

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL
[*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] E
AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENOTÍPICA DOS
PROPÁGULOS**

Maria do Desterro Mendes dos Santos

**Brasília, DF
Julho de 2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL
[*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] E
AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENOTÍPICA DOS
PROPÁGULOS**

Maria do Desterro Mendes dos Santos

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Torres

Co-orientador: Dra. Gláucia Cortopassi Salles Buso

Brasília, DF

Julho de 2008

Micropropagação do abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] e avaliação da fidelidade genotípica dos propágulos.

Aprovado pela banca examinadora:

**Dr. Antonio Carlos Torres
Presidente
Embrapa Hortaliças**

**Dra. Dalva Graciano Ribeiro
Membro titular
Universidade de Brasília**

**Dr. Leonardo Silva Boiteux
Membro titular
Embrapa Hortaliças**

**Dra. Raquel de Fátima Novelino
Suplente
Universidade de Brasília**

Data de defesa: 09 de julho de 2008.

Dedico esse trabalho a minha mãe Teresinha de Jesus Mendes Gonçalves dos Santos, ao meu pai Francisco Cardoso dos Santos e aos meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar mais uma vez na busca pelo conhecimento.

À minha mãe Teresinha e ao meu pai Francisco, pela educação que me proporcionaram, e por permitirem que eu saísse de casa em busca da realização de um sonho.

Agradeço às minhas tias Lúcia e Francisca, por terem me acolhido em suas casas, pela compreensão e forma carinhosa que sempre me apoiaram.

Aos meus irmãos que torceram para que eu vencesse mais esta etapa em minha vida.

Desejo expressar um agradecimento especial ao meu orientador, Dr. Antônio Carlos Torres, pela seriedade, ensinamentos na área de cultura de tecidos e confiança de ter-me como orientada.

A professora Gláucia Buso pela orientação e apoio durante a realização do trabalho na área de biologia molecular.

A professora Raquel Novelino pela amizade, incentivo, sugestões ao longo do trabalho e por acreditar em mim e me despertar o interesse pela botânica.

A professora Dalva Graciano Ribeiro pela orientação na área de anatomia vegetal, ensinamentos e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças Leonardo Boiteux e Esther Noronha pelos ensinamentos e sugestões que contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

Aos professores do Mestrado em Botânica, pelo profissionalismo e dedicação, minha gratidão e reconhecimento.

Ao Dr. José Amauri Buso pelas sugestões, informações e discussão em várias etapas do trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular da Embrapa Hortaliças, Leni, Getúlio, Adnondas, André e Chiquinho, meus agradecimentos pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, especialmente a Zilneide pela sua atenção e valiosas sugestões.

As amigas Sabrina, Cadjá, Cinara e Aucilene, pela sincera amizade e solidariedade nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal Eli Noronha (técnico), Daiane e Guilherme pela ajuda prestada na realização do trabalho de anatomia.

Aos amigos José Geraldo, Joyce e Nádia pelo incentivo e ajuda em vários momentos.

A amiga Tatiane Emerick pelas palavras de incentivo, sinceridade e amizade.

Ao Roberto, da informática, pela ajuda na formatação final do trabalho.

Ao amigo Solano, sempre prestativo, que com boa vontade e profissionalismo me auxiliou com as fotografias dos experimentos.

Aos meus colegas do Mestrado em Botânica pelos momentos de aprendizagem compartilhados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

A Embrapa Hortaliças e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo apoio na realização do trabalho.

Finalmente quero expressar meus agradecimentos a todos os meus familiares, que nos últimos dois anos foram privados da minha companhia.

ABREVIACÕES

AG₃ – Ácido giberélico

AIA – Ácido 3-indolilacético

AIB – Ácido 3-indolilbutírico

ANA – Ácido α -naftaleno acético

BAP – N⁶-benzilaminopurina

Cin – Cinetina

2ip- Δ^2 – isopenteniladenina

°C – Graus Célcus

g.L⁻¹ – Grama por litro

KPa – Quilo Pascoal

min – Minuto

mg.L⁻¹ – Miligrama por litro

mL – Mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

μ M – Micromolar

MS – Macro e micronutrientes de Murashige & Skoog (1962)

% – Percentagem

ng/ μ l – Nanograma por microlitro

Pb – Pares de base

PCR – (Polymerase Chain Reaction) – Reação da polimerase em cadeia

pH – Concentração de hidrogênio no meio

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

μ mol.m⁻².s⁻¹ – Micromol por metro quadrado por segundo

μ l – Microlitro

TDZ – Tiazuron

RESUMO

O abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal pertence a família Bromeliaceae. Essa espécie é de propagação vegetativa via propágulos removidos da planta-mãe. Esse tipo de propagação usualmente traz doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, mediante o uso de mudas contaminadas. Uma das maneiras de controlar patógenos é usar plantas estoques livres de doenças, obtidos via cultura de tecidos. O objetivo do trabalho foi o estabelecer um sistema eficiente de propagação massal de plantas livres de doenças do abacaxizeiro ornamental e avaliar a fidelidade genética das propagulos regenerados. Os efeitos da adição de BAP em combinação com ANA e períodos de subcultivo foram estudados na formação de brotações *in vitro*. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso com os tratamentos dispostos no esquema fatorial 6 x 2 x 4, referentes a 6 concentrações BA (0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; e 2,0 mg L⁻¹), duas de ANA (0,0 e 0,1 mg L⁻¹) e 4 períodos de subcultivos (30, 60, 90 e 120 dias). A formação de brotações foi observada em meio suplementado com BAP, em todos os períodos de subcultivos. O maior número médio de brotos por explante (872,2) foi obtido em meio líquido com a concentração de 1,2 mg L⁻¹ de BAP e 120 dias de subcultivo. Na avaliação da fidelidade genética das plantas regeneradas após 120 dias de cultivo foi observado que os tratamentos com BAP nas concentrações de 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ influenciaram o aparecimento de variações genéticas determinadas pelo uso de marcadores RAPD. Os 46 primers utilizados amplificaram 434 bandas monomórficas (95,8%) e 18 foram polimórficas (4,2%), dentre os propágulos regenerados. Também foi estudado o efeito de concentrações de 2ip e diferentes períodos de subcultivos na propagação *in vitro* dessa espécie. Propágulos com, aproximadamente, 1,0 cm de tamanho, oriundos da cultura *in vitro* foram utilizados como explantes. Os explantes foram inoculados em meio básico, formulação líquida, contendo concentrações de 2ip (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) em combinação com quatro períodos de subcultivos (30, 60, 90 e 120 dias). O maior número de brotos por explante (139) foi obtido em meio básico com 1,6 mg L⁻¹ de 2ip e 120 dias de subcultivo. Após a transferência de brotações individualizadas para meio contendo ANA (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹) verificou-se a diferenciação de raízes adventícias na porção basilar dos explantes. As folhas das plantas *in vitro* apresentam a forma lanceoladas e consistem de uma camada de células epidérmicas, hipoderme, parênquima aquífero, parênquima clorofiliano, idioblastos de ráfides, canais de ar e sistema vascular circundado total ou parcialmente por

fibras. Na epiderme ocorrem tricomas e escamas. O processo de pré-aclimatação consiste em abrir as tampas dos frascos de cultura contendo as plantas enraizadas in vitro progressivamente, 4 a 5 dias antes de transplântio para casa de vegetação. O transplântio deve ser feito para vasos contendo o substrato PlantMax ou mistura 1:1 de areia e vermiculita. Em ambas as condições 90% dos propágulos sobrevivem e desenvolvem-se ex vitro. Propágulos que não foram aclimatados apresentaram uma percentagem de sobrevivência de 70%, após transplântio com desenvolvimento inicial lento quando comparado com plantas pré-aclimatadas.

ABSTRACT

The ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] belongs to the Bromeliaceae family. This specie is vegetatively propagated by propagules removed from the mother plant. This kind of propagation brings diseases caused by fungi, bacteria and viruses by using infected propagules. One option to control pathogens is to use disease-free stock plants obtained by tissue culture. The objectives of this work were to establish an efficient system for mass propagation of disease-free plants of ornamental pineapple and to evaluate the genetic fidelity of regenerated plantlets. The effects of the addition of BAP in combination with either NAA or subculture periods were studied in shoot formations *in vitro*. The experiment was arranged as a randomized complete design in a factorial disposition 6 x 2 x 4, referring to six BAP (0.0; 0.125; 0.25; 0.5; 1.0; and 2.0 mg L⁻¹) and two NAA (0.0 and 0.1 mg L⁻¹) concentrations and four subculturing periods (30, 60, 90 e 120 days). Shoot formations were observed in medium supplemented with BAP in all subculturing periods. The maximum average number of shoots per explant (872,2) was obtained in liquid medium with 1.2 mg L⁻¹ BAP and 120 days of subculture. In the evaluation of genetic fidelity of micropropagated plants, after 120 days in culture, it was observed that BAP in concentrations of 0.125; 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹ influenced the appearance of genetic variation in the regenerated propagules using RAPD markers. The 46 primers used amplified 434 monomorphic bands (96.66%) and 22 were polymorphics (4.44%), among regenerated plants. The effect of 2ip concentrations and subculture periods in the micropropagation of ornamental pineapple was also studied. Propagules with approximately 1.0 cm in height, originated from *in vitro* culture were used as explants. The explants were inoculated in basal medium, liquid formulation, with 2ip in concentrations of 0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) in combination with four subculture periods of 30, 60, 90 and 120 days. The maximum number of shoot production per explant (139) was obtained in basal medium with 1.6 mg L⁻¹ de 2ip and 120 days of subculture. After transferring individual shoots to NAA (0.0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 and 4.0 mg.L⁻¹) media adventitious root formed in the basal portion of the explants. The leaves of the *in vitro* plants presented a laceolated form and consisted of an epidermal layer of cells, hypoderme, aquiferous parenchyma, chlorophyllous parenchyma, raphydes idioblastes, and vascular system circundated total or partially by fibers. Tricomes and scales were found in the epidermis. The pre-acclimatization process consisted in opening the closure of the culture flasks containing *in vitro* rooted plantlets progressively five days prior to

transplanting them to the greenhouse. The transplanting was done in pots containing PlantMax substrate or a mixture of sand and vermiculate in the proportion 1:1 v/v. In both conditions 90% of the plantlets survived and developed *ex vitro*. Non acclimatized plantlets showed a 70% survival rate after they were transferred to substrate and they presented slow initial growth as compared with acclimatized plants.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVII
INTRODUÇÃO GERAL	1
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	2
REVISÃO DE LITERATURA	4
Distribuição geográfica e taxonomia	4
Aspectos morfológicos	5
Espécies ornamentais.....	8
<i>Ananas comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (L.B. Smith) Coppens & Leal.....	8
<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (Lindl.) Coppens & Leal	8
<i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i> (Baker) Coppens & Leal	9
Condições de clima e solo	9
Propagação	10
Cultura de tecidos	10
Análise da variabilidade genética dos propágulos via marcadores moleculares.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA, ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PROPAGAÇÃO MASSAL DO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL.	36
Resumo	37
Abstract.....	38
Introdução.....	38
Material e métodos	39
Resultados e discussão	40
Conclusões.....	43
Agradecimentos.....	43
Referências bibliográficas	43
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [<i>Ananas comosus</i>	

var. <i>bracteatus</i> (Lindley) Coppens & Leal] UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES TIPO RAPD	53
Resumo	54
Abstract.....	55
Introdução.....	55
Material e métodos	57
Resultados e discussão	58
Agradecimentos.....	60
Referências bibliográficas	61
CAPÍTULO 3. EFEITO DE ISOPENTENILADENINA E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PRODUÇÃO DE BROTAÇÕES <i>IN VITRO</i> DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL	71
Resumo	72
Abstract.....	73
Introdução.....	73
Material e métodos	74
Resultados e discussão	75
Conclusões.....	76
Agradecimentos.....	77
Referências bibliográficas	77
CAPÍTULO 4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DE FOLHAS DE PLANTAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (Lindley) Coppens & Leal] PROPAGADAS <i>IN VITRO</i>	87
Resumo	88
Abstract.....	89
Introdução.....	89
Material e métodos	90
Resultados e discussão	91
Agradecimentos.....	95
Referências bibliográficas	95
ANEXOS	101
ANEXO 1 - ESTABELECIMENTO DA CULTURA <i>IN VITRO</i> DE GEMAS AXILARES DO <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	101
Referências bibliográficas	102

ANEXO 2 – INDUÇÃO DE NÓDULOS E DIFERENCIAÇÃO DE BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS DE EXPLANTES FOLIARES DO <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> IN VITRO	106
Referências bibliográficas	107

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL	1
Tabela 1. Correspondência entre a classificação de Smith & Downs (1979) e a presente classificação.....	7
Tabela 2. Relação do tipo de explante, formulação salina, suplemento hormonal e resposta morfo genética de abacaxizeiro	16
Tabela 3. Relação do tipo de explante, formulação salina, suplemento hormonal e resposta morfo genética de genótipos de abacaxizeiro ornamental cultivados <i>in vitro</i>	19
CAPÍTULO 1. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA, ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PROPAGAÇÃO MASSAL DO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL	36
Tabela 1. Resumo da análise de variância para número e massa fresca de brotações de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> , em função da concentração de BAP, concentração de ANA e período de subcultivo.	48
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (Lindley) Coppens & Leal] UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES TIPO RAPD	53
Tabela 1. Código e seqüência de 46 <i>primers</i> RAPD, números de produtos polimórficos e total de amplificons (bandas) gerados com na análise de brotações micropropagadas de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> durante 120 dias de subcultivo em meio suplementado com BAP.....	66
Tabela 2. Descrição e quantificação de parâmetros associados com a análise genética de 95 propágulos micropropagados e uma planta matriz de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> utilizando o sistema de marcadores RAPD.	67
Tabela 3. Presença (+) ou ausência (-) de fragmentos polimórficos de RAPD, gerados por primers, em <i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> , provenientes de meio com diferentes concentrações de BAP, após 120 dias de cultivo.	68
Tabela 4. Valores do Qui-quadrado (X^2) e a probabilidade (p) do teste de contingência na avaliação da fidelidade genética (indivíduos normais e indivíduos variantes) entre	

propágulos do abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) oriundos da cultura de tecidos de uma gema, em comparação com a planta matriz..... 69

CAPÍTULO 3. EFEITO DE ISOPENTENILADENINA E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PRODUÇÃO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL 71

Tabela 1. Resumo da análise de variância para número e massa fresca de brotações de *Ananas comosus* var. *bracteatus*, em função de concentrações de 2ip e períodos de subcultivos..... 80

Tabela 2. Resumo da análise de variância para a média do número de raízes, massa fresca das raízes, altura da planta e massa fresca da parte aérea a partir de propágulos submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA)..... 81

ANEXO 1 - ESTABELECIMENTO DA CULTURA *IN VITRO* DE GEMAS AXILARES DO *Ananas comosus* var. *bracteatus* 101

Tabela 1. Efeito de diferentes meios de cultura na percentagem de explantes desenvolvidos de abacaxizeiro ornamental. 104

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL	1
Figura 1. Distribuição global do gênero <i>Ananas</i> segundo Py (1969).....	5
CAPÍTULO 1. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA, ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PROPAGAÇÃO MASSAL DO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL	36
Figura 1. Variação do número de brotações em explantes de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> em função da concentração de BAP, na ausência de ANA, nos períodos de subcultivos de (a) 30, 60, (b) 90 e 120 dias.....	49
Figura 2. Variação da massa fresca de brotações de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> em função da concentração de BAP, na ausência de ANA, no período de subcultivo de 60, 90 e 120 dias.....	50
Figura 3. Variação do número de brotações em explantes de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> em função da concentração de BAP, na presença de ANA, nos períodos de subcultivos de (a) 30, 60, (b) 90 e 120 dias.....	51
Figura 4. Variação da massa fresca de brotações em explantes de <i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> em função da concentração de BAP, na presença de ANA, nos períodos de subcultivos de (a) 60, (b) 90 e 120 dias.....	52
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (Lindley) Coppens & Leal] UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES TIPO RAPD	53
Figura 1. Eletroforese em géis de agarose 1,5%, de indivíduos mantidos <i>in vitro</i> em meio basal líquido suplementado com BAP, subcultivados a cada 30 dias e analisados via RAPD após 120 dias, mostrando fragmentos de RAPD resultantes de ampliações com os <i>primers</i> : (a) OPC-19; (b) OPF-13 e (c) OPM-13. As setas indicam os marcadores polimórficos.....	70

CAPÍTULO 3. EFEITO DE ISOPENTENILADENINA E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PRODUÇÃO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL 71

Figura 1. Efeito de concentrações de 2ip na média do número de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 30 e 60 dias. 82

Figura 2. Efeito de concentrações de 2ip na média do número de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 90 e 120 dias. 82

Figura 3. Efeito de concentrações de 2ip na média da massa fresca de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 30 e 60 dias. 83

Figura 4. Efeito de concentrações de 2ip na média da massa fresca de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 90 e 120 dias. 83

Figura 5. Brotações enraizadas em meio contendo ANA (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹) respectivamente, aos 30 dias após a inoculação. 84

Figura 6. Variação do número de raízes por explante em função da concentração de ANA. 85

Figura 7. Variação na massa fresca de raízes por explante em função da concentração de ANA. 85

Figura 8. Variação da massa fresca da parte aérea por explante em função da concentração de ANA. 86

CAPÍTULO 4. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DE FOLHAS DE PLANTAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] PROPAGADAS *IN VITRO* 87

Figura: 1. Morfologia da planta e cortes histológicos da folha de abacaxizeiro ornamental micropropagado. 99

Figura 2. Cortes histológicos da folha de plantas de abacaxizeiro ornamental desenvolvidas *in vitro*. 100

ANEXO 1 - ESTABELECIMENTO DA CULTURA *IN VITRO* DE GEMAS AXILARES DO *Ananas comosus* var. *bracteatus* 101

Figura 1. (a) Fonte de explante do abacaxizeiro ornamental; (b) explante utilizado para estabelecimento das culturas *in vitro*. 103

Figura 2. Brotações desenvolvidas *in vitro* em abacaxizeiro ornamental a partir de gemas axilares inoculadas em diferentes meios de cultura, conforme ilustrado. 105

**ANEXO 2 – INDUÇÃO DE NÓDULOS E DIFERENCIAÇÃO DE BROTAÇÕES
ADVENTÍCIAS DE EXPLANTES FOLIARES DO *Ananas comosus* var. *bracteatus***

..... 106

Figura 1. Diferenciação de calo e nódulos na base da folha de *A. comosus* var. *bracteatus*
em meio suplementado com picloran 108

INTRODUÇÃO GERAL

O abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal) é uma planta monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae (Coppens & Leal, 2003), que apresenta 56 gêneros (Grant & Zijlstra, 1998) e 3.270 espécies (Luther, 2000), sendo que no Brasil ocorrem cerca de 40 gênero e 1200 espécies (Souza & Lorenzi, 2005).

A maioria dos membros da família Bromeliaceae tem distribuição neotropical. (Collins, 1960; Coppens & Leal, 2003). No Brasil, os representantes da família são encontrados da região Norte à Sul, em todos os ecossistemas, sendo que na região Sudeste apresentam maior diversidade de espécies, principalmente, na área da Mata Atlântica (Paula & Silva, 2004).

Algumas espécies de bromélias têm importância social, podendo ser usadas na alimentação, na indústria, na produção de fibras e para a fabricação de material rústico, cordas e tecidos (Lawrence, 1977; Reinhardt, 2000). Outras bromélias apresentam potencial ornamental, o que vem causando o declínio das populações naturais de algumas espécies (Souza & Lorenzi, 2005).

O abacaxizeiro ornamental é uma espécie muito apreciada no mercado interno e externo de flores, onde seu cultivo e comercialização movimentam recursos econômicos significativos (Souza *et al.*, 2004). No Estado do Ceará, quase toda a produção tem sido destinada para o mercado externo, especialmente para a Alemanha, Holanda e Estados Unidos (Correia *et al.*, 2000). Duas variedades botânicas possuem grande demanda como flores de corte: *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L.B. Smith) Coppens & Leal e *A. comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal. Estas espécies são propagadas vegetativamente, podendo (se não forem tomados os cuidados devidos) resultar na introdução de patógenos nos campos de produção via mudas contaminadas. Além disso, o acúmulo de patógenos, após diversos ciclos de propagação clonal, pode resultar em uma intensificação da incidência e severidade destas doenças. Em condições naturais, cada planta produz até dez mudas por ano, sendo a demanda por mudas sadias um fator limitante para a expansão da cultura (Correia *et al.*, 2000). Desta forma, existe uma demanda do agronegócio de plantas ornamentais no sentido de obter mudas de melhor qualidade fitossanitária isentas, principalmente, do fungo causador da fusariose ou gomose (Reinhardt & Cunha, 1999).

