et al., 1999).

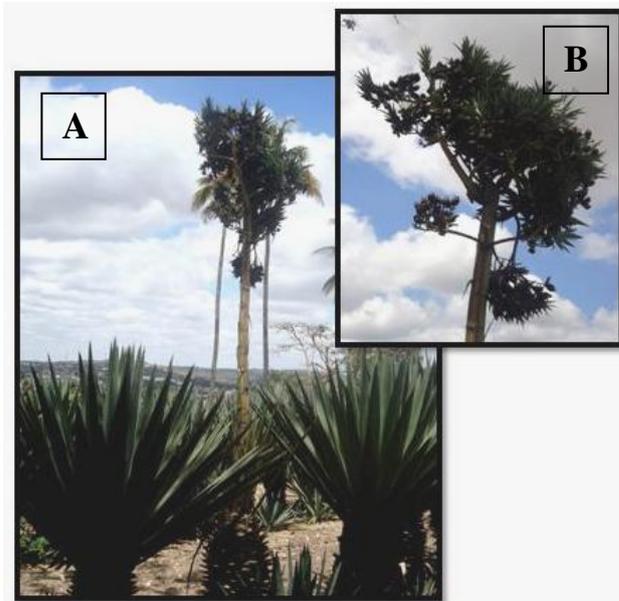


Figura 2. A. Sisal emitindo o escapo floral. B. Bulbilhos. Foto: C. V. da Silva.



Figura 3. Rebentos de sisal em casa de vegetação. Foto: C. V. da Silva.

O Brasil responde por mais de 50% da safra mundial, sendo a Bahia, responsável por cerca de 95,4%; Paraíba com 3,7%; Rio Grande do Norte com 0,6%; Ceará e Pernambuco com 0,3% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008). Estima-se que mais de 80% da produção nacional de sisal são exportadas para mais de 50 países, sendo os principais importadores: os Estados Unidos, a China, o México e Portugal.

A importância do sisal para a economia do setor agrícola nordestino pode ser analisada sob diversos aspectos, merecendo destaque a geração de empregos e renda para um contingente de aproximadamente 600 mil pessoas (SILVA et al., 2008).

Segundo Suinaga et al. (2006) o cultivo dessa Agavaceae é um dos principais agentes de fixação do homem à região semiárida nordestina.

3.2. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida, como um conjunto de técnicas para favorecer o crescimento de um grande número de células em um ambiente estéril e controlado. No momento, o maior impacto da cultura de tecidos está na área de multiplicação

de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, porque os indivíduos produzidos são geneticamente idênticos (RAVEN et al., 2001).

A cultura *in vitro* de plantas, é uma técnica que não apenas apresenta importância prática na área florestal e agrícola, mas, também na científica básica. Dentro do campo da biologia de plantas talvez seja uma das técnicas mais polivalentes. Assim, através da cultura de protoplastos, podem-se hibridizar variedades diferentes, vencendo barreiras genéticas (BARRUETO CID, 2001).

Pode ser considerada como uma técnica de surgimento recente, pois os primeiros estudos nesta área foram inicializados já no início do século XX (CARVALHO; SENA, 2008).

Grandes progressos foram obtidos na cultura de tecidos vegetais após a descoberta dos hormônios citocinina e auxina quando Shoog e Miller (1957) explanaram a razão entre os respectivos hormônios e a importância destes no surgimento de brotos ou raízes.

De acordo com Pasqual et al. (1997), entre os precursores nos cultivos *in vitro*, podemos destacar Hanning (1904), que foi o primeiro a cultivar embriões imaturos de crucíferas *in vitro* com sucesso; Van Overbeek et al. (1941), que promoveram a diferenciação e o crescimento de calo a partir de embriões zigóticos de *Datura stramonium* pela inclusão de leite de coco no meio de cultura e Ball (1946), que regenerou plantas de *Lupinus* e *Tropaeolum* a partir de ápices caulinares.

3.2.1. Micropropagação

A propagação *in vitro* de plantas, também chamada de micropropagação, é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro (por isso, o termo *in vitro*), sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (BARRUETO CID, 2001).

Pode ser considerado como um elemento importante dentro da biotecnologia, conjuntamente com outras duas áreas: DNA recombinante e fermentação. A cultura *in vitro*, apresenta diferentes modalidades conforme os objetivos de sua aplicação, como por exemplo, cultura de protoplastos, anteras, gemas, calos, células em suspensão, sementes, etc. (BARRUETO CID, 2001).

Em seus trabalhos Grattapaglia e Machado (1998), comumente com Gonzáles et al., (2002) destacaram a importância do tipo de explante utilizado e sua imediata manipulação, sendo assim, a micropropagação *in vitro* pode ser administrada por: multiplicação através da

proliferação de gemas axilares, propagação mediante indução de gemas adventícias com o uso da organogênese direta e indireta e multiplicação via embriogênese somática.

Para propagação *in vitro* de agaváceas, tem-se aplicado diferentes técnicas; utilizando segmentos caulinares e foliares, bulbilhos, sementes, calos, meristemas, gemas e embriões zigóticos. A maioria destas técnicas enfoca a multiplicação massiva através de brotos adventícios e axilares e a produção de embriões somáticos. Tem-se reportado, organogênese direta e indireta para diversas espécies; proliferação de brotos diretamente do explante original; proliferação de brotos adventícios a partir de calos e embriogênese somática (CARVALHO; SENA, 2008).