Neste contexto, o estabelecimento de técnicas eficientes para a obtenção, em larga escala, de mudas contribuirá, em muito, para o sistema produtivo do abacaxizeiro ornamental. Assim sendo, a propagação massal de mudas *in vitro* com alta qualidade fitossanitária e genética, suprirá a demanda pelo produto e contribuirá para a melhoria do sistema de produção dessa espécie, contornando potenciais barreiras que poderão ser impostas pelo mercado internacional.

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Segundo a Organização Mundial de Comércio (OMC), o mercado mundial de flores é um segmento de grande importância econômica. Estima-se uma área plantada de 190 mil hectares e uma taxa de crescimento anual em torno de 10%. Esse mercado movimenta cerca de 49 bilhões de dólares, desde a fase de produção até a entrega final do produto, com crescimento anual de 6,26 milhões nos últimos anos (Aki, 2002). São gerados, aproximadamente, 480 mil empregos diretos, além de um grande número de empregos indiretos (Vilela, 2002). Tudo isso é o reflexo dos investimentos em tecnologia no setor, tornando a atividade agrícola altamente rentável, fixadora de mão de obra no campo e constituindo uma alternativa para pequenos proprietários (Lins & Coelho, 2004).

A demanda do mercado mundial de plantas ornamentais é suprida pelas flores de regiões tropicais e de regiões temperadas (Aki, 2002). As flores tropicais apresentam algumas vantagens na comercialização em relação às flores de regiões temperadas, incluindo aspecto exótico, forte impacto visual, beleza, alta durabilidade pós-colheita, aceitação no mercado externo, menor custo de aquisição e maior adequação para uso em decoração de grandes espaços (Aki, 2002; Loges *et al.*, 2005). Do ponto de vista econômico, o cultivo de plantas ornamentais pode apresentar alta rentabilidade por área cultivada, atingindo valores de cerca de 3 a 5 vezes superiores aos obtidos com fruticultura e chegando, até 10 vezes superior, o lucro obtido com a produção de grãos (Ribeiro, 2001).

A floricultura brasileira engloba o cultivo de flores e plantas ornamentais para variados fins, principalmente, flores de corte e paisagismo. Somente a partir da década de 1990, com a introdução de novas tecnologias, nos vários setores da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais, verificou-se um crescimento significativo dos produtos de floricultura e paisagismo (IBRAFLOR, 2001).

Em 2007, as exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais atingiram o valor de 35,3 milhões de dólares (Junqueira & Peetz, 2008). No Brasil, a floricultura ocupa

uma área de, aproximadamente, 4.500 hectares, incluído neste total o cultivo em estufa (700 hectares). Este setor conta com 5.000 produtores e 4.000 lojistas, sendo que a maior parte destes está concentrada no Estado de São Paulo (Vilela, 2002). O perfil das regiões produtoras coloca o estado de São Paulo em primeiro lugar com, aproximadamente, 70% da produção nacional, sendo grande parte desta (74%) exportada, fazendo com que esse estado seja considerado referência nacional na área. Em São Paulo a distribuição de flores acontece em três grandes centros de comercialização por atacado, o mercado de flores da companhia de Entrepostos e Armazéns gerais de São Paulo (CEAGESP), o mercado Permanente de Flores e Plantas Ornamentais da Central de Abastecimento S/A de Campinas (CEASA) e Veling Holambra, onde é realizado, diariamente, o leilão de flores e plantas ornamentais nas dependências da Cooperativa Agropecuária Holambra (Arruda *et al.*, 1996).

A região Sul do Brasil tem contribuído com o desenvolvimento do mercado de flores, especialmente, devido à concentração de imigrantes europeus, principalmente, italianos e alemães. De fato, o Brasil apresenta um grande potencial para a produção de flores tropicais. Para tal, o país apresenta uma grande variedade de microclimas, solo, disponibilidade de água e mão de obra (Castro *et al.*, 1998). As regiões Norte e a Nordeste vêm apresentado um crescimento consistente, especialmente nos Estados do Amazonas, Ceará, Bahia e Pernambuco. As condições edafoclimáticas destas regiões têm contribuído para o desenvolvimento desse potencial (Souza *et al.*, 2004). Produtores destas regiões começam a se organizar e o alvo é o mercado externo, procurando explorar o exotismo das flores e plantas ornamentais tropicais como as helicônias, o abacaxizeiro ornamental e as dracenas, dentre outras espécies que agradam o gosto exótico dos estrangeiros (Okuda, 2000). Deve-se ressaltar que, atualmente, o Ceará, apresenta grande dinamismo tecnológico e condições edafoclimáticas, tecnológicas e logísticas, para o desenvolvimento da floricultura tropical e colocação do produto no mercado internacional (Kiyuna *et al.*, 2003).

O consumo de flores no Brasil é considerado pequeno. O brasileiro gasta com flores apenas US\$ 7 per capita/ano enquanto que nos países europeus esse consumo é, em média, US\$ 100 (Silva, 2000). Um fator que permite aumentar o otimismo do produtor brasileiro é que o mercado brasileiro consumidor de flores é um dos menos explorados do mundo, existindo a possibilidade de dobrar o consumo a curto prazo (Okuda, 2000). Nesse contexto deve-se considerar o aprimoramento do sistema produtivo para produzir flores de qualidade e gerar crescimento mercado interno e de exportação (Okuda, 2000). A

utilização de novas tecnologias e manejo correto da cultura são práticas essenciais para a redução de custo e aumento da produtividade (Ribeiro, 2001).

A busca por novas espécies de ornamentais tem crescido muito nos últimos anos, principalmente, aquelas marcadas pela originalidade, durabilidade e beleza. Diante dessa exigência surgem também como alternativas as fruteiras ornamentais para um mercado em expansão. Nesse contexto, o abacaxizeiro ornamental pode proporcionar plantas de efeito paisagístico para compor jardins e parques, bem como podem ser comercializados em vaso ou como flores, folhagens e minifrutos de corte (Souza *et al.*, 2004).

REVISÃO DE LITERATURA

Distribuição geográfica e taxonomia

O abacaxizeiro é originário da região compreendida entre os paralelos 15° N e 30° S de latitude e 40° L e 60° W de longitude. Essas coordenadas geográficas correspondem às regiões Norte, Central e Sul do Brasil, a Nordeste da Argentina e o Paraguai (Baker & Collins, 1939). Outros estudos consideram que o gênero *Ananas* tem como centro de origem a região da Amazônia compreendida entre 10° N e 10° S de latitude 55° L e 75° W de longitude, uma vez que nesta região é encontrado o maior número de espécies consideradas válidas até o momento. Assim, a região Sudeste do Brasil tem sido considerada um segundo centro de diversificação do gênero (Cunha & Cabral, 1999). A Figura 1 ilustra a distribuição do gênero *Ananas* no mundo.

De acordo com Collins (1960) o abacaxizeiro pertence a dois gêneros da família Bromeliaceae, denominados *Ananas* e *Pseudoananas*, separados dos demais por apresentar o tipo de fruto classificado como sincárpico. Collins (1960) considera que o gênero *Ananas* é composto por cinco espécies: *Ananas bracteatus*, *A. fritzmuelleri*, *A. ananassoides*, *A. erectifolius*, *A. comosus* e o *Pseudoananas* pela espécie *Pseudoananas sagenarius*. Outros autores, como Cunha & Cabral (1999) incluem oito espécies dentro do gênero *Ananas*, a saber: *A. monstrosus* (Carr.) L.B. Smith, *A. ananassoides* (Baker) L.B. Smith, *A. nanus* L.B. Smith, *A. paraguayensis* Camargo & L.B. Smith, *A. lucidus* Mill., *A. bracteatus* (Lindl.) Schult. & Schult. f., *A. comosus* (L.) Merr. 1917 e *A. fritzmuelleri* Camargo.

Coppens & Leal (2003), baseando-se em características morfológicas, bioquímicas, moleculares e, em dados da biologia reprodutiva, propuseram uma nova classificação para o abacaxizeiro como pertencente ao gênero *Ananas*. Nesta nova classificação o

abacaxizeiro e grupos taxonômicos correlatos são reorganizados dentro de um único gênero com duas espécies, a saber: *A. comosus* (L.) Merrill, incluindo cinco variedades e *Ananas macrodontes*. A tabela 1 mostra a comparação desta classificação recentemente proposta com aquela usada anteriormente

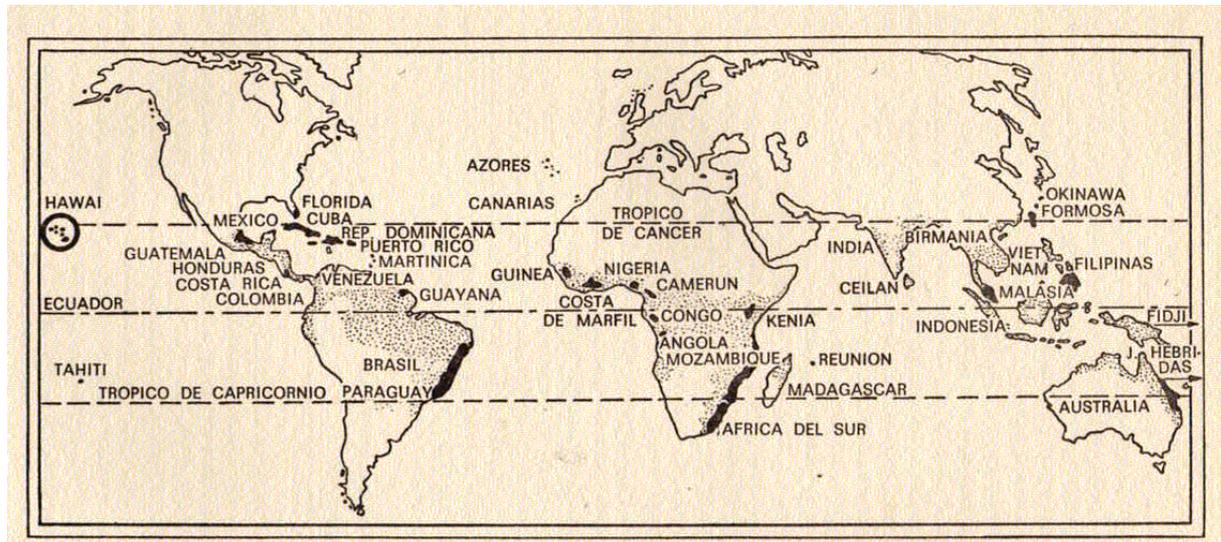


Figura 1. Distribuição global do gênero *Ananas* segundo Py (1969).

Aspectos morfológicos

As espécies do gênero *Ananas* são plantas herbáceas, perenes (Reinhardt, 2000) ou semiperenes (Manica, 2000) com agrupamento de folhas ao redor do caule formando uma calha. Uma planta adulta, de propagação vegetativa, apresenta as seguintes partes: **raízes adventícias**, originadas da parte subterrânea ou aérea do caule; **caule, talo** ou **eixo principal**, estrutura onde se inserem os demais órgãos; **pedúnculo**, haste ligada ao caule que sustenta o fruto em sua extremidade distal; **folhas**, estruturas laminares inseridas ao caule e pedúnculo; o **fruto** se desenvolve na porção distal do pedúnculo; **coroa**, caule curto com folhas desenvolvendo-se no ápice do fruto; **filhotes**, mudas originadas de gemas axilares do pedúnculo, localizadas abaixo do fruto; **filhote-rebento**, mudas originadas de gemas axilares localizadas na união do pedúnculo com o caule; **rebento-lateral**, muda originada de uma gema axilar da parte aérea do caule; **rebentão**, muda originada de gemas da parte subterrânea do caule (Collins, 1960; Manica, 2000).

As raízes do abacaxizeiro são classificadas como primárias, secundárias e adventícias de acordo com a sua origem. As raízes primárias são originadas da radícula do embrião da semente e desenvolvem-se nas plântulas. Essas raízes apresentam vidas

efêmeras e desaparecem, sendo substituídas por raízes adventícias. As raízes secundárias formam-se a partir das raízes adventícias (Collins, 1960). A planta adulta apresenta um sistema radicular fasciculado e superficial (Manica, 2000). Algumas raízes emergem da região internodal do caule na axila das folhas e apresentam forma achatada, enrolando-se no caule, pressionando a base da folha contra o mesmo (Collins, 1960).

O caule, talo ou eixo principal é grosso com tamanho de 25 a 30 cm de comprimento por 2,5 a 3,5 cm de largura na região basal e de 5,5 a 6,0 cm abaixo do solo. O caule suporta toda a planta e de onde se originam as raízes, as folhas, os filhotes-rebentos, os rebentos-laterais, o rebento enraizado e o pedúnculo. Apresentam internós curtos. As folhas se desenvolvem ao redor do caule, em toda sua extensão, formando uma calha. A planta apresenta uma altura de 75 a 130 cm e as folhas fazem uma circunferência de até 150 cm de diâmetro (Collins, 1960; Manica, 2000; Reinhardt, 2000).

As folhas apresentam a consistência dura, de bordas providas de espinhos ou não, com tamanho e forma diferentes. As folhas mais velhas estão localizadas na base do caule, na parte externa da planta e as mais novas em direção ao centro. Em geral, as folhas são lanceoladas com um estreitamento próximo a base. A porção abaixo dessa constrição é larga e envolve o caule (Collins, 1960; Manica, 2000).

O pedúnculo é uma haste que se desenvolve a partir da atividade do meristema caulinar apical, quando a planta é induzida ao florescimento. O pedúnculo sustenta a inflorescência e o fruto. Também, do pedúnculo podem desenvolver brotações axilares que formam mudas do tipo filhote (Collins, 1960; Purseglove, 1972; Manica, 2000).

A inflorescência se inicia após a fase juvenil, sob o pedúnculo, sendo classificada como espiga, as flores são sésseis e estão inseridas ao longo da haste, muito próximas umas das outras. As flores são hermafroditas, estão localizadas na axila de uma bráctea; são trímeras, com três pétalas (liguliformes, coloração azul-púrpura e branca na base), três sépalas, seis estames carnosos, dispostas em dois verticilos (dois planos), pistilo tricarpelar, estilete com três estigmas e ovário ínfero (Py, 1969; Manica, 2000).

O fruto é classificado como múltiplo ou infrutescência resultante da fusão de frutinhos individuais que se inserem no eixo central da inflorescência, de forma espiralada (Py, 1969; Collins, 1960; Souza, 2006).

A **coroa** é uma brotação vegetativa que se desenvolve na parte apical do fruto, sendo formada pelo crescimento continuado do meristema apical do pedúnculo através do fruto. Nesse processo há reversão da formação de gemas florais para vegetativas, formando novas folhas (Collins, 1960; Purseglove, 1981; Manica, 2000).

Tabela 1. Correspondência entre a classificação de Smith & Downs (1979) e a presente classificação.

Smith & Downs (1979)	Classificação atual (Coppens & Leal, 2003)
<i>Pseudoananas sagenarius</i> (Arruda da Camara) Camargo	<i>Ananas macrodontes</i> Morren
Gênero <i>Ananas</i> Miller incluindo 8 espécies	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill incluindo 5 variedades botânicas
<i>Ananas ananasoides</i> (Baker) L. B. Smith	<i>Ananas comosus</i> var. <i>ananassoides</i> (Baker)
<i>Ananas nanus</i> (L.B. Smith) L. B. Smith	Coppens & Leal
<i>Ananas lucidus</i> Miller	<i>Ananas comosus</i> var. <i>erectifolius</i> (L.B. Smith) Coppens & Leal
<i>Ananas paraguayensis</i> Camargo & L.B. Smith	<i>Ananas comosus</i> var. <i>paraguayensis</i> (Camargo & L.B. Smith) Coppens & Leal
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
<i>Ananas monstrosus</i>	Invalidado por Leal (1990)
<i>Ananas bracteatus</i> (Lindley) Schultes f.	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (Lindl.)
<i>Ananas fritzmuelleri</i> Camargo	Coppens & Leal

As variedades diplóides produzem pólen e óvulos funcionais, mas apresentam auto-incompatibilidade (Loison-Cabot, 1990) resultante do crescimento insuficiente do tubo polínico em direção ao saco embrionário. Apenas em polinização cruzada intervarietal pode levar a formação de semente (Purseglove, 1981; Reinhardt, 1985). A polinização é feita por beija-flor. As abelhas visitam as flores a procura de néctar, mas são incapazes de polinizar as flores (Purseglove, 1981).

Espécies ornamentais

***Ananas comosus* var. *erectifolius* (L.B. Smith) Coppens & Leal**

No Brasil essa espécie é conhecida por nomes populares como curagua, curauá, curaná, kulaiwat. Também, é chamado de *Ananas lucidus*, caracteriza-se por desenvolver em campo aberto, sob alta luminosidade, em solo arenoso e clima tropical (Borges *et al.*, 2003). As folhas são rígidas, espessas, eretas com, aproximadamente, 1,0 m de comprimento e 3,5 cm de largura, apresentando coloração púrpura e desprovida de espinhos exceto por um forte acúleo no ápice (Borges *et al.*, 2003). A inflorescência possui brácteas florais pequenas e lisas, localizadas na posição distal de uma haste de até 80 cm de comprimento. A infrutescência é ereta, de coloração vermelha, com tamanho entre 8 a 10 cm, excluindo a coroa que é relativamente grande. Às vezes a coroa principal é rodeada por diversas coroas menores (Giacomelli & Py, 1981). Devido às suas características tropicais, como coloração intensa e morfologia bastante peculiar despertam interesse de compradores em diversos países (Borges *et al.*, 2003). O Brasil é o único país que possui plantio comercial da espécie *A.comosus* var.*erectifolius* com, aproximadamente, 12 hectares e uma exportação mensal de 30.000 hastes florais para a Alemanha, Estados Unidos e Holanda (Alonso Lamas, comunicação pessoal).

***Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal**

O *Ananas comosus* var. *bracteatus* é uma planta herbácea, perene, rizomatosa, com altura variando entre 50-60 cm (Lorenzi & Souza, 1999), as folhas são largas, compridas com espinhos afiados, as flores possuem brácteas longas cobrindo o ovário, grosseiramente, serrilhadas, geralmente, vermelhas ou rosas (Giacomelli & Py, 1981). Essa espécie é conhecida como ananás-de-cerca, ananas bravo, ananás-do-mato, karaguata-ruha (Giacomelli & Py, 1981), abacaxí-vermelho, ananás-vermelho e ananás ornamental (Lorenzi & Souza, 1999). Dentre as variedades mais cultivadas destaca-se a variedade tricolor com folhas variegadas com faixas longitudinais de cor branca-amareladas com

matizes rosadas, com grande potencial ornamental para os floricultores do mundo inteiro (Giacomelli & Py, 1981). À medida que o fruto se desenvolve seus bordos começam a ficar rubro brilhante. O fruto tem polpa fibrosa e ácida, mede acima de 10 cm de comprimento, podendo chegar ao tamanho das cultivares de abacaxizeiros comerciais, sendo sustentado por um pedúnculo acima de 15 cm (Cunha & Cabral, 1999). Na parte superior do fruto há uma brotação denominada coroa, com cerca de 15 cm de comprimento. Esta espécie é muito cultivada como cerca-viva ou para produção de sucos (Giacomelli & Py, 1981).

***Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & Leal**

Essa espécie é o tipo de abacaxizeiro selvagem mais comum, apresentando alta diversidade genética (Coppens & Leal, 2003). Ocorre em toda região tropical, leste da América do Sul e dos Andes. No Brasil, esta espécie é encontrada em campos naturais e cerrados, sendo conhecido como ananás-de-campo. A infrutescência possui um pedúnculo delgado, longo e sinuoso com um tamanho médio de até 15 cm de comprimento (desconsiderando a coroa). A planta possui folhas longas, estreitas e recurvadas, com espinhos proeminentes (Giacomelli & Py, 1981).

Condições de clima e solo

Dentre os fatores climáticos que afetam o desenvolvimento das plantas do gênero *Ananas* se destacam a temperatura, luminosidade e fotoperíodo (Py, 1969; Botrel & Siqueira, 1985; Manica, 2000). De acordo com Py (1969) a temperatura é um dos principais fatores que limita a dispersão do gênero *Ananas* no mundo (Figura 1). A planta não tolera geadas e seu crescimento é prejudicado sob temperaturas baixas. Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos específicos referentes às exigências edafoclimáticas do abacaxizeiro ornamental. Para a espécie *A. comosus* var. *comosus* a **temperatura** ideal para o seu crescimento e desenvolvimento situa-se entre 22°C a 32°C (Reinhardt *et al.*, 2000). Plantas cultivadas em temperaturas abaixo de 20°C apresentam redução do desenvolvimento vegetativo (Botrel & Siqueira, 1985). Temperaturas elevadas (acima de 40°C) também costumam ser prejudiciais, principalmente, por propiciarem queima de folhas e frutos, principalmente, se combinadas com alta insolação pelos raios solares (Bartholomew & Kadzimi, 1977; Giacomelli, 1982).

Também a **luminosidade** tem influência sobre o desenvolvimento da cultura. Um total mensal de 1.200 a 1.500 horas de sol é considerado o mínimo necessário para a

cultura; insolação mensal na faixa de 1.500 a 2.000 horas é considerada uma boa insolação; um total mensal entre 2.500 a 5.500 horas de insolação é considerada ótima para a cultura (Manica, 2000).

A planta apresenta um sistema radicular superficial onde a maioria das raízes ocupa os primeiros 25 a 35 cm do solo (Manica, 2000). Desse modo, a planta é bastante sensível quanto às condições de drenagem do solo. O encharcamento prejudica o seu crescimento e favorece o apodrecimento de suas raízes. A aeração do solo e a presença de umidade regular favorecem o bom desenvolvimento do sistema radicular (Manica, 2000). Um solo ideal é aquele que não retém o excesso de água, sendo a permeabilidade característica favorável do solo. O pH do solo considerado ideal para o desenvolvimento da cultura deve situar-se na faixa de 4,5 à 5,5 (Py, 1960; Manica, 2000).

Propagação

Com exceção dos trabalhos de melhoramento genético, as espécies comerciais do gênero *Ananas* são de propagação vegetativa, via mudas oriundas de diversas partes da planta, que recebem denominações específicas de acordo com sua origem. Por exemplo, **coroa** (brotação que se forma na parte superior do fruto), **filhote** (brotação do pedúnculo), **filhote rebentão** (brotação intermediária entre o filhote e rebentão) e **rebetão** (brotação do caule) (Rangan, 1984; Reinhardt, 2000). As mudas originadas a partir da coroa são pouco usadas, pois as coroas acompanham os frutos na comercialização (Reinhardt, 2000). A qualidade das mudas usadas na propagação vegetativa é um fator decisivo para obtenção de lavouras produtivas, com boa uniformidade e bom estado fitossanitário. A utilização de mudas infectadas com *Fusarium subglutinans* e cochonilha [*Dysmicoccus brevipes* (Cockerel)] apresenta sérias desvantagens, incluindo a possibilidade de introdução de doenças e a conseqüente queda na produtividade das lavouras (Reinhardt & Cunha, 1999). A cultura de tecidos é uma alternativa para a produção de mudas com alta qualidade fitossanitária, em larga escala, em pequena área de laboratório, independente da época do ano, para plantios comerciais de plantas de propagação vegetativa.

Cultura de tecidos

A cultura de células, tecidos ou órgãos excisados de plantas é aquela conduzida em condições assépticas, em meio nutritivo, e mantidas com controle de luminosidade, fotoperíodo e temperatura. A parte da planta que é excisada é denominada explante. As terminologias cultivo *in vitro* e micropropagação também têm sido empregadas como

sinônimos de cultura de tecidos (Murashige, 1979; Torres *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2001).

O trabalho pioneiro de cultura de tecidos vegetais foi realizado por Haberlandt (1902) citado por Krikorian & Berquam (1969), que tentou demonstrar a totipotencialidade das células das plantas pela habilidade das mesmas em regenerar novas plantas via embriogênese ou organogênese. Entretanto, nenhum sucesso foi obtido de seus experimentos, em virtude da escolha de espécies e explantes inadequados para o trabalho de regeneração *in vitro* e ausência de substâncias reguladoras na suplementação dos meios nutritivos. Os primeiros avanços na cultura de tecidos iniciaram-se com os trabalhos de White (1934) que manteve ápices radiculares de tomateiro, *in vitro* em meio líquido por um período indefinido. Skoog & Tsui (1948) observaram a regulação química da formação de raiz e parte aérea em calo de fumo; Miller *et al.* (1955) e Skoog & Miller (1957) descobriram a citocinina e relataram que a formação de raiz, parte aérea e calo *in vitro* é regulado pelo balanço auxina/citocinina.

A cultura de tecidos constitui uma das áreas de êxito na biotecnologia de plantas, com grande destaque na propagação comercial de genótipos elites, no melhoramento genético, no intercâmbio e conservação de germoplasma, transformação genética de plantas e produção *in vitro* de moléculas do metabolismo secundário e aplicações na pesquisa básica de fisiologia vegetal (Giacometti, 1990).

A aplicação comercial de cultura de tecidos de planta iniciou-se na França com o trabalho de Morel (1960) de recuperação de plantas de *Cymbidium* livres de vírus, permitindo a multiplicação rápida de material e produção de mudas uniformes, com alta qualidade fitossanitária. Essa técnica foi aplicada, com sucesso na multiplicação de outras espécies ornamentais: *Crisanthemum* spp.; *Dracena* spp.; *Dizygotheca* spp.; *Dianthus caryophyllus* L. Na década de 1980, desenvolveu-se a micropropagação de espécies lenhosas e frutíferas (Giacometti, 1990). Na década de 1990 estavam no mercado as primeiras plantas transgênicas (Brasileiro & Dusi, 1999).

Nas espécies do gênero *Ananas* a cultura de tecidos de plantas tem sido empregada para a produção de plantas livres de doenças, produção de mudas uniformes, multiplicação em larga escala, intercâmbio e conservação de germoplasma e melhoramento genético (Zepeda & Sagawa, 1981; Rangan, 1984; Reinhardt & Cunha, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2001; Gottardi, 2002; Feuser, 2003; Costa & Zaffari, 2005). Os explantes mais utilizados são as gemas axilares das mudas do tipo coroa, embora outros tipos de mudas possam ser usados para excisão de gemas axilares. Drew (1980) informa que esses explantes são os melhores para a propagação do abacaxizeiro,

tendo boa sobrevivência em meio de cultura e, com a quebra da dominância apical do broto há estímulo para a formação de gemas múltiplas. Dewald *et al.* (1988) estimaram que uma gema axilar em cultura, no décimo terceiro mês, pode produzir entre 210 a 380 propágulos para a cultivar ‘Pelorela’; 300 a 350 para o genótipo ‘PR-1-67’; e 40 a 85 para a cultivar ‘Smooth Cayenne’. As projeções mais otimistas indicam uma produção de 5.000 plantas no final de um ano, a partir de uma gema da coroa (Zepeda & Sagawa, 1981).

Explantos foliares (Mathews & Rangan, 1979; Teng, 1997; Sripaoraya *et al.*, 2003; Firoozabady & Moy, 2004; Carvalho *et al.*, 2005) e de secções de caule (Firoozabady & Moy, 2004) também têm sido usados na propagação *in vitro* do gênero *Ananas*, produzindo plantas a partir de organogênese direta, calos, nódulos, embriogênese somática e organogênese. No entanto, a vantagem do uso de explantes de gemas axilares é, na maioria dos casos, a manutenção da identidade genética do genótipo a ser propagado (Torres *et al.*, 1998).

Uma grande variedade de formulações de meio tem sido usada na cultura de tecidos de *Ananas*. Isto reflete a exigência específica dos genótipos, dos explantes usados para estabelecimento das culturas e os objetivos do trabalho. Os protocolos da cultura de tecidos nesse gênero foram estabelecidos, predominantemente, para a espécie *A. comosus* var. *comosus* (Aghion & Beauchesne, 1960; Mathews & Rangan, 1979; Drew, 1980; Rangan, 1984; Dewald *et al.*, 1988; Escalona, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Barboza, 2001; Silva *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003; Escalona, *et al.*, 2003; Firoozabady & Moy, 2004; Be & Debergh, 2006). Dentre as formulações de sais minerais descritas na literatura, a mais usada é a MS (Murashige & Skoog, 1962) e suas modificações e diluições. Uma das características da formulação MS é a sua alta concentração salina e, também, por apresentar o nitrogênio nas formas de íons amônio e nitrato. Essa pode ser considerada uma das vantagens da formulação MS ao suprir o nitrogênio à planta em proporção balanceada de cátions e ânions. Este balanço tende a reduzir o rápido aumento do pH do meio que é observado quando o nitrogênio é fornecido apenas na forma de íon nitrato ou amônio (Asher & Edwards, 1983). Em explantes cujos sistemas enzimáticos de redução do nitrato não estão efetivos, essa formulação contorna esse problema ao fornecer o nitrogênio na forma de amônio.

Nos trabalhos iniciais com cultura *in vitro* de abacaxizeiro outras formulações de sais minerais foram utilizadas. Por exemplo, no trabalho realizado por Aghion & Beauchesne (1960) cultivaram gemas axilares do abacaxizeiro em meio de Knop’s

suplementado com 15% de água de coco, obtendo um número reduzido de plantas regeneradas.

A adição de fitorreguladores, em geral, é necessária na suplementação dos meios para suprir as possíveis deficiências dos níveis endógenos de hormônios nos explantes empregados para o estabelecimento da cultura. Assim sendo, utilizam-se a combinação de uma auxina com uma citocinina (Skoog & Miller, 1957).

As auxinas estão envolvidas na regulação de vários processos fisiológicos tais como dominância apical, formação de raízes laterais e adventícias, na abscisão foliar, no desenvolvimento de gemas florais e do fruto, e na indução da diferenciação radicular (Taiz & Zeiger, 2004). Na cultura de tecidos a auxina é essencial para os processos de divisão, diferenciação e morfogênese.

As citocininas são importantes na divisão celular, na modificação da dominância apical, na indução de gemas, no retardamento da senescência, na mobilização de nutrientes, no desenvolvimento dos cloroplastos, na regulação do crescimento dos caules e raízes (Mok, 1994; Mok *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2004).

Com a utilização da formulação salina MS acrescida de ácido naftalenoacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA) e cinetina (Cin) foi possível obter brotações múltiplas de abacaxizeiro a partir da cultura de gemas laterais (dormentes) excisadas de mudas tipo coroa (Matheus & Rangan, 1979). Trabalhos subseqüentes, em *Ananas*, empregando as formulações de meio semi-sólida (Silva *et al.*, 2002; Canto *et al.*, 2004), líquida com agitação (Rangan, 1984), líquida estacionária (Rangan, 1984; Guerra *et al.*, 1999; Costa & Zaffari, 2005; Be & Deberg, 2006), imersão temporal (Escalona *et al.*, 1999; 2003) e meio bifásico (Borges *et al.*, 2003) propiciaram o aumento do número de brotações produzidas *in vitro*. A individualização das brotações múltiplas e, subseqüente cultura em meio novo, de mesma composição, estimulou o desenvolvimento de novas brotações. Esse ciclo pode ser repetido, continuamente, para aumentar o número de brotações produzidas (Rangan, 1984). O enraizamento das brotações foi observado quando essas foram transferidas para meio contendo macro e micronutrientes MS, vitaminas e 3% de sacarose acrescido (ou não) de auxina (AIA ou AIB).

Zepeda & Sagawa (1981) relatam a formação de brotações múltiplas em explantes de gemas axilares de abacaxizeiro utilizando, na fase inicial, em meio MS líquido com 25% de água de coco. Após duas semanas, os propágulos foram subcultivados para meio MS diluído e suplementado com benzilaminopurina (BAP) obtendo-se em média 16 brotações de 23 gemas axilares por coroa. Cabral (1986) recomenda a utilização de gemas

axilares para multiplicação do abacaxizeiro 'Smooth Cayene'. Para o estabelecimento das culturas as gemas foram inoculadas em meio líquido, com ponte de papel, contendo meio básico composto de sais minerais MS, vitaminas e 3% de sacarose. Após crescimento dos explantes esses foram transferidos para meio semi-sólido de composição idêntica ao anterior, acrescido de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. As brotações desenvolvidas são individualizadas e inoculadas em meio básico semi-sólido para enraizamento. Outro estudo sobre o potencial regenerativo do abacaxizeiro, *in vitro*, foi realizado por Teixeira *et al.* (2001), utilizando gemas retiradas de mudas do tipo filhote. Esses autores recomendam para o estabelecimento das culturas, meio MS suplementado com $2,5 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP e $0,625 \text{ }\mu\text{M}$ de ANA. Para a fase de multiplicação rápida a concentração de BAP deverá ser aumentada para $10 \text{ }\mu\text{M}$ e a de ANA para $2,5 \text{ }\mu\text{M}$. Também incluem uma terceira fase (a de alongamento), em meio sem reguladores de crescimento. Silva *et al.* (2002) induziram a proliferação de 4,56 brotos por explante em meio MS gelificado suplementado com 3 mg.L^{-1} de BAP e 100 mg.L^{-1} de benomyl. Um protocolo de baixo custo para multiplicação do abacaxizeiro foi proposto por Be & Debergh (2006). Brotações com 2,5 cm de tamanho, oriundas da cultura *in vitro* foram mantidas em meio líquido estacionário contendo sais MS suplementado com $0,8 - 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP produziram de oito a nove brotações no intervalo de oito semanas. A proliferação de brotações e o enraizamento podem ser feitas em condições naturais de casa de vegetação, em vez de câmara de crescimento.

A utilização de biorreatores tem sido uma nova estratégia que possibilita aumentar a taxa de multiplicação de brotações com redução nos custos de produção de mudas. Nesse sistema não é necessária a transferência freqüente dos propágulos como se verifica no sistema tradicional (George, 1993). Esse método baseia-se no princípio de que as brotações se desenvolvem melhor e mais rápido quando cultivadas, em intervalos regulares de imersão temporal em meio líquido, por determinado período de tempo, seguido da drenagem do meio, por determinado período, em ciclos repetitivos (Lemos *et al.*, 2001). Escalona *et al.*, (1999) compararam as formulações sólida, líquida e imersão temporal na propagação do abacaxizeiro. A estratégia mais eficiente foi a imersão temporal. O meio usado continha sais minerais MS suplementado com 2 mg.L^{-1} de BAP, $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de Paclobutrazol. As culturas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas com uma densidade de fluxo de fótons de $80 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No esquema de produção empregado foram obtidas 120 brotações a partir de oito gemas inoculadas, no período de quatro semanas. Após um período adicional de oito semanas, foram produzidas 6.000 brotações

competentes prontas para enraizamento *ex vitro* e aclimação. Esse método permite maior contato das brotações com o meio de cultura, possibilitando maior absorção dos nutrientes pelas folhas, caules e raízes. As vantagens na redução de custo incluem: redução no número de frascos de cultura; eliminação de subcultivos e/ou repicagens; eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* e redução na percentagem de contaminação (Escalona *et al.*, 1999). Em tese, as plantas absorvem mais nutrientes no sistema de imersão do que no tradicional e, conseqüentemente, produzem mais biomassa.

Uma análise da literatura indica que, dependendo do genótipo, qualidade física do meio e da concentração e tipo de regulador de crescimento, ocorrem diferentes magnitude de respostas na diferenciação e desenvolvimento dos propágulos do abacaxizeiro *in vitro* (Tabela 2). Com relação ao abacaxizeiro ornamental os poucos trabalhos sobre propagação *in vitro* desse genótipo foram realizados por Borges (2000), Borges *et al.* (2003); Carvalho *et al.*, (2005) e Costa & Zaffari (2005). A Tabela 3 sumariza os trabalhos de cultura *in vitro* realizados com os genótipos ornamentais. Na literatura consultada não foi encontrada publicação sobre método de detecção da variabilidade genética de *A. comosus* var. *bracteatus* em plantas oriundas da micropropagação.

Tabela 2. Relação do tipo de explante, formulação salina, suplemento hormonal e resposta morfogênética de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) cultivado *in vitro*. Concentração de sacarose 3%.

Explante	Formulação salina	Suplementação	Resposta morfogênética	Referências
Gemas axilares	Knop	Água de coco 15% v/v	Brotações	Aghion & Beauchesne, 1960
Gemas axilares de plantas do campo	MS gelificado	BAP 2,0 mg.L ⁻¹	Brotação	Almeida <i>et al.</i> , 2002
Brotações <i>in vitro</i> seccionadas longitudinal	MS líquido	BAP 1,5 mg.L ⁻¹	Proliferação de brotações	Almeida <i>et al.</i> , 2002
Segmentos nodais estiolados	MS gelificado	BAP 2,0 mg.L ⁻¹	Regeneração de plantas	Barboza <i>et al.</i> , 2001
Brotações <i>in vitro</i> com 5-6 folhas	MS líquido	BAP 0,8-1,0 mg.L ⁻¹	Brotações	Be & Debergh, 2006
Plantas <i>in vitro</i>	MS gelificado	PBZ 0,5 mg.L ⁻¹	Redução do crescimento	Canto <i>et al.</i> , 2004
Brotações <i>in vitro</i>	MS líquido (Imersão temporal)	BAP 2,1 + ANA 0,3 + PBZ 1,0 mg.L ⁻¹	Brotações	Escalona <i>et al.</i> , 1999
Base de folhas <i>in vitro</i>	MS	Picloran 41 mg.L ⁻¹ ou Tidiazuron	Tecido embriogênico	Firoozabady & Moy, 2004
Tecido embriogênico	MS	BAP 13 µM + ANA 1µM	Parte aérea	Firoozabady & Moy, 2004

Tabela 2. Continuação

Explante	Formulação salina	Suplementação	Resposta morfogênética	Referências
Base de folhas <i>in vitro</i>	MS	BAP 1,0 μM + ANA 27 μM	Organogênese direta	Firoozabady & Moy, 2004
Base de folhas <i>in vitro</i>	MS	Tidiazuron 5 μM + AIB 0,5 μM	Estrutura nodulares	Firoozabady & Moy, 2004
Gemas axilares de coroa	MS gelificado	Cin 2,1 + ANA 1,8 + AIB 2,0 mg.L^{-1}	Brotações	Mathews & Rangan, 1979
Brotações <i>in vitro</i>	MS estacionário e com agitação	Cin 2,1 + ANA 5,4 + AIA 5,1 mg.L^{-1}	Proliferação de brotações, maior em meio sob agitação.	Mathews & Rangan, 1979
Explantes foliares	MS gelificado	BAP 2,2 + NAA 1,8 + AIB 2,0 mg.L^{-1}	Proliferação de brotações da base do explante	Mathews & Rangan, 1979
Gemas axilares	MS líquido	BAP 4,4 μM + ANA 2,7 μM	Brotações	Guerra <i>et al.</i> , 1999
Ápices caulinares	MS líquido com agitação	Adenosina 30 + adenina 20 mg.L^{-1}	Propágulos e estruturas semelhantes a protocormos	Mapes, 1973
Folhas de plantas <i>in vitro</i>	Knudson macro +MS micronutrientes líquido	BAP 2,0 + ANA 1,0 mg.L^{-1}	Dosagem auxina e citocinina	Mercier <i>et al.</i> , 2003
Brotações <i>in vitro</i>	MS gelificado	ANA 1,8 + BAP 2,0 mg.L^{-1}	Número de brotações estioladas	Moreira <i>et al.</i> , 2003

Tabela 2. Continuação

Explante	Formulação salina	Suplementação	Resposta morfo genética	Referências
Gemas axilares da coroa	MS líquido com agitação	Cin 9,3 μM + ANA 9,7 μM + AIB 9,8 μM	Proliferação de gemas	Rangan, 1984
Base de folha de plantas <i>in vitro</i>	MS	BAP 2,0 + 2,4-D 0,5 mg.L^{-1}	Brotações adventícias	Sripaoraya <i>et al.</i> , 2003
Base de folha de plantas <i>in vitro</i>	MS	Picloran 3,0 mg.L^{-1}	Calo embriogênico	Sripaoraya <i>et al.</i> , 2003
Calo embriogênico	MS	BAP 1,0 mg.L^{-1}	Desenvolvimento de embriões somáticos	Sripaoraya <i>et al.</i> , 2003
Brotações <i>in vitro</i>	MS	BAP 1,6 + Benomyl 100 mg.L^{-1}	Número de brotos	Silva <i>et al.</i> , 2002
Base de folha	MS (50% diluído)	BAP 4,44 μM + ANA 2,69-5,37 μM	Estrutura nodulares	Teng, 1997
Gemas axilares	MS (50% diluído) líquido	BAP 0,5 –1,0 mg.L^{-1}	Brotações	Zepeda & Sagawa, 1981

Tabela 3. Relação do tipo de explante, formulação salina, suplemento hormonal e resposta morfo genética de genótipos de abacaxizeiro ornamental cultivados *in vitro*. Concentração de sacarose 3%.

Espécie	Explante	Formulação salina	Suplementação	Resposta morfo genética	Referências
<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	Segmentos nodais incubados no escuro	MS gelificado	-	Proágulos estiolados	Carvalho <i>et al.</i> , 2005
<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	Gemas de propágulos estiolados	MS gelificado	BAP 13,32 μM	Brotações	Carvalho <i>et al.</i> , 2005
<i>Ananas lucidus</i>	Propagulos com 2,0 cm	MS	AIB 0,25 mg.L^{-1}	Enraizamento	Correia <i>et al.</i> , 1999
<i>Ananas lucidus</i>	Aglomerado de gemas	MS bifásico*	ANA 0,01 mg.L^{-1}	Alongamento da brotações/proliferação	Borges <i>et al.</i> , 2003
<i>Ananas bracteatus</i> cv. <i>striatus</i>	Gemas laterais	MS líquido	BAP 4 μM ANA 2,16 μM	Formação de brotação	Costa & Zaffari, 2005
<i>Ananas bracteatus</i> cv. <i>striatus</i>	Brotações <i>in vitro</i>	MS líquido	BAP 8,89 μM ANA 2,16 μM	Proliferação de brotações	Costa & Zaffari, 2005

* O meio bifásico consiste do meio MS + 0,01 mg.L^{-1} de ANA gelificado. Aos 15 e 30 dias após inoculação adicionar 10 ml do meio líquido no frasco de cultura contendo o meio gelificado com o propágulo em desenvolvimento.