3.2.2. *Assepsia para o cultivo de tecidos*

A assepsia na cultura de tecidos vegetais pode ser considerada como um conjunto de procedimentos para tornar um explante livre de microrganismos (bactérias, fungos, fungos filamentosos, leveduras etc.) (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

Ansiando a esterilização de explantes torna-se imprescindível o uso de antissépticos que podem ser germinicidas ou bacteriostáticos, incluindo desde halogênios como hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio, alcoóis, antibióticos das mais diversas naturezas, formaldeído, fungicidas orgânicos etc. (PASQUAL et al., 2010).

No tocante ao material utilizado nos cultivos e aos meios de cultura, estes devem ser devidamente esterilizados em autoclave e/ou estufa no caso das vidrarias no intuito de eliminar possíveis microrganismos (LAMEIRA et al., 2000).

Quanto aos demais utensílios necessários ao manuseio dos explantes como pinças, bisturis e tesouras, estes devem ser esterilizados pelo método de flambagem no interior da câmara de fluxo laminar, própria para cultivo *in vitro*, tendo em vista, ser este um ambiente axênico, porém esta antes do início de quaisquer trabalhos deve ser devidamente limpa com álcool 70% para garantir a eliminação de possíveis germes (PASQUAL et al., 2010).

3.2.3. *Meio de cultivo*

Atualmente se sabe que os meios de cultivo ou meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas propiciam as substâncias fundamentais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* destas (CALDAS et al., 1998).

Desde os primórdios da cultura de tecidos tem se procurado meios de cultivo vegetais que fossem de fácil acesso, baixo custo, composição conhecida e domesticada. E isso levou a várias pesquisas até o estabelecimento de vários protocolos. Entre estes protocolos o que mais se destaca atualmente foi definido por White, em 1951 e utilizado durante anos como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. O meio MS de Murashige e Skoog (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extratos de folha de fumo, sendo utilizado na cultura de diversas espécies (CALDAS et al., 1998).

Os componentes essenciais de um meio de cultura serão selecionados de acordo com as necessidades de uma planta em seu meio natural sendo elas constituídas de: macronutrientes (nitrogênio, potássio, ferro, cálcio, fósforo e magnésio), micronutrientes (cobre, zinco, cloro, iodo, cobalto, níquel, alumínio, boro, manganês, molibênio), fonte de carbono (glicose, sacarose, açúcar, etc.), vitaminas (biotina, tiamina, mioinositol, etc.), além de reguladores de crescimento que dependendo do objetivo que se visa na cultura, podem ou não ser utilizados e que inibem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos do vegetal (BARRUETO CID, 2001).

Os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos, entretanto a cultura em meio líquido normalmente requer algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante, já os meios sólidos ou semi-sólidos, podem ser solidificados por vários geleificantes como o ágar (um polissacarídeo extraído de algas marinhas), o phytigel (gomas produzidas por certas bactérias), o amido (utilizado em cultura de anteras de cevada e explantes de tubérculos) entre outros. A escolha do agente de solidificação depende da espécie da planta e das condições de cultivo (FERREIRA et al., 1998).

3.2.4. Reguladores de crescimento

Um dos fatores que leva a um bom desenvolvimento dos explantes em meio de cultura é a adição dos reguladores de crescimento, ou hormônios vegetais que podem ser de tipos variados entre eles: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (CARVALHO et al., 2006).

Os também chamados fitoreguladores tem como objetivo principal suprir possíveis deficiências de teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz.

Na propagação *in vitro* cada tipo de hormônio é utilizado para um determinado fim. Na indução a organogênese, por exemplo, os mais comumente utilizados são as auxinas e citocininas.

Se utilizados simultaneamente, a adição de fitorreguladores estimula certa resposta como alongamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A proporção ou balanço auxina/citocinina em meio de cultura, há muito, é aceita como determinante para a resposta organogênica. Altas razões auxina/citocinina geralmente induzem à formação de raiz, enquanto baixas proporções induzem à formação de brotos. Em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como calos (TAKAHASHI, 2002).

3.2.5. Organogênese

A organogênese é o processo pelo qual há a formação ou multiplicação de brotos ou órgãos vegetais onde antes não existiam, através da indução de gemas já existentes ou recém formadas, também chamadas de gemas adventícias. Este processo pode ser classificado em direto ou indireto, quando analisada a origem da mesma. Quando ocorre o aparecimento direto de gemas mediante tecidos que expressem algum valor morfogenético, como gemas apicais, laterais ou mesmo axilares, nos referimos a organogênese direta. Já na indireta ocorre a formação de calos no processo de regeneração de gemas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De acordo com Larkin e Scowcroft (1981), quando se pretende realizar a micropropagação clonal de plantas é indesejável o aparecimento de calos, tendo em vista que a constituição cromossômica deste material geralmente apresenta instabilidade o que pode acarretar em variações genéticas, através de um processo chamado de variação somaclonal. Deste modo, fica claro que neste intuito o melhor tipo de organogênese é a direta, por dispensar a formação de calos.

A organogênese comumente se dá pela ideal concentração da relação citocinina/auxina no meio de cultura, além disso, pode ser originada de uma única célula ou de um conjunto de células. Caracteriza-se por ser uma estrutura monopolar e apresentar ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante (ANDRADE, 2006).

Atualmente adquirir a organogênese *in vitro* é um mecanismo o qual podemos chamar de empírico, tendo em vista a necessidade de se testar para cada espécie, ou mesmo para cada

variedade de uma espécie, as seguintes condições: fonte de explante, composição mineral do meio de cultura, balanço hormonal e condições ambientais (PERES, 2002).