Análise da variabilidade genética dos propágulos via marcadores moleculares

As técnicas de micropropagação são importantes na clonagem e multiplicação rápida de genótipos de interesse, produzindo plantas, teoricamente, com a mesma identidade genética ao material original. Entretanto, tem-se observado que essa tecnologia pode ocasionar, em algumas situações, o aparecimento de modificações genéticas conhecidas como variações somaclonais (Larkin & Scowcroft, 1981). Dentre os mecanismos causais da variação somaclonal incluem-se variação cromossômica (Bayliss, 1980; Evans & Bravo, 1986; Olmos *et al.*, 2002), recombinação mitótica (Evans & Bravo, 1986), mutação em um único gene (Evans & Bravo, 1986), ativação de transposons (McClintock, 1984; Hirochika *et al.*, 1996), metilação do DNA (Jaligot, *et al.*, 2000; Leljak-Levani *et al.*, 2004) e sítios de instabilidade “hot spots” no DNA genômico (Linacero *et al.*, 2000). Outra fonte de variabilidade são as variações epigenéticas (Evans & Bravo, 1986). Variações epigenéticas referem-se a modificações na expressão gênica herdável, mas potencialmente reversível, estando associadas com modificações na estrutura da cromatina e/ou na metilação do DNA (Henikoff & Matzke, 1997).

Variações na estrutura genética têm sido relatadas em plantas oriundas de cultura de tecidos em *Ananas comosus* (Das & Bhowmik, 1997; Gotardi *et al.*, 2002), tomateiro (Evans & Sharp, 1983), *Nicotiana glauca* (Evans & Bravo, 1986), *Musa sp.* (Grajal-Martin *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2006), *Glycine max* (Gesteira *et al.*, 2002), *Cucurbita pepo* (Leljak-Levani *et al.*, 2004), dentre outras. Neste contexto, torna-se apropriado caracterizar as variações fenotípicas em material micropropagado como modificações genéticas ou epigenéticas.

O advento de técnicas moleculares, inicialmente isoenzimas e, mais recentemente, técnicas baseadas na avaliação direta e/ou indireta de variações na seqüência de DNA, oferecem novas oportunidades de estudo de variabilidade genética (Ferreira & Gratapaglia, 1996). Recentemente, vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados na detecção de variação ou para confirmar a fidelidade genética de plantas micropropagadas (Gupta *et al.*, 1998). O objetivo básico da utilização de marcadores moleculares é possibilitar uma análise rápida e direta do genoma das plantas. Os sistemas de marcadores moleculares disponíveis permitem identificar um vasto número de polimorfismos, que podem, potencialmente, aumentar a eficiência em identificar diferenças genéticas entre indivíduos quando comparados com sistemas baseados, exclusivamente, em análise do fenótipo (Ferreira & Gratapaglia, 1996). A técnica de RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) engloba o uso de marcadores do tipo dominante, de menores custos e

extremamente eficientes na análise rápida de polimorfismos (Williams *et al.*, 1990). Em síntese, o sistema RAPD é uma variação do protocolo da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), onde se utiliza um “primer” único ao invés de um par de “primers” de seqüência arbitrária, assim sua seqüência alvo é desconhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O sistema de marcadores RAPD também tem sido utilizado na detecção de variação genética de plantas provenientes da cultura de tecidos (Xue-QiHan *et al.*, 2000; Gottardi *et al.*, 2002; Feuser *et al.*, 2003; Laura *et al.*, 2003; Punja *et al.*, 2004; Bennici *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006). A análise dos clones advindos de cultura de tecidos via marcadores moleculares, permite neutralizar os efeitos fenotípicos, minimizando efeitos epistáticos ou pleiotrópicos (Ferreira & Grattapaglia, 1996), possibilitando adicionar uma metodologia confiável na identificação da variação somaclonal (Veilleux & Johnson, 1998). A propagação rápida *in vitro* como um método de regeneração clonal de plantas para a produção comercial oferece um potencial de produção no campo com custos de trabalho reduzido, mas há necessidade de se ter uma população homogênea de plantas. Variabilidade em plantas de espécies do gênero *Ananas* oriunda da cultura de tecidos tem sido documentada. Por exemplo, Gottardi *et al.* (2002) avaliaram (via RAPD) plantas de abacaxizeiro cultivar ‘Smooth Cayenne’ derivadas do seccionamento do caule e da cultura de tecidos. Esses autores observaram que a propagação por seccionamento de caule foi eficiente na produção de mudas, tanto em quantidade quanto em qualidade, em curto espaço de tempo, além de apresentar características genotípicas das plantas-matrizes de origem. Já no processo de produção de mudas via cultura de tecidos, pela análise de RAPD das plantas obtidas, foi observado diferentes padrões de bandas de DNA, as quais poderiam ser relacionadas com variação genética após cultivo *in vitro*. Nesse trabalho não há referência do meio e condições de cultura utilizados para a propagação *in vitro* do abacaxizeiro. Feuser *et al.* (2003) em trabalho com *A. comosus* cv. Amarelinho avaliou dois sistemas (estacionário e de imersão temporal) em termos de fidelidade genética usando isoenzimas e marcadores RAPD. A imersão temporária comparada com o sistema estacionário resultou na menor percentagem de variantes somaclonais (1,9% vs. 3,9%). A técnica de RAPD também foi utilizada na avaliação de relação genética entre os gêneros *Ananas* e *Pseudoananas* (Ruas *et al.*, 2001).

Vários fatores estão relacionados com o aparecimento de variantes somaclonais: a suplementação do meio com reguladores de crescimento tais como 2,4-D e BAP podem aumentar o aparecimento de variantes; a quantidade de variantes encontrados *in vitro* não é a mesma para as cultivares de uma dada espécie; o período em que as culturas são

mantidas *in vitro* tem relação direta com a taxa de variantes somaclonais; a utilização da cultura de calo proporciona aumento na quantidade de variantes produzidos (Skirvin *et al.*, 1994). Tudo isso é um desafio para as pesquisas biológicas de identificação de um processo eficaz que minimize as variações que, eventualmente, ocorrem em materiais oriundos da cultura *in vitro*. Assim sendo, um sistema de identificação das plantas de abacaxizeiro ornamental micropropagadas que seja rápido, preciso, de baixo custo, num estágio inicial de crescimento, antes de ir para o campo, é desejável, para produção de mudas de qualidade e quantidade suficiente para formação de novas lavouras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHION, D.; BEAUCHESNE, A. Utilization de la technique de culture stérile d'organes pour obtenir des clones d'ananas. **Fruits**, v.15, n.10, p.464-466, 1960.
- AKI, A. Diagnóstico da Floricultura Pernambucana. **Floricultura em Pernambuco**, série Agronegócio, Edição Sebrae, p.23-59, 2002.
- ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.296-300, 2002.
- ALBUQUERQUE, C.V.; CÂMARA, T.R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v.57, p.363-366, 2000.
- ARRUDA, S.T.; OLIVETTE, M.P.A.; CASTRO, C.E.F. Diagnóstico da floricultura no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.2, p.1-18, 1996.
- ASHER, D.I.; EDWARDS, D.G. Modern solution in culture techniques. In: LDUCHLI, A. & BIELESKI, R.L. (Eds). **Encyclopedia of Plant Physiology**. New series, v.15 B. Berlin: Springer, pp.94-119, 1983.
- BAKER, K.F.; COLLINS, J.L. Notes on the distribution and ecology of *Ananas* and *Pseudoananas* in South America. **American Journal of Botany**, v.26, p.697-702, 1939.
- BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.417-423, 2001.

- BARTHOLOMEW, D.P.; KADZIMI, S.B. Pineapple. In: ALVIM, P.T.; KOZLOWSKI, T.T. (Eds). **Ecophysiology of tropical crops**. New York: Academic Press, 1977. p.113-156.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissue culture. **International Review of Cytology**, supplement 11 A. New York: Academic Press, 1980.
- BE, L.V.; DEBERGH, P.C. Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). **South Africa Journal of Botany**, v.72, p.191-194, 2006.
- BENNICI, A.; ANZIDEI, M.; VENDRAMIN, G.G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.166, p.221-227, 2004.
- BORGES, N.S.S. **Influência da adição de meio de cultura líquido no crescimento e desenvolvimento de gemas de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller) *in vitro***. 2000. 52f. Monografia de graduação - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A.G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, p.37-44, 2003.
- BOTREL, N.; SIQUEIRA, D.L. Implantação de abacaxizal. **Informe Agropecuário**, v.11, p.22-26, 1985.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.679-735, 1999.
- CABRAL, J.R.S. Micropropagação do abacaxizeiro *in vitro*. **Anais do I Simpósio de Cultura de Tecidos Vegetais**. Brasília: CNPH/DDT, 1986. 109p.

- CANTO, A.M.M.E.; SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.C.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; CABRAL, J.R.S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.717-720, 2004.
- CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.4, p.1- 46, 1998.
- CARVALHO, A.C.P.; BRAGA, E.P.; SANTOS, M.R.A.; MORAIS, J.P.S. Micropropagação de abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plântulas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.121-126, 2005.
- COLLINS, J.L. **The Pineapple**: botany, cultivation, and utilization. London: Leonard Hill, 1960. 294p.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G (Eds). **The pineapple**: botany, production and uses. New York: CAB International, 2003. 320p.
- CORREIA, D.; RIBEIRO, K.A.; OLIVEIRA, P.M.A.; ROSSETI, A.G.; SILVEIRA, M.R.S. **Influência do meio de cultura sólido e líquido no alongamento de brotos *in vitro* de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Pesquisa em andamento. Fortaleza: Embrapa Agricultura Tropical, n.57, p.1-3, julho, 1999.
- CORREIA, D.; RIBEIRO, K.A.; ROSSETTI, A.G.; SILVEIRA, M.R.S. **Efeito do ácido indolbutírico e do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Pesquisa em andamento. Fortaleza: Embrapa Agricultura Tropical, n.66, p.1-3, junho, 2000.
- COSTA, T.; ZAFFARI, G.R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Schultz) cv. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.109-113, 2005.
- CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: CUNHA, J.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds). **O abacaxizeiro**: cultivo,

agroindústria e economia. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p.17-51.

DAS, R.K.; BHOWMIK, G. Some somaclonal variants in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) plants obtained from different propagation techniques. **International Journal of Tropical Agriculture**, v.15, p.95-100, 1997.

DeWALD, M.G.; MOORE, G.A.; SHERMAN, W.B.; EVANS, M.H. Production of pineapple plants *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.7, p.535-537, 1988.

DREW, R.A . Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. **Queensland Agricultural Journal**, v.106, p.447-451, 1980.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTO, M.; GONZÁLES, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion system. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.

ESCALONA, M.; SAMSON, G.; BORROTO, C.; DESJARDINS, Y. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.39, p.651-656, 2003.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. **Science**, v.221, p. 949-951, 1983.

EVANS, D.A.; BRAVO, J.E. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, R.J.; HAMMERSCHLAG, F.A.; LAWSON, R.H (Eds). **Current plant science and biotechnology in agriculture: tissue culture as a plant production system for horticultural plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. 371p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1996. 220 p.

- FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.221-227, 2003.
- FIROOZABADY, E.; MOY, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.40, p.67-74, 2004.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Part 1. Edington: Exegetics Limited, 1993. 574p.
- GESTEIRA, A.S.; OTONI, W.C.; BARRS, E.G.; MOREIRA, M. A. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. **Plant Breeding**, v.121, p.269, 2002.
- GIACOMELLI, E.J. Clima. In: RUGGIERO, C. **Simpósio brasileiro sobre abacaxicultura**. Jaboticabal: FCAV, 1982. 359p.
- GIACOMELLI, E.J.; PY, C. **O abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundação Cargil, 1981. p.1-27.
- GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S (Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990. 433p.
- GOTTARDI, M.V.C.; LEMOS, E.G.M.; RUGGIERO, C. Avaliação por RAPD de plantas de abacaxizeiro cultivar Smooth Cayenne derivadas do seccionamento do talo e cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.001-005, 2002.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIVERIO-GRILLO, G.; MARRERO,-DOMÍNGUEZ, A. The use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the study of genetic diversity and somaclonal variation in *Musa*. **Acta Horticulture**, v.490, p.445-454, 1998.

- GUERRA, M.P.; DAL-VESVO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1557-1563, 1999.
- GUPTA, P.K.; SINGH, S.P.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RANESH, B. **Genetics and biotechnology in crop improvement**. Meerut: Rastogi Publicatios, 1998.
- IBRAFLOR. **Flora Brasiliis, Programa Brasileiro de Exportação de Flores e Plantas Ornamentais**, IBRAFLOR - Instituto Brasileiro de Floricultura. 2002. 1 CD-ROOM.
- HELLER, R. Les besoins minéraux des tissus en culture. **Annales de Biologie**, v.30, p.261-281, 1954.
- HENIKOFF, S.; MATZKE, M.A. Exploring and explaining epigenetic effects. **Trends in Genetics**, v.13, p.293–295, 1997.
- HIROCHIKA, I.; SUGIMOTO, K.; TSUGAWA, H.; KANDA, M. Retrotransposons of rice involved in mutation induced by tissue culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.93, p.7783-7788, 1996.
- JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULE, T.; DUSSERT, S.; VERDIEL, J.-L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): DNA methylation hypothesis. **Plant Cell Reports**, v.19, p.684-690, 2000.
- JUNQUEIRA, A .H.; PEETZ, M.S. Las exportaciones de Brasil en flores y plantas ornamentales. **Horticultura Internacional**, v.15, p.48-53, 2008.
- KIYUNA, I.; FRANCISCO, V. L. F.S.; COELHO, P. J.; CASER, D. V.; ASSUMPÇÃO, R.; ÂNGELO, J.A. **Os floricultores do estado de São Paulo**. In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais. Lavras, MG. Resumos, p.34, Anais, 2003.
- KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, v.35, p.58-88, 1969.

- LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**. v.II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977. p. 381-384.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.197-214, 1981.
- LAURA, M; BENEDETTI, L.; BRUNA, S; BURCHI, G; BERIO, T; GIOVANNINI, A; RUFFONI, B.; DE-BENEDETTI, L; HAMMERSCHLAG, F.A.; SAXENA, P. *Cyclamen persicum* Mill.: somatic embryogenesis and RAPD analysis of embryogenic callus. **Acta Horticulturae**, v.625, p.137-141, 2003.
- LELJAK-LEVANI, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC, S.Z.; JELASKA, S. Change in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. **Plant Cell Reports**, v.23, p.120-127, 2004.
- LEMO, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; OLIVEIRA, J.G.; MAGALHÃES, V.S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreatores de imersão temporal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.482-487, 2001.
- LINACERO, R.; FREITAS-ALVES, E.; VASQUEZ, A.M. Hot spot of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.506-511, 2000.
- LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.332-335, 2004.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas Ornamentais do Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1999. 1088p.
- LOISON-CABOT, C. État des connaissances botanique, cytogénétiques et biologiques sur la reproduction de l'ananas. **Fruits**, v.45, p.347-355, 1990.

- LOGES, V.; TEXEIRA, M.C.F.; CASTRO, A.C.R.; COSTA, A.S. Colheita, pós-colheita embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, v.23. p.699-702, 2005.
- MANICA, I. **Abacaxi**: do plantio ao mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 2000. 122p.
- MAPES, M.O. Tissue culture of bromeliads. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v.23, p.47–55, 1973.
- MARTIN, K.P.; PACHATHUNDIKANDI, S.K.; ZHANG, C-L.; SLATER, A.; MADASSERY, J. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp*) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.42, p.188-192, 2006.
- MATHEWS, V.H.; RANGAN, T.S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* cultures of pineapple. **Scientia Horticulturae**, v.11, p.319-328, 1979.
- McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, v.226, p.792-801, 1984.
- MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultures *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.107-112, 2003.
- MILLER, C. O.; SKOOG, F.; OKAMURA, F.S.; VON-SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v.77, p.1392, 1955.
- MOK, M.C. Cytokinins and plant developmental overview. In: MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Eds). **Cytokinins**: chemistry, activity and function. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.155-166.

- MOK, M.C.; MARTIN, R.C.; MOK, D.W.S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.36, p.102-107, 2000.
- MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, p.1002-1006, 2003.
- MOREL, G.M. Production of virus free *Cymbidium*. *American Orchid Society Bulletin*, v.29, p.495-497, 1960.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Nutrition of plant cells and organs *in vitro*. *In vitro*, v.9, p.81-85, 1973.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T. Plant tissue culture and its importance to agriculture. In: MARAMOROSCH, K. & HIRUMI, H. (Eds). **Practical tissue culture application**. New York: Academic Press, 1979. p.27-44.
- OKUDA, T. Flores: atividade em expansão. **Frutas e Legumes**, São Paulo; v.1, p.22-25, 2000.
- OLMOS, S.E.; LAVIA, G.; RENZO, M. DI; MRONGINSKI, L.; ECHENIQUE, V. Genetic analysis of variation of micropropagated plants of *Melia azedarach* L. *In vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, v.38, p.617-622, 2002.
- PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de bromélia**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 106p.

- PUNJA, Z.K.; FEENEY, M.; SCHLUTER, C.; TAUTORUS, T. Multiplication and germination of somatic embryos of American ginseng derived from suspension cultures and biochemical and molecular analyses of plantlets. ***In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.40, p.329-338, 2004.
- PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops: monocotyledons**. Essex: Longman. 1981 (reimpressão). 607p.
- PY, C. **La piña tropical**. Barcelona: Editorial Blume, 1969. 278p.
- RANGAN, T.S. Pineapple. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Eds). **Handbook of plant cell culture**. v.3. New York: MacMillan Publishing Company, 1984. p. 373-381.
- REINHARDT, D.H. Propagação do abacaxi. **Informativo Agropecuário**, v.11, p.18-21, 1985.
- REINHARDT, D.H.; CUNHA, C.A.P. Métodos de propagação. Cap. 5. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p.105-138.
- REINHARDT, D.H. A planta e o seu ciclo. In: REINHARDT, D.H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. (Org.). **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77p. (Frutas do Brasil 7).
- RIBEIRO, T. R. **Produção de mudas e flores de plantas ornamentais tropicais**. Petrolina: Embrapa, 2001. 42p.
- RUAS, L.F.; RUAS, P.M., CABRAL, J.R.S. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudoananas* confirmed by RAPD markers. **Euphytica**, v.119, p.245-252, 2001.
- SILVA, E. Novartis aposta no mercado de flores. **Frutas e legumes**, v.1, p.28-29, 2000.

- SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. DE R.; MOREIRA, M.A.; DUTRA, L.F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, p.1190-1196, 2002.
- SKIRVIN, R.M.; McPHEETERS, K.D.; NORTON, M. Sources and frequencies of somaclonal variations. **HortScience**, v.29, p.1232-1237, 1994.
- SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-130, 1957.
- SKOOG, F.; TSUI, C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. **American Journal of Botany**, v.35, p.782-787, 1948.
- SOUZA, L.F.S.; CUNHA, G.A.P. Preparo do solo e correção da acidez. In: REINHARDT, D.H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. (Org). **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77p. (Frutas do Brasil 7).
- SOUZA, L.A. Fruto. In: SOUZA, L.A. (Org). **Anatomia do fruto e da semente**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2006. 196p.
- SMITH, L.D.; DOWNS, R.J. Bromelioidées (Bromeliaceae). Monograph 14. **Flora Neotropica**. New York: The New Botanical Gardens, 1979. 2142p
- SOUZA, F.V.; SEREJO, J.A.S.; CABRAL, J.R.S. Beleza Rara. **Cultivar**, v.5, p.06-08, 2004.
- SOUZA; V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Plantarum, 2005, p.162-166.

- SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). ***In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.39, p.450-454, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Arimed, 2004. 719p.
- TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. **Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação**. Documentos 70. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 26p.
- TENG, W.L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. ***Plant Cell Reports***, v.16, p.454-457, 1997.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. 509p.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. p.133-145.
- TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V.R.; WILADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C.F. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Brasília, Embrapa Hortaliças, Circular Técnica, n. 24, 2001. 20p.
- VEILLEUX, R.E.; JOHNSON, A.A.T. Somaclonal variation: Molecular analysis, transformation interaction and utilization. ***Plant Breeding***, v.116, p.229-268, 1998.
- VILELA, N, J. Mercado em Expansão. ***Cultivar***, v.3, p.22-23, 2002.
- XUE, Q.; ZHANG, Z.; XIANG, Y.; ZHU, Z.; CHEN, Y.; XUE, Q.; ZHANG, Z.; XIANG, Y.H.; ZHU, Z.W.; CHEN, Y. RAPD analysis of genetic variation in somatic

embryogenesis of sweetpotato (*Ipomoea batatas* Lam.). **Jiangsu Journal of Agricultural Sciences**, v.16, p.212-216, 2000.

WHITE, P. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v.9, p.585-600, 1934.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531- 6535, 1990.

ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. **HortScience**, v.16, p.495, 1981.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA, ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PROPAGAÇÃO MASSAL DO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL.

(Trabalho submetido para publicação na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Efeito de concentrações de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivos na propagação massal do abacaxizeiro ornamental¹

Maria do Desterro Mendes dos Santos²; Antonio Carlos Torres³

¹Parte da dissertação de mestrado em Botânica, apresentada pelo primeiro autor à Universidade de Brasília.

²Bióloga, Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, C.P. 4.457, CEP 70919-970, Brasília, DF. E-mail: maria@cnph.embrapa.br

³Engenheiro Agrônomo, Embrapa Hortaliças, C.P. 218, CEP 70359-970, Brasília, DF. Autor para correspondência. E-mail: torres@cnph.embrapa.br

Resumo

A micropropagação do abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) é uma alternativa para produção em larga escala de plantas com alta qualidade fitossanitária em um curto período de tempo. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar os efeitos da adição de benzilaminopurina (BAP) em combinação com ácido naftalenoacético (ANA) e períodos de subcultivo na formação de brotações *in vitro* do abacaxizeiro ornamental visando desenvolver um sistema eficiente de propagação massal de plantas livres de doenças com baixo custo. O meio básico consistiu de sais minerais MS, vitaminas e 3% de sacarose, formulação líquida. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso com os tratamentos dispostos no esquema fatorial 6 x 2 x 4, referentes a seis concentrações BAP (0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; e 2,0 mg.L⁻¹), duas de ANA (0,0 e 0,1 mg.L⁻¹) e 4 períodos de subcultivos (30, 60, 90 e 120 dias). A formação de brotações foi observada em meio suplementado com BAP, em todos os períodos de subcultivos. O maior número médio de brotos por explante foi obtido em meio líquido com a concentração de 1,2 mg.L⁻¹ de BAP e 120 dias de subcultivo.

Termos para indexação: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; micropropagação; cultivo *in vitro*

Effect of benzylaminopurine, naphthaleneacetic acid concentrations and subculture periods in mass propagation of ornamental pineapple

Abstract

The micropropagation of ornamental pineapple (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) is an alternative for mass production of high quality healthy plants in a short period of time. The objective of the present work was to evaluate the effect of benzylaminopurine (BAP) in combination with naphthaleneacetic acid (NAA) and periods of subculture on *in vitro* shoot formation of ornamental pineapple, in order to develop an efficient system for mass propagation of disease free with low cost. The basal medium was composed by MS salts, vitamins and 3% sucrose, liquid formulation. The experiment was arranged in a randomized complete design using a factorial disposition (6 x 2 x 4) corresponding to six BAP (0,0; 0.125; 0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹) and two NAA (0,0 and 0.1 mg.L⁻¹) concentrations and four subculturing periods (30, 60, 90 and 120 days). Shoots formation were observed in a medium supplemented with BAP in all subculturing periods. A higher average number of shoots per explant was obtained with BAP concentration of 1.2 mg.L⁻¹ and 120 days of subcultivation.

Index terms: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; micropropagation; *in vitro* culture.

Introdução

O abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal] é uma planta monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae (Collins, 1960; Reinhardt, 2000; Coppens & Leal, 2003) que apresenta um grande potencial para comercialização nos mercados interno e externo de flores (Souza *et al.*, 2004). No Estado do Ceará, tem sido relatada uma produção de 12.000 hastes florais por mês desta espécie, que têm sido exportadas para a Alemanha, Holanda e Estados Unidos (Correia *et al.*, 2000).

Ananas comosus var. *bracteatus* é uma espécie de propagação vegetativa. Assim sendo, pode haver acúmulo de agentes causais de doenças importantes que são transmitidas e intensificadas de um ciclo de produção a outro, via mudas contaminadas. Dentre as principais doenças estão as causadas por fungos. Há demanda do setor produtivo de plantas ornamentais de mudas de melhor qualidade fitossanitária, principalmente, isentas de

fusariose (Reinhardt & Cunha, 1999). Além disso, em condições naturais, cada planta produz até dez mudas por ano, sendo a demanda por mudas sadias um fator limitante a expansão da cultura (Correia *et al.*, 2000).

Uma das vantagens de um método de propagação *in vitro* a espécies, normalmente, utilizadas em plantios em grandes extensões deve preencher os requisitos de produção rápida de milhares de propágulos a custo competitivo com aqueles dos métodos convencionais de propagação (Murashige, 1977). Em abacaxizeiro, Zepeda & Sagawa (1981) estimaram que uma gema axilar em cultura pode produzir 5.000 plantas, no final de um ano. Na cultura de tecidos de *Ananas* uma grande variedade de formulações de meio tem sido usada. Isto reflete a exigência específica dos genótipos, partes da planta que têm sido cultivadas (explantes) e os objetivos do trabalho. Os protocolos da cultura de tecidos nesse gênero foram estabelecidos, predominantemente, para a espécie *A. comosus* var. *comosus* (Aghion & Beauchesne, 1960; Matheus & Rangan, 1979; Drew, 1980; Rangan, 1984; Dewald *et al.*, 1988; Escalona, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Barboza, 2001; Silva *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003; Escalona *et al.*, 2003; Firroozabady & Moy, 2004; Be & Debergh, 2006; Tamaki *et al.*, 2007). Entretanto, são poucos os trabalhos de micropropagação de *A. comosus* var. *bracteatus* (Carvalho *et al.*, 2005; Costa & Zaffari, 2005) e questões referentes às respostas morfogenéticas de gemas axilares em meio de multiplicação com diferentes períodos de subcultivos precisam ser elucidadas. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar os efeitos da adição de BAP em combinação com ANA e períodos de subcultivo, em meio líquido, na formação de brotações *in vitro* do abacaxizeiro ornamental visando desenvolver um sistema eficiente de propagação massal de plantas livres de doenças com baixo custo.

Material e métodos

Brotações com aproximadamente, 1,0 cm de comprimento, estabelecidas a partir da cultura de gemas axilares, foram utilizadas como fonte de explantes. Os explantes foram cultivados em meio básico contendo sais minerais MS (Murashige & Skoog, 1962), 3% sacarose e, em mg.L⁻¹: tiamina.HCl, 0,1; piridoxina.HCl, 0,05; ácido nicotínico, 0,05 e glicina, 2,0, formulação líquida. A esse meio foram adicionados: concentrações de BAP (0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹), em combinação com concentrações de ANA (0,0 e 0,1 mg.L⁻¹) e quatro períodos de subcultivos (30, 60, 90 e 120 dias). O pH dos meios foi ajustado a 5,7. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso com os tratamentos dispostos no esquema fatorial 6 x 2 x 4, correspondendo a seis

concentrações do hormônio BAP, duas concentrações de ANA e quatro períodos de subcultivos. Foram utilizadas nove repetições por tratamento, sendo que cada parcela foi constituída por 1 explantes. Inicialmente, os explantes foram inoculados em frascos de 250 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio. No terceiro e quarto subcultivos foram utilizados frascos de 1000 mL. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Em cada subcultivo foi determinado o número e a massa fresca das brotações formadas por explante inoculado.

Aplicou-se a análise de regressão polinomial até segundo grau para avaliar o efeito da concentração do hormônio sobre o número de brotos em cada meio de cultivo e em cada subcultivo e também para avaliar a variação do número de brotos em função do subcultivo para cada concentração de hormônio nos diferentes meios. Mediante análise exploratória observou-se a existência de heterogeneidade da variância, entre os tratamentos, havendo a necessidade de transformação dos dados. A transformação estabilizadora da variância encontrada foi $\log(x+1)$. As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o auxílio dos programas SAS e SISVAR.

Resultados e discussão

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) das diferentes concentrações de BAP, concentrações de ANA e períodos de subcultivos para as características número e massa fresca das brotações (Tabela 1). Também foram observados efeitos das interações duplas. Apesar das interações triplas serem significativas somente para massa fresca, foi necessário fazer seu desbromamento para checar as possíveis significâncias. A análise teve prosseguimento com a aplicação da análise de regressão polinomial até segundo grau para avaliar o efeito da concentração do BAP sobre o número e massa fresca de brotos formados em cada concentração de ANA e em cada período de subcultivo (Figuras 1a, 1b e 2). Derivando-se as equações foram obtidas as concentrações que proporcionariam o maior número e massa fresca de brotações por explante.

Houve uma relação quadrática entre o número de brotações formadas por explante e a concentração de BAP em combinação com as concentrações de ANA para todos os períodos de subcultivos (Figuras 1a, 1b, 3a e 3b). O meio nutritivo sem BAP foi considerado ineficiente para propagação em larga escala do abacaxizeiro ornamental pela formação de baixo número de brotações por explante. Resultados semelhantes foram obtidos por Tamaki *et al.* (2007) com cultivo *in vitro* do abacaxizeiro comercial em meio

desprovido de reguladores de crescimento, produzindo 50 plantas a partir de uma gema inoculada, no período de 12 meses. A adição de BAP foi necessária para indução satisfatória de brotações *in vitro* em explantes dessa espécie (Figuras 1a, 1b, 3a e 3b). As citocininas têm ação em diversos processos de desenvolvimento da planta, incluindo divisão celular e diferenciação de culturas celulares (Redig *et al.*, 1996), respostas morfológicas (Centeno *et al.*, 1996) e desenvolvimento de órgãos (Auer & Cohen, 1993). Estudos sobre micropropagação de espécies do gênero *Ananas* têm usado a citocinina BAP na indução de brotações por apresentar resultados eficientes, principalmente, para *Ananas comosus* (Matheus *et al.*, 1976; Almeida, 1994; Escalona *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Cruz, 2000; Almeida *et al.*, 2002; Firoozabady & Gutterson, 2003), *Ananas lucidus* (Borges *et al.*, 2003) e *Ananas bracteatus* (Costa & Zaffari, 2005).

Estimou-se que o maior número de brotações por explante para os períodos de subcultivos de 30 e 60 dias foi alcançado com a utilização da concentração de 1,17 mg.L⁻¹ de BAP obtendo-se, respectivamente, em média 14,8 e 69,8 brotações e, aos 90 e 120 dias foi observado o máximo de 256,7 e 872,2 brotações com a concentração de 1,2 mg.L⁻¹ de BAP. Concentração de BAP superior a 1,2 mg.L⁻¹ reduziu o número de brotações em todos os períodos de subcultivos. O aumento do número de brotações em períodos sucessivos de subcultivos foi constatado por Almeida *et al.* (2002) em *Ananas comosus* cultivar Pérola. Esses autores obtiveram 2013,5 brotações, no quinto período de subcultivo (20 semanas), com o emprego de meio líquido suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. Entretanto, em meio sólido, Silva *et al.* (2002) obtiveram um máximo de 7,5 brotos, maiores que 1,0 cm, por explante com a concentração de 2,52 mg.L⁻¹ de BAP, em 120 dias de cultivo, para a cultivar Primavera, usando tubos de ensaio como recipiente. Essa discrepância de resultados da literatura pode ser explicada pela formulação de meio (sólido ou líquido), recipiente utilizado para estabelecimento das culturas e período de subcultivo. Dentre as vantagens do uso da formulação líquida no preparo do meio de cultura incluem-se a maior homogeneidade que permite maior velocidade de difusão (Costa & Zaffari, 2005) e absorção mais eficiente de nutrientes para os tecidos (Escalona *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 1981; Costa & Zaffari, 2005) e um menor custo no seu preparo (Escalona *et al.*, 1999).

Em meio suplementado com BAP e com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA inferiu-se que o ponto máximo para número de brotações, nos subcultivos de 30 e 60 corresponde, respectivamente às concentrações de 0,7 e 1,2 mg.L⁻¹ de BAP, obtendo-se, respectivamente, em média 25,6 e 89,4 brotos por explante. Para o subcultivo de 90 e 120 dias, o máximo de brotações estimada foi de 306,6 e 730,7 com as concentrações de 1,2 e

1,4 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente (Figuras 3a e 3b). Essa concentração hormonal ótima para maximizar o desenvolvimento, acima da qual há um efeito *inibitório* que tem sido observado em trabalhos *in vitro* com *Gymnocalycium buldianum* e *Mammillaria bocassana* (Pasqual & Hoshica, 1992); *Ananas comosus* (Silva *et al.* 2002); *Ficus carica* (Fráguas *et al.*, 2004); *Malus domestica* (Erig & Schuch, 2005) e *Rubus sp* (Villa *et al.*, 2005, 2006).

Nos subcultivos de 30 e 60 dias a proliferação de brotações foi superior na presença de ANA. Aos 90 dias de subcultivo o número de brotações formadas foi idêntico tanto na presença quanto na ausência de ANA. Entretanto, no subcultivo de 120 dias a ausência de ANA induziu maior número de brotações por explante. Possivelmente, a partir dos 90 dias, a adição de ANA tem efeito inibitório na formação de brotações devido ao efeito residual desse regulador de crescimento nos propágulos produzidos. A utilização de BAP em combinação com ANA tem sido relatada em trabalhos de micropropagação de espécies do gênero *Ananas* (Escalona *et al.*, 1999; 2003; ; Guerra *et al.*, 1999; Firoozabady & Gutterson, 2003; Borges *et al.*, 2003; Barboza *et al.*, 2004; Costa & Zaffari, 2005). Entretanto, o balanço entre BAP e ANA é dependente do genótipo na maximização da resposta morfogênica. Barbosa *et al.* (2004) compararam a taxa de multiplicação do híbrido PExSC-52 com a variedade ‘Smooth Cayene’ em meio com BAP suplementado ou não com ANA. Em meio com BAP o híbrido apresentou taxas de multiplicação mais elevada em relação ao Smooth Cayene. Ao se adicionar BAP + ANA a cultivar Smooth Cayene apresentou melhor performance, enquanto o híbrido sofreu redução na taxa de multiplicação. Variação no número de brotações formadas atribuída a diferentes genótipos tem sido relatada na literatura (Dewald *et al.*, 1988; Guerra *et al.*, 1999).

No sistema descrito, não foi observado vitrificação das brotações produzidas. Esse é um aspecto importante na metodologia utilizada. As limitações do uso de biorreatores na cultura de tecidos de plantas é o aparecimento de propágulos vitrificados os quais resultam em uma morfogênese anormal em meio líquido (Ziv, 1991) e o alto custo dos mesmos.

Aos 30 dias de subcultivo não houve diferença estatística entre as concentrações de BAP tanto na presença quanto na ausência de ANA, para a variável massa fresca. A concentração de BAP afetou a produção de biomassa da parte aérea nos subcultivos de 60, 90 e 120 dias, apresentando uma relação quadrática em meio com e sem ANA (Figuras 2, 4a e 4b). Aos 60 dias, em meio desprovido de ANA, estimou-se a maior massa fresca de brotações de 19,8 g com a concentração de 1,2 mg.L⁻¹ de BAP. Para os subcultivos de 90 e 120 dias o máximo de biomassa de 65,8 e 209,4 g foi estimado, respectivamente, com a

concentração de 1,3 mg.L⁻¹ de BAP. Concentrações de BAP superiores a 1,3 mg.L⁻¹ tendem a reduzir a produção de biomassa (Figura 2).

Também foi observado que a inclusão de ANA, no meio de cultura, propiciou aos 60, 90 e 120 dias de subcultivo a estimativa de produção máxima de biomassa, respectivamente 19,6, 97,9 e 178,7 g, com respectivamente, 0,9, 1,1 e 1,2 mg.L⁻¹ de BAP (Figuras 4a e 4b). Esse parâmetro estima a habilidade do sistema caulinar de desenvolver *in vitro*. Resultados semelhantes foram relatados por Villa *et al.* (2005), em trabalho com amoreira preta em que a massa da matéria fresca atingiu um máximo com a utilização de 1 mg.L⁻¹ de BAP e, a partir desse ponto, BAP passou a inibir o desenvolvimento das plantas *in vitro*, com um decréscimo na produção de biomassa total. Com esse resultado infere-se a importância do balanço hormonal entre auxina e citocinina para o controle da proliferação de brotações em explantes de abacaxizeiro ornamental, conforme estabelecido por Skoog & Miller (1957) e confirmado por outros autores em espécies do gênero *Ananas* (Dewald *et al.*, 1988; Guerra *et al.*, 1999; Barbosa *et al.*, 2004).

Conclusões

A propagação do abacaxizeiro ornamental em meio nutritivo líquido a partir de brotações multiplicadas *in vitro*, em formulação de meio MS líquido, suplementada com BAP, é satisfatória para a micropropagação rápida dessa espécie.

Não foram observadas brotações vitrificadas nos distintos períodos de subcultivos.

A concentração de 1,2 mg.L⁻¹ de BAP induziu a estimativa média de 872,2 brotos por explante, em subcultivos mensais, aos 120 dias de cultura, proporcionando a melhor resposta para a multiplicação *in vitro*.

A percentagem de brotações formadas aumenta com o período de subcultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, W.A.B. **Efeito da Benzilaminopurina nas Diferentes Fases da Propagação *in vitro* do Abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.)**. 1994. 83p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA.

- ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.296-300, 2002.
- AUER, C.A.; COHEN, J.D. Identification of a benzyladenine disaccharide conjugate produced during shoot organogenesis in *Petunia* leaf explants. **Plant Physiology**, v.102, p.541–545, 1993.
- BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooyh Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.725-733, 2004.
- BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A.G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, n.1, p.37-44, 2003.
- CENTENO, M.L.; RODRÍGUEZ, A.; FEITO, I.; FERNÁNDEZ, B. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and the morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. **Plant Cell Report**, v.16, p.58–62, 1996.
- COLLINS, J.L. **The pineapple**: botany, cultivation, and utilization. London: Leonard Hill, 1960. 294p.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. **The Pineapple**: botany, production and uses. New York: CAB International, 2003. 320p.
- CORREIA, D.; RIBEIRO, K.A.; ROSSETI, A.G.; SILVEIRA, M.R.S. **Efeito do ácido indol butírico e do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Pesquisa em andamento. Fortaleza: Embrapa Agricultura Tropical, n.66, p.1-3, junho, 2000.
- COSTA, T.; ZAFFARI, G.R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Shultz) cv. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.109-113, 2005.

- CRUZ, A.R.R. **Micropropagação de Oito Genótipos de Abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill).** 2000. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.575-581, 2005.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLES, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.
- ESCALONA, M.L.; SAMSON, G.; BORROTO, C.; DESJARDINS, Y. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.39, p.651-656, 2003.
- FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, v.21, p.844-850, 2003.
- FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.B. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.49-55, 2004.
- GUERRA, M.P.; DAL-VE스코, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1557-1563, 1999.
- GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**, v.20, p.195-201, 1981.

- MATHEWS, V.H.; RANGAN, T.S.; NARAYANASWAMY, S. Micropropagation of *Ananas sativus in vitro*. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.79, n.5, p.450-454, 1976.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalidium buldiamur* L. e *Mammillaria bocassana* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.589-593, 1992.
- REDIG, P.; SHAUL, O.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN-ONCKELEN, H. Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. **FEBS Letters**, v.391, p.175–180, 1996.
- REINHARDT, D. H. A planta e o seu ciclo. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. (Org.). **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77p. (Frutas do Brasil 7).
- REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, C.A.P. Métodos de propagação. Cap. 5. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.105-138, 1999.
- SILVA, A.B; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; MOREIRA, M.A.; DUTRA, L.F. Influência da benzilaminopurina na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, p.1190-1196, 2002
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- SOUZA, F.V.; SEREJO, J.A.S.; CABRAL, J.R.S. Beleza Rara. **Cultivar**, v.5, p.06-08, 2004.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, v.34, p.69-73, 2007.

VILLA, F.; ARAUJO, A.G.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ebano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v.20, p.582-589, 2005.

VILLA, F.; FRAGUAS, C.B.; DUTRA, L.F.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.266-270, 2006.

ZIV, M. Morphogenetic patterns of plant micropropagation in liquid medium in shaken flasks or large-scale bioreactor cultures. **Israel Journal of Botany**, v.40, p.145-153, 1991.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para número e massa fresca de brotações de *Ananas comosus* var. *bracteatus*, em função da concentração de BAP, concentração de ANA e período de subcultivo.