3.2.6. Enraizamento

A fase de enraizamento se caracteriza como uma das etapas finais e decisivas na micropropagação para que então possa se avaliar a resposta da cultura ao processo *in vitro*, desse modo fica visível a eficácia dos tratamentos utilizados em uma pesquisa. Nesse processo todos os brotos obtidos até então são transferidos para meios com hormônios específicos e concentrações variadas, no intuito de induzir o que pode ser chamado de ensaio de enraizamento.

A formação de raízes, ou também chamada rizogênese na cultura de tecidos pode ser influenciada tanto por fatores endógenos, como por exógenos e suas interações (ROCHA et al., 2008).

Geralmente as auxinas são demarcadas como reguladores de crescimento, bastante eficazes para formação de raízes e tendo em vista, a espécie a qual se estuda alguns tipos se destacam como apresentando bons resultados para indução e desenvolvimento destas, entre elas estão AIB (4-indol-3-butírico), ANA (ácido naftaleno-acético) e AIA (ácido indol-3-acético) variando em concentração também de acordo com a cultura com qual se trabalha (LOPES et al., 2001; MACHADO et al., 2005).

3.2.7. Aclimação

A aclimação consiste na última etapa da propagação *in vitro*, tendo em vista que é nesta fase onde a plântula é extraída da até então condição *in vitro* para uma categoria *ex-vitro* em BOD (Biochemical Oxygen Demand), câmara de incubação com controle de temperatura e fotoperíodo, ou casa de vegetação, visando a adaptação destas a um meio muito diferente daquele onde elas foram formadas.

Este se caracteriza como um processo crítico e decisivo na micropropagação, pois é neste momento que a planta vai passar por várias modificações nas condições fisiológicas como: troca de um ambiente de baixa transpiração para outro onde há variação na taxa de transpiração, estando suscetível a estresses hídricos; mudança de uma heterotrofia para autotrofia; a fonte e disponibilidade ou não de sais não serão mais as mesmas, além de uma das mudanças mais importantes, a plântula vai sair de um ambiente totalmente axênico, para se submeter a microorganismos saprófitos e possivelmente patogênicos. Esta é a etapa em que

o resultado positivo vai depender da adaptação ou não da plântula (GRATAPAGLIA; MACHADO, 1990).

As plantas resultantes de multiplicação *in vitro* diferem anatômica e fisiologicamente daquelas as quais são cultivadas comumente em campos e casas de vegetação.

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 fevereiro a dezembro de 2011.

4.2. Explantes

Foram utilizadas como plantas-mãe rebentos de sisal do gênero *Agave*, o Híbrido 11648, cultivado na Embrapa Algodão. Plantas de 25 a 40 cm de altura, saudáveis foram selecionadas no campo e levadas para casa de vegetação para um pré-condicionamento. Deste modo, estas plantas foram colocadas individualmente em vasos, nestas condições, permaneceram em um ambiente controlado, que as tornaram homogêneas e fisiologicamente mais adequadas como fontes de explantes. Durante este período as plantas foram tratadas com fungicidas para o controle de infecções e regadas regularmente a fim de manter o solo em sua capacidade de campo e lá permanecendo por um mês para posterior utilização.

4.3. Desinfestação dos explantes

Os bulbos foram imersos em uma solução de detergente a 4% e em seguida mergulhados em água destilada estéril. As demais etapas de desinfestação ocorreram na câmara de fluxo laminar onde os bulbos foram submersos: em solução de formaldeído a 1%; em solução de NaOCl a 2%; em solução de fungicida a 0,3% contendo Euparen e Monceren; em álcool a 70% e por último em solução de 100mg/L do antibiótico Rifampicina[®] microfiltrado.

4.4. Meio de cultivo

Para o estudo das combinações dos reguladores de crescimento foram inoculados os explantes em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de glicose, 0,62% de Gelrite e pH ajustado para 5,7 com as combinações dos reguladores de crescimento presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações dos reguladores de crescimento utilizados.

TRATAMENTOS	REGULADORES DE CRESCIMENTO	
	BAP(mg/L)	2,4D(mg/L)
TS1	2,00	0,02
TS2	3,00	0,02
TS3	5,00	0,02
TS4	10,00	0,02
TS5	12,00	0,02

Depois de dissolvido e distribuído com 50 mg/l por frasco, os meios foram autoclavados a 120° para esterilização durante 20 minutos e devidamente vedados a fim de evitar contaminações microbianas.

4.5. *Cultivo*

No interior da câmara de fluxo laminar e com o material cirúrgico necessário (pinças, bisturis e placas) esterilizado em estufa, os explantes foram cultivados e separados em gemas apicais (tipo 1) e gemas laterais (tipo 2) objetivando a indução a organogênese direta, ambos recebendo os mesmos tratamentos com 1 explante por frasco. Foram utilizados 5 frascos para o tratamento tipo 1 e 10 frascos para o tratamento tipo 2, tendo em vista o número de gemas (apicais e laterais) presentes em um único rebento.

4.6. *Temperatura e luz*

Os frascos foram armazenados em câmara de crescimento a 25±2°C sob o fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de 30µmol m⁻²s⁻¹ objetivando o desenvolvimento dos explantes e análise dos mesmos após um período de 45 dias.

4.7. *Enraizamento in vitro*

Nesta etapa visando induzir a rizogênese dos brotos obtidos no meio de multiplicação, foi feita a excisão e transferência destes em câmara de fluxo laminar para o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com três concentrações de ácido indolil-3-butírico (AIB): 0,0 mg/L; 0,5mg/L; 1,0mg/L.

Cada tratamento foi devidamente distribuído em tubos de ensaio, com 10 mg/l por tubo. Posteriormente os frascos foram armazenados em câmara de crescimento a $25\pm 2^\circ\text{C}$ sob o fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e avaliados após dois períodos: 15 dias e 30 dias.

4.8. Aclimação

As plantas obtidas no processo de multiplicação ou organogênese *in vitro* que foram induzidas a rizogênese e apresentaram o sistema radicular ligeiramente desenvolvido, foram aclimatadas em copos de prolipropileno contendo turfa e vermiculita com prévia esterilização por 2 horas. Para a mesma as plântulas foram cuidadosamente removidas visando manter suas raízes intactas, lavadas com água corrente para retirada do excesso do meio em que estas encontravam-se imersas e após transferidas, cobertas com outro copo de prolipropileno afim de se manter a umidade relativa. Feito este processo, os copos foram devidamente incubados em câmara com fotoperíodo e controle de temperatura (BOD). Após 3 dias os copos que cobriam as plantas eram diariamente pulverizadas com água destilada estéril para manter a umidade e passados 7 dias os mesmos foram retirados para a adaptação da plântula ao novo meio *ex vitro*.

4.9. Análises Estatísticas

4.9.1. Multiplicação dos brotos

Após 45 dias de cultivo, os explantes foram avaliados considerando-se cinco variáveis: presença de broto, número de brotos, tamanho de brotos e ocorrência de superbrotamento. Depois dessa avaliação estes foram subcultivados para o mesmo meio, visando o alongamento dos brotos para posterior transferência para o meio de multiplicação. Em um prazo estimado de 100 dias os explantes que obtiveram um maior número de brotos foram excisados e inoculados no meio de enraizamento no intuito de estimular a rizogênese *in vitro*.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 5×2 , totalizando 10 tratamentos (cinco meios de cultivo e dois tipos de explantes). Com 5 repetições por tratamento para os explantes tipo 1 e 10 repetições para os explantes tipo 2, onde cada repetição foi constituída por um frasco de cultivo, com um explante por frasco.

Os dados originais foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e analisados estatisticamente, pelo software Statistical Analysis System (SAS), versão 9.1.3 (SAS\STAT, 2000), enquanto as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.9.2. *Enraizamento in vitro dos brotos*

As avaliações foram realizadas em dois períodos (15 dias e 30 dias após inoculação), observando-se duas variáveis: número de raízes e tamanho dos brotos.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 3x2, totalizando 6 tratamentos (três concentrações de auxina e dois período de avaliação). Com 10 repetições por tratamento, onde cada repetição era constituído por um tubo de ensaio com um broto por tubo.

Os resultados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ ponderados estatisticamente através software Statistical Analysis System (SAS), versão 9.1.3 (SAS\STAT, 2000), enquanto as médias comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Multiplicação dos brotos

As análises da variância referentes às variáveis presença de broto, número de brotos, tamanho de broto e superbrotamento encontram-se na tabela 2. Fazendo-se um exame nessa tabela verifica-se que não houve diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo Teste F, para o fator tratamento e a interação deste com tipo de explante. Porém, constata-se significância estatística apenas para o tipo de explante, referente a todas as variáveis, o que pode-se observar a superioridade do explante 1 proveniente de gemas apicais, apresentado na Tabela 3.

Tabela 2. Resumo da análise de variância referente as variáveis presença de broto, número de brotos, tamanho de broto e superbrotamento após 45 dias de cultivo. Campina Grande-PB, 2012.

F.V	G.L.	Quadrados médios			
		Presença de brotos	Número de brotos	Tamanho de broto	Superbrotamento
Tratamentos (T)	4	0,0232 ^{ns}	0,0691 ^{ns}	4,6896 ^{ns}	0,0464 ^{ns}
Explante (E)	1	0,8645 ^{**}	2,7483 ^{**}	231,38 ^{**}	1,4005 ^{**}
T X E	4	0,0116 ^{ns}	0,1154 ^{ns}	3,9212 ^{ns}	0,0607 ^{ns}
Erro	65	0,0486	0,2541	4,0338	0,0428
CV %		20,55	38,88	95,45	23,35

** Significativo ($P < 0,01$) pelo Teste F.

ns não significativo ($P > 0,05$).

É uma constatação de Raven et al. (2007) que esta preponderância das gemas apicais como dominância apical, onde, para diversas espécies vegetais, o fluxo basípeto de auxina oriundo das gemas apicais em desenvolvimento inibe o crescimento de gemas laterais ou axilares. Desta forma, apenas quando há uma interrupção no crescimento da gema apical, o fluxo basípeto diminui, dando lugar para o desenvolvimento das gemas laterais. Assim sendo, é justificável que o explante 1 procedente de gemas apicais quando comparado com o explante 2 originário de gemas laterais se sobressaia quanto as variáveis analisadas, em

especial para a variável tamanho de broto como pode ser observado na Tabela 2 e nas Figuras 4 e 5, tendo em vista, uma análise após um mesmo período de cultivo (45 dias) para ambos os explantes, pois é necessário ponderar os fatores endógenos os quais cada tecido da planta é exposto resultando em um melhor desenvolvimento do mesmo.