Causas de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Número de Brotações	Massa fresca das brotações
Concentração de BAP (CB)	5	29,5017*	6,7029*
Concentração de ANA (CA)	1	3,4569*	1,3643*
Cultivo (C)	3	29,3200*	31,0706*
CB x CA	5	0,7213*	0,3850*
CB x C	15	1,0355*	0,6531*
CA x C	3	0,2919*	0,1380*
CB x CA x C	15	0,0845 ns	0,0882*
Resíduo	384	0,0756	0,0234
Média ¹		1,59	1,25
CV (%)		17,30	12,26

¹ – médias transformadas segundo $\log(x + 1)$

* – significativo ao nível de 5%

ns – não significativo

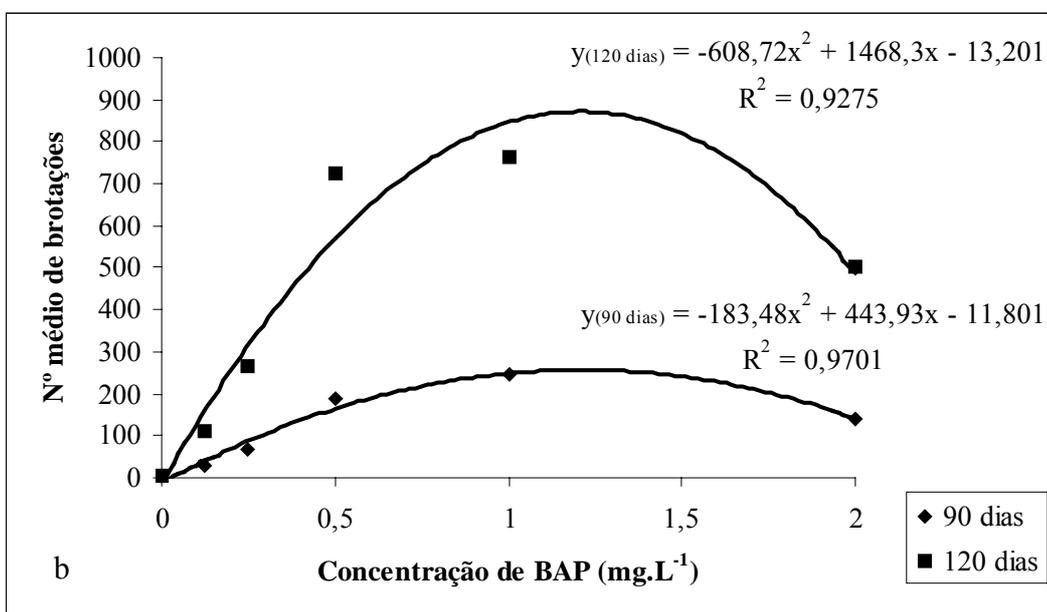
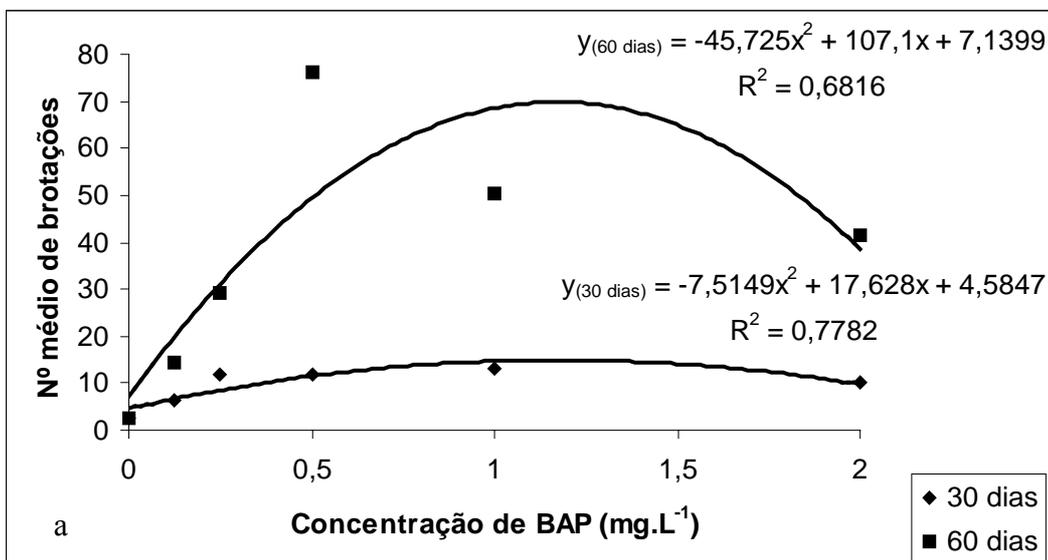


Figura 1. Variação do número de brotações em explantes de *Ananas comosus* var. *bracteatus* em função da concentração de BAP, na ausência de ANA, nos períodos de subcultivos de (a) 30, 60, (b) 90 e 120 dias.

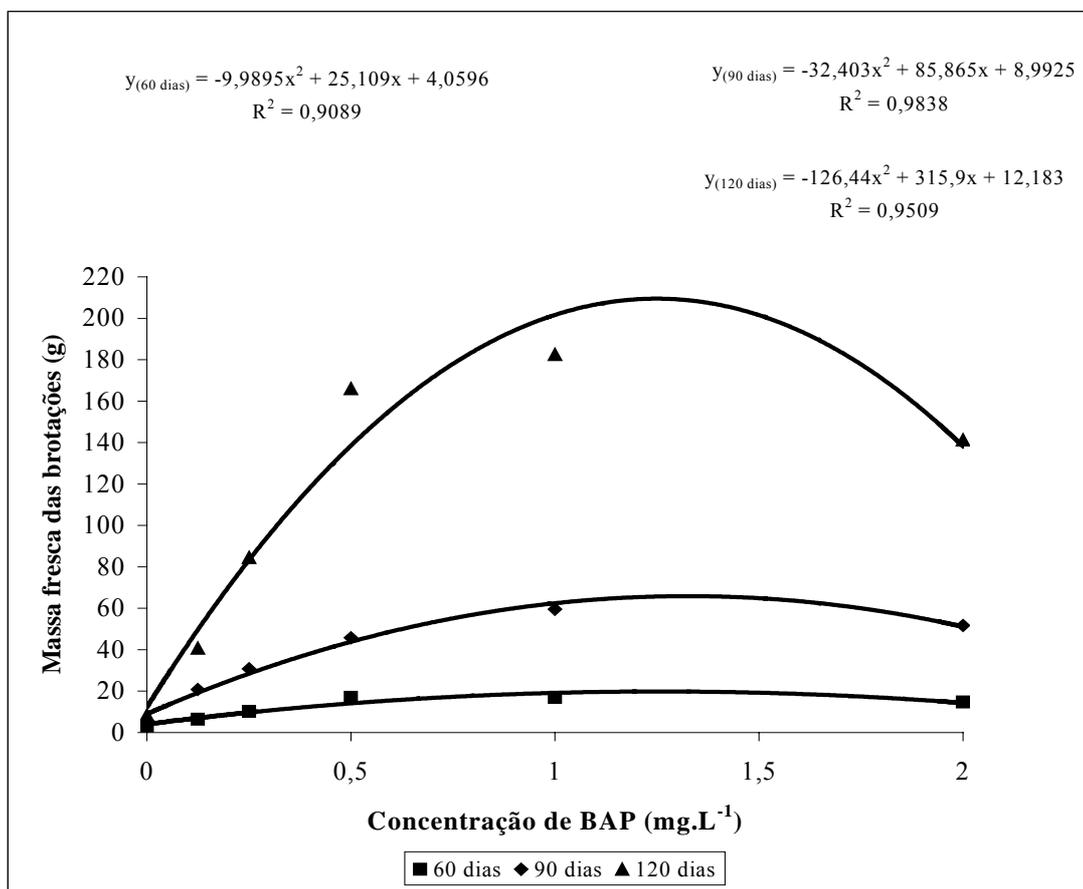


Figura 2. Variação da massa fresca de brotações de *Ananas comosus* var. *bracteatus* em função da concentração de BAP, na ausência de ANA, no período de subcultivo de 60, 90 e 120 dias.

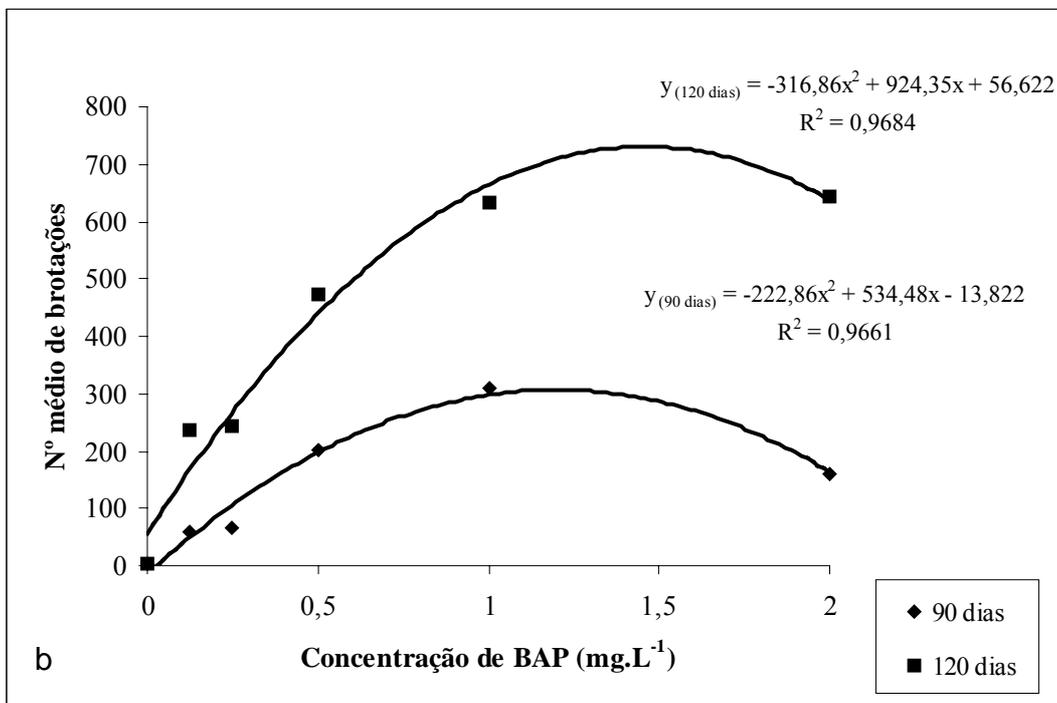
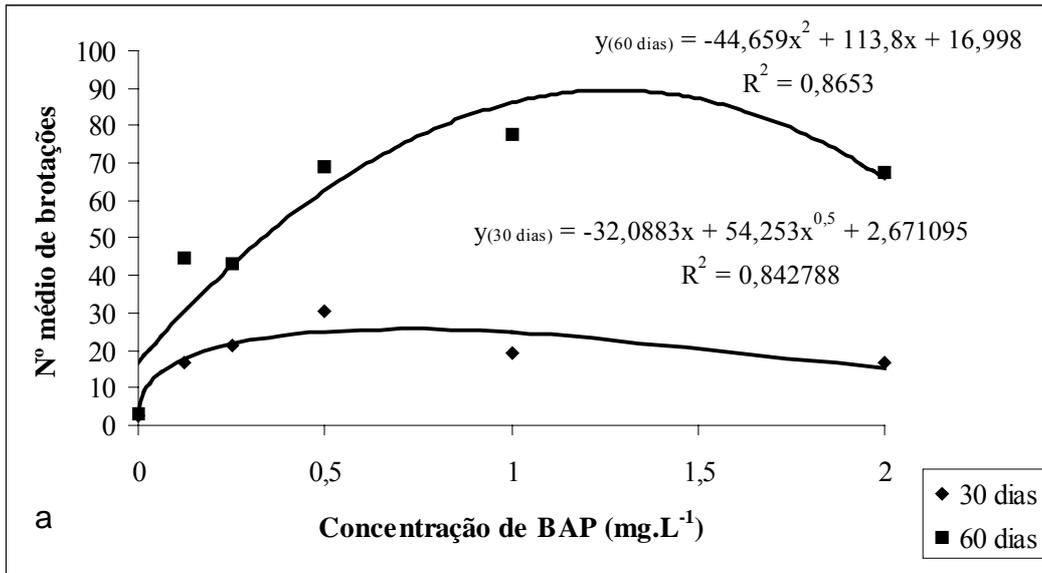


Figura 3. Variação do número de brotações em explantes de *Ananas comosus* var. *bracteatus* em função da concentração de BAP, na presença de ANA, nos períodos de subcultivos de (a) 30, 60, (b) 90 e 120 dias.

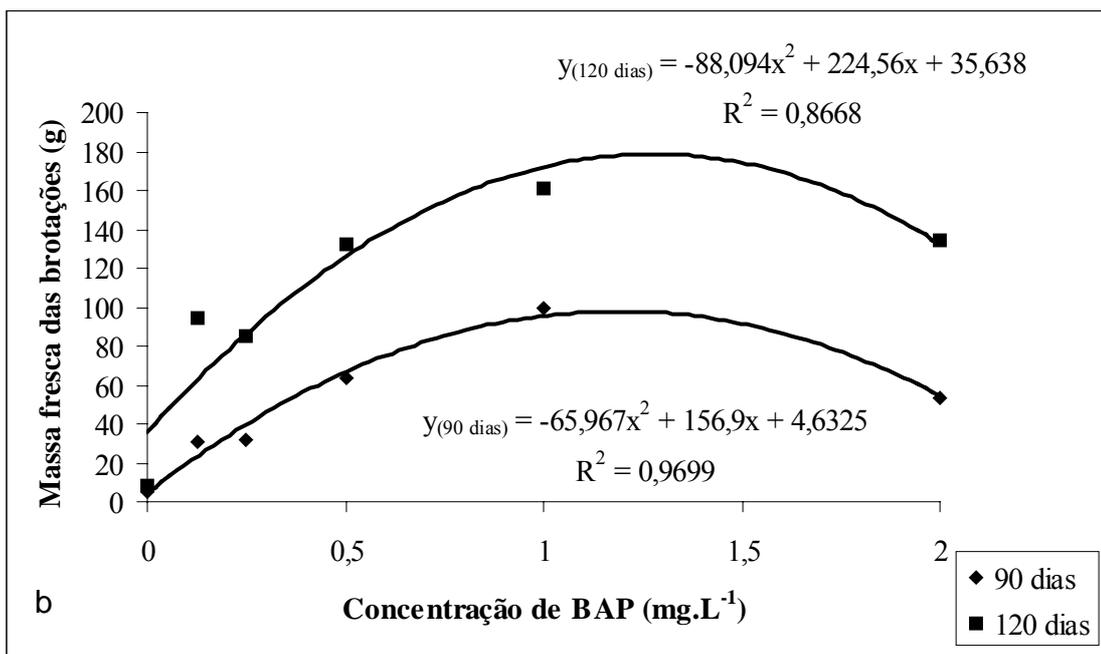
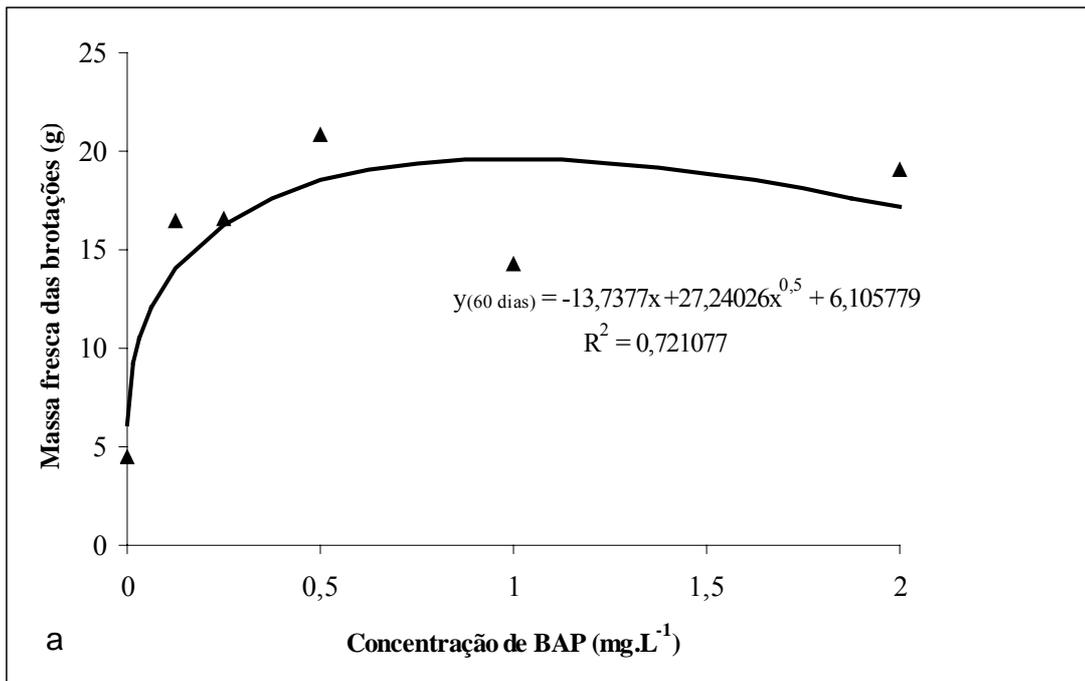


Figura 4. Variação da massa fresca de brotações em explantes de *Ananas comosus* var. *bracteatus* em função da concentração de BAP, na presença de ANA, nos períodos de subcultivos de (a) 60, (b) 90 e 120 dias.

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS
MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [*Ananas comosus*
VAR. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES TIPO RAPD**

(Trabalho submetido para publicação na revista Genetic Molecular Research)

Avaliação da fidelidade genética de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] utilizando marcadores tipo RAPD

Maria do Desterro Mendes dos Santos¹, Gláucia Cortopassi Salles Buso², Antonio Carlos Torres³

¹Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, C.P. 4.457, CEP 709190-970, Brasília, DF. E-mail: maria@cnph.embrapa.br ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa postal 02.372, 70849-970 Brasília, DF, E-mail: buso@cenargen.embrapa.br ³Embrapa Hortaliças, C.P. 218, CEP 70359-970, Brasília, DF. Autor para correspondência. E-mail: torres@cnph.embrapa.br

Resumo

O objetivo desse trabalho foi o de avaliar a variabilidade genética em plantas micropropagadas do abacaxizeiro ornamental, após o quarto período de subcultivo. O meio básico de cultura consistiu de sais minerais MS, vitaminas, 3% de sacarose, formulação líquida, suplementado com benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹. A análise de RAPD indicou uma associação entre BAP e o aparecimento de variações genéticas nas plantas micropropagadas. Os 46 primers utilizados amplificaram 434 bandas monomórficas (95,8%) e 18 foram polimórficas (4,2%), dentre as plantas regeneradas. Fragmentos polimórficos foram produzidos por 12 *primers* (OPA-1; OPA-20; OPB-1; OPB-19; OPC-19; OPF-13; OPL-17; OPM-13; OPP-16; OPT-07; OPV-19 e OPX-03). Os *primers* OPA-1; OPA-20; e OPB-19; OPC-19; OPL-17; OPP-16; OPX-3 geraram uma banda polimórfica. The *primer* OPF-13 amplificou um máximo de três bandas polimórficas. Neste estudo, a técnica de RAPD foi eficiente para identificar variações genômicas que podem ocorrer durante o processo de micropropagação de abacaxizeiro ornamental em meio suplementado com BAP. Em adição, foi possível identificar a presença de variabilidade genética no genótipo micropropagado nos estádios iniciais de desenvolvimento.

Termos para indexação: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; variação somaclonal; fidelidade genética; cultivo *in vitro*.

Genetic fidelity avaluation of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] micropropagated plants using RAPD type molecular markers

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the genetic variability in micropropagated plants of ornamental pineapple after four periods of subculture. The basal culture medium was composed by MS salts, vitamins, 3% sucrose, liquid formulation, supplemented with benzylaminopurine (BAP) in the concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0 mg.L⁻¹. The RAPD analysis indicated an association between BAP and the appearance of genetic variation in micropropagated plants. The 46 primers tested amplified 434 monomorphic bands (95.8%) and 18 were polymorphic (4.2%) among regenerated plants. The polymorphic fragments were produced by 12 primers (OPA-1; OPA-20; OPB-1; OPB-19; OPC-19; OPF-13; OPL-17; OPM-13; OPP-16; OPT-07; OPV-19 and OPX-03). The primers OPA-1; OPA-20; e OPB-19; OPC-19; OPL-17; OPP-16; OPX-3 produced a single polymorphic band. The primer OPF-13 was able to amplify three polymorphic bands. In this study the RAPD technique was efficient to show the genomic variations that might occur during the micropropagation process of ornamental pineapple in a medium supplemented with BAP. In addition, it was possible to detect genetic variation in the early stages of development of micropropagated genotype.

Index terms: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; somaclonal variation; genetic fidelity; *in vitro* culture

Introdução

O abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal] é uma monocotiledônea da família Bromeliaceae (Collins, 1960; Reinhardt, 2000; Coppens & Leal, 2003). Esta espécie apresenta um grande potencial de comercialização (Souza *et al.*, 2004). A propagação comercial dessa espécie é feita de forma vegetativa, via mudas produzidas pelas plantas em condições de campo. Cada planta produz até dez mudas por ano, o que limita a expansão da cultura (Correia *et al.*, 2000) bem como a multiplicação, em larga escala, de genótipos elite. Além disso, sistemas de propagação

vegetativa podem ocasionar a introdução e a disseminação de doenças em novas áreas de cultivo, quando as mudas são retiradas de plantas matrizes contaminadas.

Uma estratégia para se contornar essas limitações é o emprego da cultura de tecidos. O cultivo de tecidos incorpora técnicas de micropropagação importantes na clonagem e multiplicação rápida de genótipos de interesse, produzindo plantas, teoricamente, com a mesma identidade genética do material original e com alta qualidade fitossanitária. Entretanto, tem-se observado que essa tecnologia pode ocasionar, em algumas situações, o aparecimento de modificações genéticas conhecidas como variações somaclonais (Larkin & Scowcroft, 1981) e/ou variações epigenéticas (Evans & Bravo, 1986). Neste contexto, é apropriado que essas variações genéticas e/ou epigenéticas no material micropropagado sejam caracterizadas. Variações genéticas observadas em plantas oriundas de cultura de tecidos têm sido relatadas no tomateiro (Evans & Sharp, 1983), *Nicotiana glauca* (Evans & Bravo, 1986), *Ananas comosus* (Das & Bhowmik, 1997; Gotardi *et al.*, 2002; Feuser *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2007), *Musa sp.* (Grajal-Martin *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2006), *Glycine max* (Gesteira *et al.*, 2002) e *Cucurbita pepo* (Leljak-Levani *et al.*, 2004), dentre outras.

Recentemente, os marcadores moleculares têm sido utilizados na confirmação da fidelidade genética durante a micropropagação. Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados na detecção de variação ou para confirmar a fidelidade genética de plantas micropropagadas (Gupta *et al.*, 1998). A técnica de RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) engloba o uso de marcadores do tipo dominante, de menores custos e, extremamente, eficientes na análise rápida de polimorfismos (Williams *et al.*, 1990; Ehsanpour & Hoseini, 2007). Assim sendo, um sistema de identificação das plantas de abacaxizeiro ornamental micropropagadas que seja rápido, preciso, de baixo custo, num estágio inicial de crescimento, antes de ir para o campo, é desejável para produção de mudas de qualidade e em quantidade suficiente para formação de novas lavouras (Grajal-Martin *et al.*, 1998; Dal-Vesco *et al.*, 2000; Gottardi *et al.*, 2001; Soniya *et al.*, 2001; Gesteira *et al.*, 2002; Erig & Schuch, 2003; Feuser, 2003; Martin, *et al.*, 2006).

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a fidelidade genética de propágulos oriundos de brotações, subcultivadas a cada 30 dias em meio contendo benzilaminopurina (BAP), no final do período 120 dias.

Material e métodos

Material vegetal e condições de cultivo *in vitro* – Para avaliação da fidelidade genotípica, via RAPD, foram utilizadas folhas oriundas de brotações de *A. comosus* var. *bracteatus* estabelecidas *in vitro* mediante cultura de gemas axilares de mudas tipo coroa em meio básico composto de macro e micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962), 3% sacarose, 0,7 % de ágar e, em mg.L⁻¹: mio-inositol, 100; tiamina.HCl, 0,1; piridoxina.HCl, 0,05; ácido nicotínico, 0,05. A esse meio foram adicionados 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; 2,0 mg.L⁻¹ ácido giberélico (GA₃) e 0,01 mg.L⁻¹ α-naphthleneacético ácido (ANA). As culturas foram mantidas a temperatura de 27±2°C e fotoperíodo de 16h, durante 90 dias. Após esse período, selecionou-se aleatoriamente um propágulo regenerado que teve suas brotações individualizadas e colocadas, respectivamente, em frascos contendo meio de multiplicação composto de meio básico suplementado com, respectivamente, 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, formulação líquida. O pH dos meios foi ajustado 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas a temperatura de 27±2°C e fotoperíodo de 16h. Os propágulos foram subcultivados mensalmente, durante 120 dias.

Extração de DNA – Foram utilizadas folhas oriundas da cultura *in vitro* e da planta matriz do abacaxizeiro ornamental para extração do DNA genômico (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A quantificação e integridade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizada em luz ultravioleta (UV).

Análise RAPD – Após a quarta subcultura foram selecionados aleatoriamente para a análise de RAPD, dezenove indivíduos de cada concentração de BAP, totalizando 95 brotações micropropagadas e uma planta matriz (testemunha). As brotações foram enraizadas e transferidas para tubetes de 3,0 cm diâmetro contendo o substrato Plantmax, até serem transferidos para a casa de vegetação onde permaneceram para avaliação de possíveis mudanças na morfologia. Todas as brotações micropropagadas caracterizadas nesse trabalho foram derivadas a partir de uma única gema desenvolvida da planta matriz. Inicialmente, foi realizada uma triagem com os 520 *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) do kit da Operon Technologies Inc. As reações de amplificação do DNA foram feitas por PCR (‘Polymerase Chain Reaction’). Cada reação continha: 3,0 µL de DNA genômico a 3,0 ng/µl; 4,92 µL de água milli-Q autoclavada; 1,30 µL de Tampão 10X para Taq DNA Polimerase; 1,04 µL de dNTPs 2,5 mM; 1,5 µL de Primer (Operon

Technologies, USA) 10 ng/ μ L e 0,2 μ L de enzima Taq DNA Polimerase, em um total de 13 μ L. As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços em um termociclador Parkin Elmer, programado para 40 ciclos de: 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C, com extensão final de 7 min a 72°C. Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em géis de agarose com concentração de 1,5% em tampão TBE 1X. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta em sistema de vídeo Eagleye™ (Stratagene^R). As bandas foram identificadas visualmente por comparação com o padrão 1Kb Ladder (75 a 12.216 pb).

Seleção de primers polimórficos – Para a escolha dos *primers* foi utilizado DNA de uma planta matriz e dois indivíduos oriundos da cultura *in vitro*. Os primers que apresentaram polimorfismo ou amplificaram um maior número de bandas nítidas, reproduzível e bem definidas foram selecionados e, posteriormente, avaliados para verificar quais os mais informativos quanto ao polimorfismo no material. Baseando-se na presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo *loco*) as amostras foram comparadas, codificando a presença da banda no gel 1 e a sua ausência como 0. Todas as análises foram repetidas duas vezes e apenas as bandas reproduzíveis foram consideradas.

Resultados e discussão

O DNA se apresentou com bandas íntegras e sem rastro, evidenciando que não ocorreu degradação e nem contaminação. Dos 520 *primers* RAPD avaliados, 46 *primers* foram selecionados de acordo com os critérios estabelecidos. Somente os amplicons que se apresentaram nítidos e bem definidos foram utilizados na comparação do perfil de DNA da planta mãe com os de 95 plantas micropropagadas. Na tabela 1 estão listados a seqüência dos *primers*, número de produtos de amplificações gerados e total de *loci* polimórficos. Os 46 *primers* apresentaram amplificação para os propágulos avaliados, sendo obtidos 429 *loci* (bandas ou amplicons), dos quais 411 (95,8%) foram monomórficos e 18 (4,2%) foram capazes de revelar polimorfismos entre os diferentes propágulos. Foi gerado um total de 41.184 amplicons (número de propágulos \times número de bandas obtidas), com uma média de 9,32 bandas por *primer* (Tabela 2). O número de bandas por *primer* variou de quatro (*primer* OPQ-5) até 16 (*primers* OPN-16 e OPT-7) (Tabela 1). O menor fragmento amplificado (298 pb) e o maior (5.090 pb) foram obtidos, respectivamente, com os *primers* OPM-13 e OPA-20. O marcador de 1Kb DNA Ladder foi eficaz na determinação do tamanho aproximado dos *loci*. Fragmentos polimórficos (ausência ou presença de uma ou

mais bandas) foram produzidos por 12 *primers* (OPA-1; OPA-20; OPB-1; OPB-19; OPC-19; OPF-13; OPL-17; OPM-13; OPP-16; OPT-07; OPV-19 e OPX-03) (Figura 1 e tabela 3). Os *primers* OPA-1; OPA-20; OPB-19; OPC-19; OPL-17; OPP-16 e OPX-3 geraram uma única banda polimórfica e o *primer* OPF-13 amplificou um máximo de três bandas polimórficas (Tabela 1). O polimorfismo gerado pelo *primer* OPC-19 foi observado em cerca de dez indivíduos com variação genética (38%). Três variantes foram detectados pelo *primer* OPL-17; cada um dos *primers* OPF-13, OPP-16 e OPT-7 foram capazes de identificar dois variantes, independentes; os *primers* OPA-20, OPA-1, OPB-1, OPB-19, OPM-13, OPV-19, OPX-3, independentemente, identificaram um variante somaclonal (Tabela 3).

A percentagem de polimorfismo detectado em *A. comosus var. bracteatus* regenerado em meio contendo BAP foi estimada entre 21 a 42%, confirmando a ocorrência de variação durante o processo de micropropagação de um mesmo clone. A variação do padrão eletroforético das bandas RAPD encontrado no DNA genômico dos propágulos regenerados, após 120 dias de cultura, foi devida a suplementação do meio com BAP, de acordo com o teste de contingência que apresentou um valor de X^2 significativo (Tabela 4). Esse padrão de resposta é uma das limitações da cultura de tecidos na propagação clonal de plantas, em larga escala, principalmente, com a suplementação do meio de cultura com substâncias reguladoras de crescimento (Evans *et al.*, 1984; Rani *et al.*, 1995; Salvi *et al.*, 2001; Feuser *et al.*, 2003; Costa & Zaffari, 2005). Em *Ananas bracteatus cv. striatus* variações fenóticas de 52% de plantas albinas e 20,5% de plantas verdes, em meio com BAP, foram descritas por Costa & Zaffari (2005). Feuser *et al.* (2003) relataram taxas mais reduzidas de variação somaclonal de 7,5% em cultura *in vitro* do abacaxizeiro comercial usando os sistemas de meio líquido estacionário e o de imersão temporal. Esses autores utilizando-se 10 *primers*, RAPD detectaram 7,5 e 5,0% de variantes somaclonais, respectivamente, para os sistemas estacionários e de imersão temporal, em meio suplementado com paclobutrazol. No entanto, não foi informado por Feuser *et al.* (2003) o período de cultura em que foram realizadas as amostragens para análise de RAPD. O período de cultura apresenta influência direta na taxa de variantes somaclonais (Skirvin *et al.*, 1994), sendo de 1 a 3% a quantidade de variantes esperada em materiais provenientes da micropropagação de um clone. Outros estudos indicam que os tratamentos usados no cultivo *in vitro*, com alta taxa de multiplicação, podem aumentar o número de variantes (Bairu *et al.*, 2006). O grau de variação genética induzida pelo processo de cultura de tecidos depende, dentre outros fatores, do método de regeneração, formulação do meio de

cultura, período de cultura. Sistemas de regeneração a partir de meristemas organizados, tais como gemas apicais, são considerados os métodos mais eficientes para garantir a integridade genética do material micropropagado. Já os métodos de regeneração via explantes de folha (Kawiak & Lojkowska, 2004) e calo (Skrivin *et al.*, 1984) são considerados menos estáveis. Em *Curcuma longa*, em explantes de gemas, utilizadas para estabelecimento das culturas, observou-se nos propágulos regenerados uma homogeneidade genética, quando comparados entre si e com a planta mãe (Tyagi *et al.*, 2007). Entretanto, foi encontrada uma frequência de 16,5% de polimorfismo na regeneração via calo de explantes foliares (Salvi *et al.*, 2001); Modgil *et al.* (1997) utilizaram 11 *primers* de RAPD para determinar a variação genética em 10 plantas regeneradas, via cultura de gemas axilares, no porta-enxerto de maçã MM106 e observaram que 23,2% do total das bandas produzidas foram polimórficas.

Na avaliação de plantas matrizes do abacaxizeiro cultivar 'Smooth Cayenne' utilizando-se marcadores RAPD comprovou-se a existência de variabilidade genética nas plantas avaliadas *in vivo*, indicando essa cultivar como uma coleção de clones em mistura (Gottardi *et al.*, 2001). Em estudo subsequente, Gottardi *et al.* (2002) na análise de variação genética de plantas derivadas do seccionamento de caule observaram que as plantas produzidas apresentaram a mesma característica genotípica das plantas matrizes.

Neste estudo, a técnica de RAPD forneceu subsídios para indicar que variações genéticas podem ocorrer como resultado de mutações durante o processo de micropropagação de *A. comosus* var. *bracteatus* em meio suplementado com BAP. Foi possível identificar a presença de variabilidade genética no material propagado já nos estágios iniciais de desenvolvimento. Na produção comercial de mudas dessa espécie, derivadas de multiplicação *in vitro*, o conjunto de *primers* descrito no presente trabalho pode configurar uma estratégia eficiente na identificação de mudas com perfil de DNA diferentes da planta original. Apesar de não poder dizer se a mutação detectada produzirá algum produto fenotípico diferente da planta original, que no caso do abacaxizeiro ornamental poderia constituir-se em novos genótipos no segmento de plantas ornamentais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

Referências bibliográficas

- BAIRU, M.W.; FENNELL, C.W.; VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, v.108, p.347-351, 2006.
- BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A.G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, n.1, p.37-44, 2003.
- COLLINS, J.L. **The pineapple: Botany, Cultivation, and Utilization**. London: Leonard Hill, 1960. 294p.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. **The pineapple: botany, cultivation, and utilization**. New York: CAB International, 2003. 320p.
- CORREIA, D.; RIBEIRO, K.A.; ROSSETI, A.G.; SILVEIRA, M.R.S. **Efeito do ácido indol butírico e do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Pesquisa em andamento. Fortaleza: Embrapa Agricultura Tropical, n.66, p.1-3, junho, 2000.
- COSTA, T.; ZAFFARI, G.R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Shultz) cv. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.109-113, 2005.
- DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R; BELÓ, A.; FEUSER, S.; OLIVEIRA, E.N.; BRANCHER, A.; ZAFFARI, G.R.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22, p.80-85, 2000.
- DAS, R.K.; BHOWMIK, G. Some somaclonal variants in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) plants obtained from different propagation techniques. **International Journal of Tropical Agriculture**, v.15, p.95-100, 1997.

- EHSANPOUR, A.A.; MANDANI, S.; HOSEINI, M. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-radiation using RAPD-PCR. **General Applied Plant Physiology**, v.33, p.3-11, 2007.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Avaliação da fidelidade genotípica por marcadores RAPDs de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick, regenerados *in vitro*. **Ciência Rural**, v.33, p.449-454, 2003.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. **Science**, v.221, p. 949-951, 1983.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; MEDINA FILHO, H.P. Somaclonal and gametaclonal variation. **American Journal of Botany**, v.71, p.759-774, 1984.
- EVANS, D.A.; BRAVO, J.E. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, R.J.; HAMMERSCHLAG, F.A.; LAWSON, R.H (Ed.). **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture: tissue culture as a plant production system for horticultural plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. 371p.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Somaclonal and gametoclinal variation. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. **Handbook of Plant Cell Culture: techniques and applications**, v.4. 1986. p.97-132.
- FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.221-227, 2003.
- GESTEIRA, A.S.; OTONI, W.C.; BARRS, E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. **Plant Breeding**, v.121, p.269, 2002.

- GOTTARDI, M.V.C.; LEMOS, E.G.M.; RUGGIERO, C. Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cultivar Smooth Cayene utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.263-267, 2001.
- GOTTARDI, M.V.C.; LEMOS, E.G.M.; RUGGIERO, C. Avaliação por RAPD de plantas de abacaxizeiro cultivar Smooth Cayenne derivadas do seccionamento do talo e cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.001-005, 2002.
- GRAJAL-MARTIN, M.J.; SIVERIO-GRILLO, G.; MARRERO-DOMÍNGUEZ, A. The use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the study of genetic diversity and somaclonal variation in *Musa*. **Acta Horticulture**, v.490, p. 445-454, 1998..
- GUERRA, M.P.; DAL-VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1557-1563, 1999.
- GUPTA, P.K.; SINGH, S.P.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RANESH, B. **Genetics and biotechnology in crop improvement**. Meerut: Rastogi Publicatios, 1998.
- JALIGOT, E.; RIVAL, A.; BEULÉ, T.; DUSSERT, S.; VERDEIL, J.L. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypthesis. **Plant Cell Reports**, v.19, p.684-690, 2000.
- KAWATA, M.; OHMIYA, A.; SHIMAMOTO Y.; OONO, K.; TAKAIWA, F. Structural changes in the plastid DNA of rice (*Oriza sativa* L.) during tissue culture. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.364-371, 1995.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.197-214, 1981.

- LELJAK-LEVANI, D.; BAUER, N.; MIHALJEVIC, S.Z.; JELASKA, S. Change in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. **Plant Cell Reports**, v.23, p. 120-127, 2004.
- MARTIN, K.P.; PACHATHUNDIKANDI, S.K.; ZHANG, C-L.; SLATER, A.; MADASSERY, J. RAPD analysis of a variant of banana (*Musa sp*) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.42, p.188-192, 2006.
- MOREIRA, A.M.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.1002-1006, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.
- RANI, V.; AJAY, P.; RAINA, S.N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. **Plant Cell Reports**, v.14, p. 459-462, 1995.
- REINHARDT, D.H. A planta e o seu ciclo. In: REINHARDT, D.H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. (Org.). **Abacaxi Produção**: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77p. (Frutas do Brasil 7).
- RODRIGUES, P.H.V.; DUTRA, M.F.B.; FARIA, O.A.; LIMA, A.M.L.P. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental, *Ananas bracteatus* Schultes var. *striatus* (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.12, p.122-125, 2007.
- SALVI, D.S.; GEORGE, L.; EAPEN, S. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p.113-119, 2001.

- SKIRVIN, R.M.; McPHEETERS, K.D.; NORTON, M. Sources and frequencies of somaclonal variations. **HortScience**, v.29, p.1232-1237, 1994.
- SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.307a-307i, 2002.
- SONIYA, E.V.; BANERJEE, N.S.; DAS, M.R. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. **Current Science**, v.80, p.1213-1215, 2001.
- SOUZA, F.V.; SEREJO, J.A.S.; CABRAL, J.R.S. Beleza Rara. **Cultivar**, v.5, p.06-08, 2004.
- TYAGI, R.K.; AGRAWAL, A.; MAHALAKSHMI, Z.H.; TYAGI, H. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.43, p.51-58, 2007.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531- 6535, 1990.

Tabela 1. Código e seqüência de 46 *primers* RAPD, números de produtos polimórficos e total de amplificons (bandas) gerados com na análise de brotações micropropagadas de *Ananas comosus* var. *bracteatus* durante 120 dias de subcultivo em meio suplementado com BAP.

Primer	Seqüência (5'-3')	Nº total de bandas	Bandas polimórficas
OPA-01	CAG GCC CTT C	12	01
OPA-08	GTG ACG TAG G	12	
OPA-19	CAA ACG TCG G	11	
OPA-20	GTT GCG ATC C	07	01
OPB-01	GTT TCG CTC C	12	02
OPB-18	CCA CAG CAG T	10	
OPC-08	TGG ACC GGT G	08	01
OPC-19	GTT GCC AGC C	07	01
OPF-04	GGT GAT CAG G	07	
OPF-13	GGC TGC AGA A	14	03
OPG-19	GTC AGG GCA A	10	
OPI-02	GGA GGA GAG G	15	
OPI-03	AAG GCG GCA G	09	
OPI-06	AAG GCG GCA G	10	
OPI-07	CAG CGA CAA G	12	
OPI-11	ACA TGC CGT G	10	
OPI-14	TGA CGG CGG T	08	
OPJ-13	CCA CAC TAC C	07	
OPK-17	CCC AGC TGT G	10	
OPL-08	AGC AGG TGG A	06	
OPL-17	AGC CTG AGC C	10	01
OPM-13	GGT GGT CAA G	12	02
OPN-16	AAG CGA CCT G	16	
OPO-07	CAG CAC TGA C	09	
OPO-10	TCA GAG CGC C	14	
OPP-16	CCA AGC TGC C	08	01
OPQ-05	CCG CGT CTT G	04	
POR-08	CCC GTT GCC T	06	
POR-09	TGA GCA CGA G	12	
OPR-10	CCA TTC CCC A	08	
OPR-14	CAG GAT TCC C	07	
OPR-16	CTC TGC GCG T	10	
OPR-17	CCG TAC GTA G	09	
OPS-04	CAC CCC CTT G	05	
OPT-07	GGC AGG CTG T	16	02
OPU-01	ACG GAC GTC A	12	
OPV-07	GAA GCC AGC C	07	
OPV-10	GGA CCT GCT G	08	
OPV-11	CTC GAC AGA G	05	
OPV-19	GGG TGT GCA G	12	02
OPX-03	TGG CGC AGT G	12	01
OPX-19	TGG CAA GGC A	12	
OPZ-08	GGG TGG GTA A	09	

Tabela 2. Descrição e quantificação de parâmetros associados com a análise genética de 95 propágulos micropropagados e uma planta matriz de *Ananas comosus* var. *bracteatus* utilizando o sistema de marcadores RAPD.