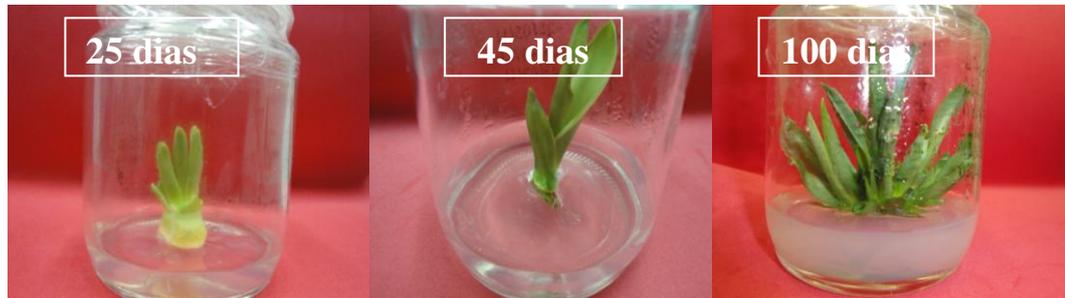


Figura 4. Estágios de desenvolvimento de explantes tipo 1 (gemas apicais) de rebento de sisal em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP combinado com 2,4D e visualizados sob 3 períodos diferentes. Foto: J. M. F. C. Carvalho.

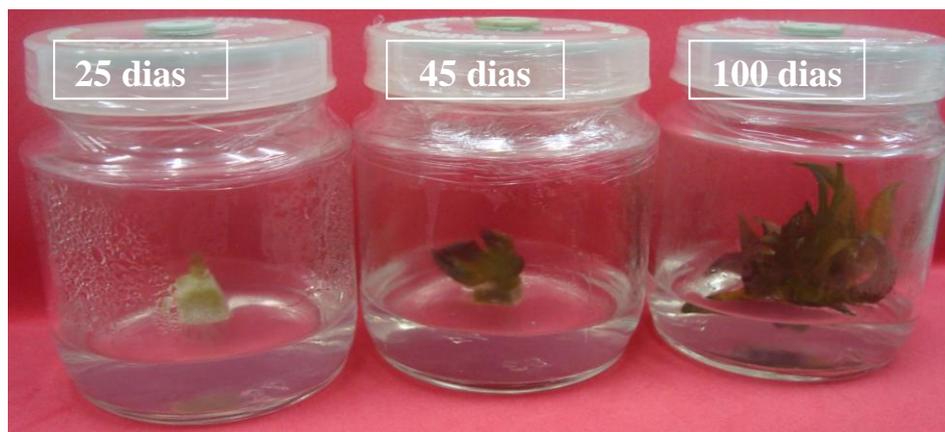


Figura 5. Estágios de desenvolvimento de explantes tipo 2 (gemas laterais) de rebento de sisal em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP combinado com 2,4D e visualizados sob 3 períodos diferentes. Foto: J. M. F. C. Carvalho.

Conforme afirma Zafari et al. (1994), o resultado da quebra de influência inibitória das gemas apicais sobre as laterais, possibilitada pela alteração física causada ao meristema e/ou aos tecidos próximos a este, acrescido ao potencial da citocinina no meio, acarreta em um aumento no número de brotos laterais de bananeira cv. Grande Naine. Segundo Cronauer e Krikorian (1984), este fato é justificado através da possível produção de citocininas pelas raízes, o que auxiliaria na sobreposição da dominância apical do explante, tendo em vista que o acréscimo de citocinina ao meio de cultura nem sempre é suficiente para induzir a formação de gemas laterais.

De acordo com Castro et al. (2005), o hormônio vegetal é um composto orgânico, não nutriente, de ocorrência natural, produzido na planta, que em baixas concentrações promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal, deste modo a exposição de auxina nas gemas apicais caracteriza o seu rápido desenvolvimento, impedindo conseqüentemente o crescimento das gemas laterais de maneira espontânea, mesmo sendo os dois explantes submetidos a iguais concentrações adicionais de fitohormônios (BAP e 2,4D).

O acréscimo de fitorreguladores em meios de cultura visa em especial suprir possíveis carências de teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz. Concomitantemente, a adição de fitorreguladores incita algumas resposta como alongamento ou multiplicação da parte aérea como no caso do sisal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Um dos fatores preponderantes para o sucesso no processo de multiplicação *in vitro* citados por muitos trabalhos é o tipo e a concentração de citocinina utilizada variando de acordo com a espécie a qual se estuda. Grattapaglia e Machado, (1998) e Carvalho et al. (2004) estudando algumas espécies do gênero *Agave*, assim como, Batista et al (2001) com o gergelim (*Sesamum indicum* L.) abordaram em suas pesquisas a eficácia do uso da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na indução de superbrotamento em gemas axilares e cotiledonares. Para efeito deste trabalho foi possível perceber a relevância da utilização da citocina BAP combinada a auxina 2,4D na indução a organogênese e conseqüentemente a multiplicação das gemas. Entretanto, não houve variação significativa entre as diferentes concentrações testadas, o que comprova uma boa resposta da cultura a pequenas concentrações da citocinina BAP como pode ser visto nas Tabelas 2 e 3.

Deste modo, constata-se nesta pesquisa um valor econômico favorável quando se utiliza reduzidos teores de fitohormônios, pois esta similaridade de resultados entre maiores e menores concentrações, permite um maior custo benefício quando ponderado os valores no mercado dos fitohormônios utilizados e dissolvidos os custos com a quantidade de plantas de qualidade, produzidas em um curto período de tempo.

Tabela 3. Valores médios dos fatores concentração e explante. Campina Grande-PB, 2012.

Fatores	Variáveis			
	Presença de brotos ⁽¹⁾	Número de brotos ⁽¹⁾	Tamanho de broto	Superbrotamento ⁽¹⁾
Concentração (mg/l)				
MS+2,0 BAP + 0,02 2,4D	1,121±0,05a	1,279±0,09a	1,740±0,50a	0,879±0,06a
MS+3,0 BAP + 0,02 2,4D	1,017±0,07a	1,149±0,11a	2,153±0,63a	0,845±0,06a
MS+5,0 BAP + 0,02 2,4D	1,086±0,06a	1,345±0,15a	2,766±0,95a	0,845±0,06a
MS+10,0 BAP + 0,02 2,4D	1,052±0,06a	1,333±0,15a	2,140±0,78a	0,914±0,06a
MS+12,0 BAP + 0,02 2,4D	1,087±0,06a	1,380±0,15a	1,720±0,48a	0,948±0,06a
Explante				
Explante 1	1,225±0,00a	1,568±0,05a	4,588±0,56a	1,079±0,04a
Explante 2	0,997±0,04b	1,162±0,07b	0,862±0,19b	0,789±0,03a

Médias seguidas de letras iguais dentro de cada fator não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(1) Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

5.2 Enraizamento *in vitro* dos brotos

Neste ensaio para efeito estatístico as análises de variância referentes às variáveis número de raízes e tamanho de broto encontram-se na Tabela 4. Quando observada esta tabela constata-se que houve diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo Teste F, para o fator concentração. Entretanto, a interação deste com período de avaliação foi não significativa.

Na Tabela 5 pode-se observar a superioridade da concentração 1,0 mg/l de AIB apenas para a variável número de raízes, referente a tamanho de broto, quando confrontado com a concentração 0,0 mg/l de AIB. Todavia, a primeira não difere significativamente quando comparada com 0,5 mg/l de AIB para o mesmo fator.

Tabela 4. Resumo da análise de variância referente às variáveis número de raízes e tamanho de broto. Campina Grande-PB, 2012.

F.V	G.L.	Quadrados médios	
		Número de raízes	Tamanho de broto
Concentração (C)	2	11,928 ^{**}	1,5971 ^{ns}
Período (P)	1	1,1912 ^{ns}	23,562 ^{**}
CX P	2	0,1356 ^{ns}	2,7981 ^{ns}
Erro	54	2,7505	1,9862
CV%		53,38	28,56

^{**}Significativo (P < 0,01) pelo Teste F.

ns não significativo (P > 0,05).

Tabela 5. Valores médios dos fatores concentração e período. Campina Grande-PB, 2012.

Fatores	Variáveis	
	Número de raízes ⁽¹⁾	Tamanho de broto
Concentração (mg/l)		
MS + 0,0 AIB	2,308±0,26b	4,725±0,26 ^a
MS + 0,5 AIB	3,162±0,36ab	5,255±0,42 ^a
MS + 1,0 AIB	3,849±0,44a	4,820±0,33 ^a
Período		
15 dias	2,965±0,31a	4,306±0,18b
30 dias	3,248±0,32a	5,560±0,31 ^a

Médias seguidas de letras iguais dentro de cada fator não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(1) Dados originais transformados em $\sqrt{x+1}$.

Analisando-se as Figuras 6 e 7, observa-se em todos os tratamentos a capacidade de emitir sistema radicular. Fato igualmente evidenciado por Nascimento et al. (2008) ao testar diferentes concentrações da auxina AIB na indução da rizogênese da uvaieira (*Eugenia pyriformis*), o qual através de análises estatísticas comprovou que houve formação de raízes em todas as concentrações testadas, mesmo na ausência do regulador de crescimento (10% de

enraizamento). Observou ainda, o mesmo autor, que as maiores médias quanto à variável de número de raízes foram obtidas na presença de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de AIB, concordando com os resultados encontrados na cultura do sisal.

O uso de concentrações adequadas de AIB é de extrema importância, e a dose ideal varia com a espécie (HARTMANN et al., 2002).

Em alguns casos, baixos níveis de auxina são também necessários para o alongamento da raiz, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão (TAIZ; ZEIGER, 2004).

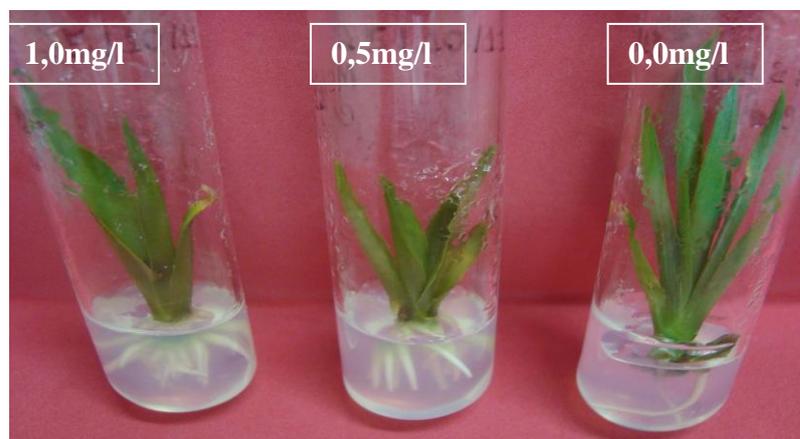


Figura 6. Brotos enraizados após 15 dias em meio MS suplementado com diferentes concentrações da auxina AIB. Foto: J. M. F. C. Carvalho.



Figura 7. Brotos enraizados após 30 dias em meio MS suplementado com diferentes concentrações da auxina AIB. Foto: C. V. da Silva.

Contudo, para o fator período de observação do enraizamento, é evidenciado que apenas tamanho de broto apresenta variação significativa quando comparada com número de

raízes como se constata nas Tabelas 4 e 5 e nas Figuras 6 e 7. As avaliações dos valores médios dos fatores concentração e período foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Conforme Grattapaglia e Machado (1990) e Woodhead e Bird (1998) a rizogênese, ou enraizamento *in vitro* é dividido em três etapas: indução, iniciação e alongamento, onde a duração de cada fase é compreendida entre 7 a 21 dias, variando de acordo com a espécie e das condições de cultivo que esta é exposta, o que explica a significância nesta pesquisa apenas para a variável tamanho de broto, tendo em vista que no período de 30 dias a planta não mais emite raízes, mas apenas alonga as já existentes.

Neste mesmo sentido, Oliveira et al. (2001), afirmam que brotos micropropagados de bananeira com tamanho inferior a 1,5 cm carecem de uma maior permanência em meio de enraizamento *in vitro* visando o alongamento destes, no intuito de evitar grandes perdas na fase de aclimação.

Paiva e Gomes (2001), afirmam que o meio influencia na qualidade do sistema radicular e não apenas na porcentagem de enraizamento e ponderando que o tipo de raiz influencia na adaptação das plantas ao meio *ex vitro*, Grattapaglia e Machado (1990) ressalta que quanto mais curtas as raízes, mais ativo o seu crescimento e maior a probabilidade de adequação das plantas. E neste contexto o ácido indolbutírico (AIB) é comprovadamente uma auxina eficaz na indução a formação do sistema radicular, o que de acordo com Karhu (1997) se deve à sua menor mobilidade e maior estabilidade química no corpo da planta.

5.3. Aclimação

Tendo em vista completar o ciclo do desenvolvimento e ser esta uma etapa crítica e decisiva em todo o processo de propagação *in vitro*, o sisal respondeu bem à fase de aclimação com a utilização do substrato de turfa e vermiculita anteriormente esterilizada, como pode ser observado na Figura 8. De acordo com Jabur e Martins (2002), a seleção do substrato é de grande importância, pois é onde o sistema radicular irá desenvolver-se, auxiliando no crescimento da parte aérea da muda. Neste mesmo sentido, Cunha et al. (2002) e Araújo Neto et al. (2002), afirmam que o substrato deve reunir características físicas e químicas como maior teor de matéria orgânica que promovam, respectivamente, a retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes, de modo que atendam às necessidades da planta.

Resultados semelhantes, porém utilizando como substrato uma mistura de turfa com perlite, foram obtidos por González et al. (2000) em plantas de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Berkeley.



Figura 8. Aclimação de plântulas de sisal que apresentaram desenvolvimento satisfatório. Foto: J. M. F. C. Carvalho.

Após transferidas para o substrato os copos de polipropileno (Figura 8) que cobriam as plantas foram pulverizadas durante 7 dias afim de simular uma câmara úmida, pois conforme abordado por Souza et al. (2006) a perda excessiva de água pelas plantas propagadas *in vitro* é definida como uma característica preponderante no processo de aclimação, tendo em vista que a troca das plantas da categoria *in vitro* acarreta um estresse hídrico, sendo dessa forma necessário manter a umidade alta e a temperatura amena, em especial na fase inicial do processo.

6. CONCLUSÕES

Com a realização desta pesquisa foi possível concluir que:

- Mesmo em menores concentrações os fitorreguladores 6-benzilaminopurine (BAP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), induzem a organogênese direta em gemas apicais e laterais e conseqüente multiplicação destas, quando provenientes de rebentos de sisal;
- Explantes oriundos de gemas apicais se sobressaem nas variáveis: presença de broto, número de brotos, tamanho de brotos e superbrotamento quando comparados com explantes de gemas laterais, tendo em vista a influência inibitória e a condição favorável de dominância apical que estes apresentam;
- No processo de rizogênese todas as concentrações da auxina 4-indol-3-butírico (AIB) utilizadas responderam igualmente a contento no desenvolvimento do sistema radicular, apresentando diferenças significativas apenas quando comparada a concentração de 0,0 mg/l com a dose de 1,0 mg/l de AIB para o número de raízes no fator concentração;
- Na etapa de aclimação, as plantas responderam satisfatoriamente a utilização do substrato turfa e vermiculita previamente esterilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, W. F. D. E. Efeito de "pulse" na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro*. 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ARAÚJO NETO, S. E. et al. Desenvolvimento de mudas de maracujazeiro amarelo com uso de diferentes substratos e recipientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2002, Belém. **Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Belém, 2002. p. 17.
- BALL, E. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 33, p. 301-318, 1946.
- 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.
- 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.
- BATISTA, R. C. et al. Micropropagação in vitro de três cultivares de gergelim. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*. Campina Grande: Embrapa CNPA, v.5, nº3. p.397 – 404, 2001.
- BINH, L.T. et al. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. Vietnam, v.23, n. 3, p. 67-70, 1990.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1998. v.1. p.87-132.
- CARVALHO, J. M. F. C.; **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA, Documento, 64, 1999.
- CARVALHO, J. M. F. C.; PINHEIRO, M. P. N.; SILVA, D. M. S. **Otimização da Multiplicação de Bulbo de Sisal In Vitro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, Circular Técnica, 107, 2007.
- 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. et al. **Definição de Protocolo de Germinação In Vitro do Germoplasma de Sisal**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 169, 2002.
- CARVALHO, J. M. F. C. et al. Indução in vitro de superbrotamento em gemas de espécies do gênero Agave. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v.8, n.2/3, p. 869-873, 2004.

CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Considerações Gerais Sobre Organogênese**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.

CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Multiplificação *In Vitro* de Sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 280, 2006.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de Fisiologia Vegetal: Teoria e Prática**. Piracicaba: Ceres, 650p. 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/RN/Nota_tecnica_sisal2008.pdf>. Acesso em: Maio/2010.

CRONAUER, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Multiplication of Musa from excised stem tips. **Annals of Botany**, London, v.53, n.3, p.321-328, 1984.

CUNHA, A. M. et al. Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de Acacia sp. **Revista Árvore**. Viçosa-MG, v.30, n.2, p. 207 – 214, 2006.

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

FAO. Statistics Division 2009. **Production (tonnes): sisal**. Disponível em: <[http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#an cor](http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#an%20cor)>. Acesso em: 29 maio. 2010.

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-CNPH, 1998. v.1. p.21-43.

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

GONZÁLES, E. R.; ANDRADE, A. de.; BERTOLO, A. L.; et al. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n. 26, p. 18-22. 2002.

GONZALEZ, M.V.; LOPEZ, M. VALDES, A.E.; ORDAS, R.J. **Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants**. *Annals of Applied Biology*. Cambridge, v. 137, p.73-78, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPH. p. 99-169.1990.

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- CNPH, v.1 p. 183-260. 1998.

HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. 1.Ueber die cultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosack. *Botanic Ztg*. v.62, p.45-80, 1904.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

KARHU, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands. v. 48, n. 3, p. 153-159, 1997.

IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2008/pam2008.pdf>. Acesso em: Maio/2010.

LAMEIRA, O. A. et al. **Cultura de tecidos: (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LOCK, G. W. The sisal plant and other fibre agaves. In: LOCK, G. W. **Sisal: twenty-five years' sisal research**. Longman's: Tanganyika, 1962. p. 18-34.

LOPES, S. C. et al. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v.7, n.1, p.124-128, 2001.

MACHADO, M. P. et al. Indole butyric acid on rooting ability of semihardwood cutting of grapevine rootstock 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p.476-479, 2005.

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

MORAES, A. M. **Técnicas de micropropagação e criopreservação para abacaxizeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia) – UFPB. Centro de Ciências Agrárias, Areia – PB. 2007.

MOREIRA, J. A. N. et al. **Declínio do sisal e medidas para seu soerguimento no Nordeste Brasileiro**. Campina Grande: Embrapa - Algodão, 1996. 19p. (Embrapa- Algodão. Documento, 45).

MOREIRA, J. A. N.; BELTRÃO, N. E. M.; SILVA, O. R. R. F. Botânica e morfologia do sisal. In: SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. M. **O Agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, D. F.: Embrapa – SPI; Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1999. p. 25-34.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A.C. et al. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, 2008.

OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 46p. (Boletim 322).

PASQUAL, M.; HJOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações - introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLAFAPAE, 1997. 159p.

PASQUAL, M. et al. 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.

PERES, L. E. P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n.25, p.44-48, 2002.

POWERS, D.; RALPH, Y. B. *In vitro* propagation of *Agave froncroydes* Lem (Henequen). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Arizona, v. 16, n. 1, p. 57-60, 1988.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2001.

ROBERT, M. L. et al. An Efficient Method for the Micropropagation of *Agave* Species. **Methods in Molecular Biology**, vol. 318: **Plant Cell Culture Protocols**, 2ª ed. Totowa: NJ. 2008.

ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal- SP, v. 30, n. 3, p. 769-774, 2008.

SAS/STAT User's Guide. In: SAS INSTITUTE. SAS Online Doc: version. Cary, 2000. CD ROM.

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 p.

SILVA, O. R. R. F. et al. **Cultivo do sisal no Nordeste**, Campina Grande: Embrapa Algodão, Circular Técnica, 123, 2008.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro**. Symp. Soc. for Exp. Biol., 11:118-31, 1957.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA NETO, H. P. Aclimatização. In: SOUZA, A. S.; JUNHANS, T. G.(Org.). Introdução a micropropagação de plantas. Cruz das Almas: **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2006. v. 1, p. 131-140.

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. p. irr.

SUINAGA, F. A. et al. **Cultivo de sisal na região semi- árida do nordeste brasileiro.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão, Sistemas de Produção, 05).

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

VAN OVERBEEK, J.; CNKLIN, M.E.; BLAKESLEE, A.F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. **Science, Alexandria**, v.94, p.350-351, 1941.

WHITE, P. R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review of Plant Physiology**, Heidelberg, v.2, n.1, p. 231-244, 1951.

WOODHEAD, J. L.; BIRD, K. T. **Efficient rooting and acclimation of micropropagated *Ruppia maritima* Loisel.** Journal of Marine Biotechnology, New York, v.6, n.3, p.152-156, 1998.

ZAFFARI, G. R.; SOLINAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra de dominância apical sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira, *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p.71-76, 1994.