Descrição	RAPD
Número de <i>primers</i> testados	520
Número de <i>primers</i> avaliados	46
Número de <i>primers</i> que produziram polimorfismo	12
Número total de bandas amplificadas	429
Número total de amplicons monomórficos	411
Número total de amplicons polimórficos	18
Porcentagem de bandas polimórficas	4,2%
Tamanho das bandas amplificadas	298 – 5,090 pb
Número médio de bandas polimórficas por <i>primer</i>	1,5
Número médio de fragmentos por <i>primer</i>	9,32

Tabela 3. Presença (+) ou ausência (-) de fragmentos polimórficos de RAPD, gerados por primers, em *A. comosus* var. *bracteatus*, provenientes de meio com diferentes concentrações de BAP, após 120 dias de cultivo. M: planta matriz; indivíduos: 5, 7, 15 e 16 (0,125 mg.L⁻¹ de BAP); 26, 27, 28, 29 e 39 (0,25 mg.L⁻¹ BAP); 50, 51, 52, 53, 54 e 58 (0,5 mg.L⁻¹ de BAP); 63, 64, 66 74 e 75 (1,0 mg.L⁻¹ de BAP); 78, 86, 93 e 95 (2,0 mg.L⁻¹ de BAP).

Primers	Regenerantes polimórficos																								
	M	5	7	15	16	26	27	28	38	39	50	51	52	53	54	58	63	64	66	74	75	78	86	93	95
OPA-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OPA-20	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OPF-13	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPF-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OPF-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OPL-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
OPM-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OPM-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OPP-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
OPT-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPT-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
OPV-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPV-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPX-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 4. Valores do Qui-quadrado (X^2) e a probabilidade (p) do teste de contingência na avaliação da fidelidade genética (indivíduos normais e indivíduos variantes) entre propágulos do abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) oriundos da cultura de tecidos de uma gema, em comparação com a planta matriz. Os propágulos foram mantidos *in vitro* em meio basal líquido suplementado com BAP, subcultivados a cada 30 dias e analisados via RAPD após 120 dias.

Concentrações de BAP (mgL ⁻¹)	Indivíduos normais	Indivíduos variantes	X^2	p
0,125	15	4	10,3	0,001-0,005
0,25	15	4	10,3	0,001-0,005
0,5	11	8	55,0	<0,001
1,0	14	5	18,1	<0,001
2,0	14	5	18,1	<0,001

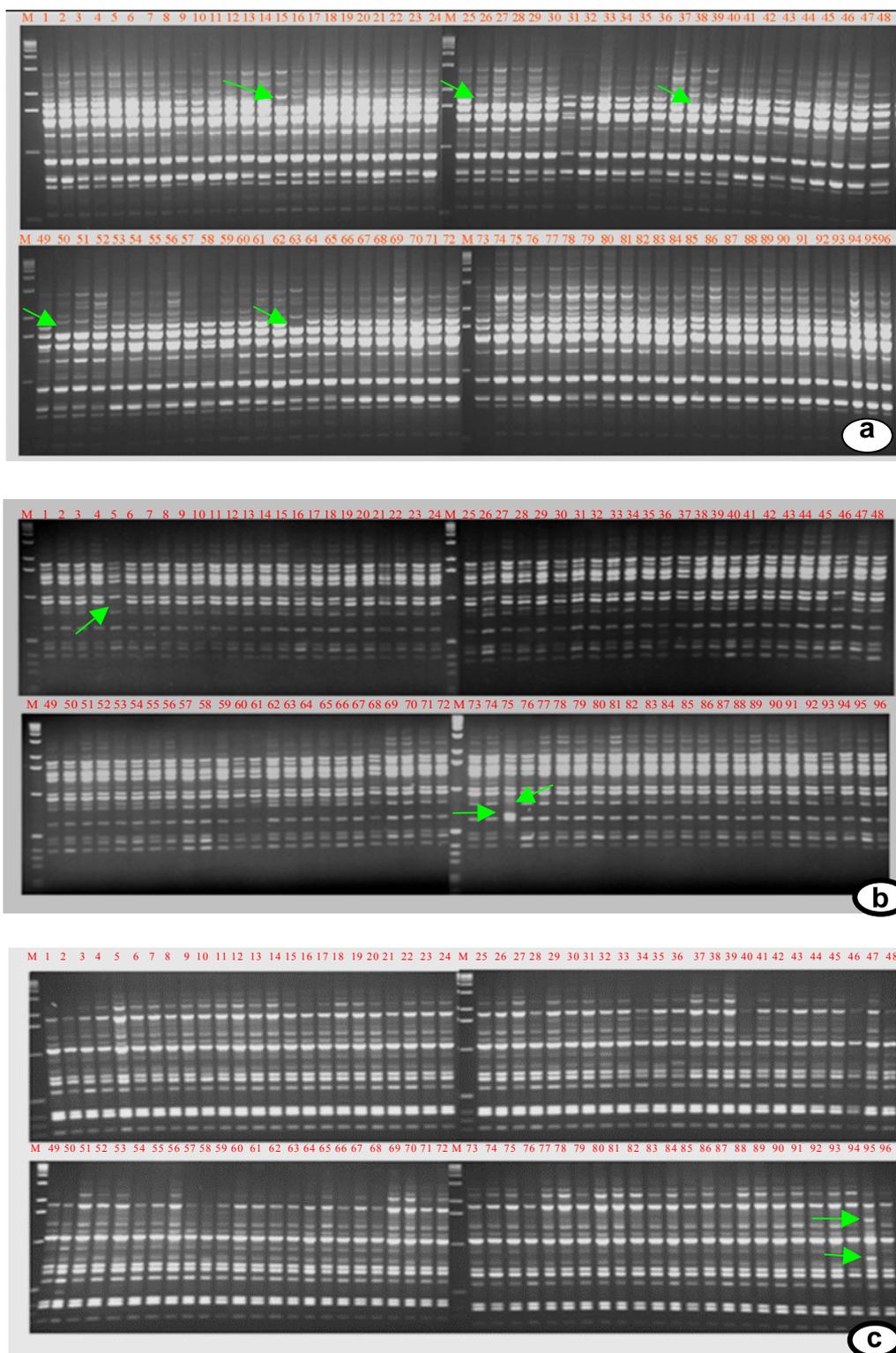


Figura 1. Eletroforese em géis de agarose 1,5%, de indivíduos mantidos *in vitro* em meio basal líquido suplementado com BAP, subcultivados a cada 30 dias e analisados via RAPD após 120 dias, mostrando fragmentos de RAPD resultantes de ampliações com os *primers*: (a) OPC-19; (b) OPF-13 e (c) OPM-13. As setas indicam os marcadores polimórficos.

CAPÍTULO 3

EFEITO DE ISOPENTENILADENINA E PERÍODOS DE SUBCULTIVOS NA PRODUÇÃO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* NO ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL

**(Trabalho submetido para publicação na revista *Plant Cell Culture and
Micropropagation*)**

Efeito de isopenteniladenina e períodos de subcultivos na produção de brotações *in vitro* no abacaxizeiro ornamental

Maria do Desterro Mendes dos Santos¹; José Getúlio da Silva Filho²; Antonio Carlos Torres^{2*}

¹Bióloga, mestranda em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, , C.P. 4.457, CEP 709190-970, Brasília, DF. E-mail: maria@cnph.embrapa.br

²Engenheiro Agrônomo, Especialista em Biotecnologia de Plantas, Embrapa Hortaliças C.P. 218, CEP 70359-970, Brasília, DF. E-mail: jgetulio@cnph.embrapa.br

^{2*}Engenheiro Agrônomo, Embrapa Hortaliças, C.P. 218, CEP 70359-970, Brasília, DF. Autor para correspondência. E-mail: torres@cnph.embrapa.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o efeito de concentrações de isopenteniladenina (2ip) em combinação com diferentes períodos de subcultivos na micropropagação do abacaxizeiro ornamental. Propágulos com aproximadamente 1,0 cm de tamanho, oriundos da cultura *in vitro*, foram utilizados como explantes. Os explantes foram inoculados em meio básico contendo sais minerais MS, 3% sacarose e, em mg.L⁻¹: i-inositol, 100; tiamina.HCl, 0,1; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,05; glicina, 2,0; em formulação líquida. A esse meio foram adicionados diferentes concentrações de 2ip (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) em combinação com quatro períodos de subcultivos (30, 60, 90 e 120 dias). O maior número de brotos por explante (139) foi obtido em meio básico com 1,6 mg.L⁻¹ de 2ip e 120 dias de subcultivo. Após a transferência de brotações individualizadas para meio contendo concentrações de ácido naftalenoacético (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹) verificou-se a diferenciação de raízes adventícias na porção basilar dos explantes.

Termos para indexação: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; micropropagação; cultivo *in vitro*.

Effect of isopentenyladenine and subculture periods on the *in vitro* shoots production of ornamental pineapple

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the effect of isopentenyladenine (2ip) addition in combination with subcultures period on the micropropagation of ornamental pineapple. Propagules that measured 1.0 cm in length, originated from *in vitro* culture were used as explants. The explants were inoculated in basal medium containing MS salts, 3% sucrose and, in mg.L⁻¹: i-inositol, 100; thiamine.HCl, 0.1; pyridoxine.HCl, 0.5; nicotinic acid, 0.05; and glycine, 2.0, liquid formulation. To this medium 2ip different concentrations (0,0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹) were added in combination with four periods of subculture (30, 60, 90 and 120 days). The maximum shoot production per explant (139) was observed in basal medium with 1.6 mg.L⁻¹ of 2ip and 120 days of subculture. After transfer individualized shoots to medium containing concentrations of naphthaleneacetic acid (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 and 4.0 mg.L⁻¹) adventitious roots were formed in the basal portion of the explants.

Index terms: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; micropropagation; *in vitro* culture.

Introdução

O abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal] é uma planta de propagação vegetativa, com grande potencial econômico (Coppens & Leal, 2003). A qualidade fitossanitária do campo de produção dessa espécie depende do material utilizado para sua propagação. Assim sendo, pode haver acúmulo, entre plantios sucessivos, de patógenos que são transmitidos de um ciclo de produção a outro, via mudas contaminadas. A micropropagação, em larga escala de mudas saudáveis, via cultura de tecidos, é uma estratégia que possibilita contornar a limitação de mudas com alta qualidade fitossanitária, principalmente, isentas de fusariose (Reinhardt & Cunha, 1999). Dada a escassez de informações sobre o efeito de delta 2-isopentenil adenina (2ip) na propagação *in vitro* de espécies do gênero *Ananas*, neste trabalho procurou-se otimizar a concentração

deste composto na produção de propágulos de abacaxizeiro ornamental em diferentes períodos de subcultivos e seu subsequente enraizamento.

Material e métodos

Proliferação de brotações: Propágulos com, aproximadamente, 1,0 cm de comprimento, estabelecidas a partir da cultura *in vitro* de gemas axilares, foram utilizadas como fonte de explantes. Os explantes foram cultivados em meio básico, formulação líquida, contendo sais minerais MS (Murashige & Skoog, 1962) e (em mg.L⁻¹) i-inositol (100); tiamina.HCl (0,1); piridoxina.HCl (0,5); ácido nicotínico (0,05), glicina (2,0) em formulação líquida. A esse meio foram adicionadas: concentrações de 2ip (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) em combinação com quatro períodos de subcultivos (30, 60, 90 e 120 dias). O pH dos meios foi ajustado a 5,7. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso com os tratamentos dispostos no esquema fatorial 6 x 4, referentes, 6 concentrações de hormônio 2ip e 4 períodos de subcultivos. Foram utilizadas 9 repetições por tratamento, sendo que cada parcela foi constituída por 1 explantes. Inicialmente, os explantes foram inoculados em frascos de 250 mL de capacidade, contendo 40-ml de meio. No terceiro e quarto subcultivos foram utilizados frascos de 1000 mL. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas com densidade de fluxo de fótons de 32 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 27 \pm 2°C. Em cada período de subcultivo foi determinado o número e a massa fresca das brotações formadas por explante.

A transformação estabilizadora da variância encontrada foi $\sqrt{X+1}$. Os dados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F (P< 0,05). A análise teve continuidade com aplicação de regressão polinomial, com o auxílio dos programas SAS e SISVAR.

Enraizamento das brotações: Foram utilizados como explantes propágulos de abacaxizeiro ornamental desenvolvidos *in vitro*. Os explantes com 1,0–2,0 cm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) com 20 ml de meio básico, 0,7% de ágar, contendo, respectivamente, concentrações de ANA (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹). Após inoculação, as culturas foram mantidas em câmara de crescimento, a 27°C e iluminadas com lâmpadas fluorescentes luz do dia, com fotoperíodo de 16 horas, e densidade de fluxo de fótons de 32 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 30 dias da inoculação foram avaliados a percentagem de propágulos enraizados, número e massa fresca das raízes desenvolvida por explante, altura da planta e massa fresca da parte aérea. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 29 repetições. Cada parcela consistirá de tubo de ensaio inoculado com um explante. Os dados foram submetidos à análise de variância. As diferenças dentre os tratamentos foram identificadas pelo teste de F com $P < 0,05$. A análise teve continuidade e aplicou-se a regressão para verificar a variação das variáveis em função da concentração de ANA.

Resultados e discussão

Proliferação de brotações: Observou-se que a concentração de 2ip afeta significativamente ($P < 0,05$) o número e massa fresca das brotações formadas. Também houve efeito da interação dupla (Tabela 1). A equação que melhor se ajustou para explicar o efeito de 2ip nos diferentes períodos de subcultivos para o número de brotações foi a de segundo grau (Figuras 1 e 2). A proliferação de brotações nos explantes de abacaxizeiro ornamental é dependente de 2ip no meio de cultura. O número de brotações por explante responsivo de tamanho maior que 0,5 cm de comprimento foi pequeno no primeiro período de subcultura (30 dias), em todas as concentrações de 2ip testadas, aumentando-se nos demais períodos de subcultivos. Para os subcultivos de 30, 60, 90 e 120 dias estimou-se que a concentração de $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2ip produziu o máximo de brotações por explante inoculado, respectivamente, 20; 42; 64 e 139 (Figuras 1 e 2). Esses resultados estão em consonância com a importância regulatória da citocinina em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta, tais como divisão celular (Skoog & Miller, 1957), quebra da dominância apical e desenvolvimento das gemas laterais (Sachs & Thimman, 1964), indução e multiplicação de brotações *in vitro* (Murashige, 1974; Gratapaglia & Machado, 1998; Joshi & Dhawan, 2007). O tipo de citocinina e a sua concentração são determinantes no processo de micropropagação (Murashige, 1974; Gratapaglia & Machado, 1998). Em *Ananas* o BAP tem sido preferencialmente usado na proliferação de brotações em explantes de propágulos oriundos da cultura *in vitro* (Matheus *et al.*, 1976; Almeida, 1994; Escalona *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Cruz, 2000; Almeida *et al.*, 2002; Firoozabady & Gutterson, 2003). Neste trabalho a escolha do 2ip foi devido a sua maior atividade biológica comparada com o BAP e a cinetina (Murashige, 1974).

A tendência quadrática também foi constatada para a variável massa fresca de brotações (Figuras 3 e 4), sendo possível inferir, pelas equações de regressão, que o máximo de acúmulo de matéria fresca foi obtido com a concentração de $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ para os períodos de subcultivos de 30, 60, 120 dias, com a produção de, respectivamente, 9, 17, e

77 g de matéria fresca por explante inoculado. Para o período de 90 dias de subcultivo a concentração de $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ de 2ip produziu o total de biomassa de 45 g por explante inoculado.

Enraizamento das brotações: A indução, emergência e alongamento das raízes ocorreram em todos os tratamentos. Em meio sem hormônio os propágulos apresentaram raízes desenvolvendo-se de maneira pontual na extremidade seccionado dos explantes (Figura 5). Em meio com ANA as raízes desenvolveram-se na porção basilar dos propágulos em forma de roseta. Em geral, a auxina é utilizada na fase de enraizamento de propágulos oriundos da cultura *in vitro* de *Ananas* (Teng, 1997; Correia *et al.*, 2000; Praxades *et al.*, 2001; Firoozabady & Gutterson, 2003; Barboza, *et al.*, 2004). Entretanto, o enraizamento pode ser feito em meio sem hormônio (Zepeda & Sagawa, 1981; Kiss *et al.*, 1995). A utilização de uma auxina na fase de enraizamento induz a obtenção de um sistema radicular mais pronunciado que facilitará a fase de aclimação (Figura 5). A tabela 2 apresenta a análise de variância com os quadrados médios e seus respectivos níveis de significância para as variáveis avaliadas. Observou-se que a concentração de ANA afetou significativamente ($P \leq 0,05$) o número de raízes, massa fresca das raízes e da parte aérea. A altura da planta não foi afetada pela concentração de ANA sendo o valor de F não significativo.

Constatou-se uma relação quadrática entre as seguintes variáveis: número de raízes e massa fresca das raízes; massa fresca da parte aérea e a concentração de ANA. As estimativas da proliferação de raízes baseando-se no número de raízes por explante aumentou com a concentração de ANA atingindo um máximo de 11,9 com $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Concentrações acima de $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ tendem a apresentar um efeito inibitório na produção de raízes (Figura 6). Também a massa fresca das raízes aumentou com a concentração de ANA com um máximo de 0,23 g obtida com a concentração de $2,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (Figura 7). Essa tendência foi observada para a massa fresca da parte aérea onde a estimativa máxima da produção de biomassa foi de 0,46 g por explante em meio com $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA (Figura 8). Com relação a altura das plantas não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de ANA e essa variável.

Conclusões

A formulação líquida contendo sais MS, vitaminas, 3% de sacarose e $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2ip produziu uma estimativa média de 139 brotações por explante inoculado no final do quarto período de subcultura (120 dias).

Maior número de raízes adventícias por explante foi estimado com a concentração de 2,2 mg.L⁻¹ de ANA.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, W.A.B. **Efeito da benzilaminopurina nas diferentes fases da propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.)**. 1994. 83p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.296-300, 2002.

BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PexSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.725-733, 2004.

COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. **The pineapple: botany, production, and uses**. New York: CAB International, 2003. 320p.

CORREIA, D.; RIBEIRO, K.A.; ROSSETI, A.G.; SILVEIRA, M.R.S. **Efeito do ácido indol butírico e do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Pesquisa em andamento. Fortaleza: Embrapa Agricultura Tropical, n.66, p.1-3, junho, 2000.

CRUZ, A.R.R. **Micropropagação de oito genótipos de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**. 2000. 69p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília.

- ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLES, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.
- FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, v.21, p.844-850, 2003.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**.v.1. Brasília: Embrapa, 1998. 509p.
- GUERRA, M.P.; DAL-VE스코, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1557-1563, 1999.
- JOSHI, P.; DHAWAN, V. Axillary multiplication of *Swertia chirayita* (Roxb. Ex Fleming) H. Karst., a critical endangered medicinal herb of temperate Himalayas. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.43, p.631-638, 2007.
- KISS, C.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L.C. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v.30, p.127-129, 1995.
- MATHEWS, V.H.; RANGAN, T.S.; NARAYANASWAMY, S. Micropropagation of *Ananas sativus in vitro*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.79, p.450-454, 1976.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p.136-166, 1974.

- PRAXEDES, S.C.; SILVA Jr., A.F.; FIGUEIREDO, F.L.B.; CÂMARA, F.A.; OLIVEIRA, O.F. Estiolamento *in vitro* de abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, v.14, p.13-15, 2001.
- REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, C.A.P. Métodos de propagação. Cap. 5. In: Cunha, G.A.P.; Cabral, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. **O Abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.105-138, 1999.
- SACHS, T.; THIMANN, K.V. Release of lateral buds from apical dominance. **Nature**, v.201, p.939–940, 1964.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- TENG, W.L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**, v.16, p. 454-457, 1997.
- ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. **HortScience**, v.16, p.495, 1981.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para número e massa fresca de brotações de *Ananas comosus* var. *bracteatus*, em função de concentrações de 2ip e períodos de subcultivos⁽¹⁾.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Número de Brotações	Massa fresca das brotações
Concentração de 2ip (Conc2ip)	3	212,86*	72,08*
Subcultivo (Subcult)	3	186,45*	128,14*
Conc2ip x Subcult	9	19,01*	7,47*
Resíduo	128	2,55	0,50
Média		5,36	4,42
CV (%)		29,78	16,11

* – significativo ao nível de 5%

ns – não significativo

¹Valores transformados $\sqrt{X+1}$

Tabela 2. Resumo da análise de variância para a média do número de raízes, massa fresca das raízes, altura da planta e massa fresca da parte aérea a partir de propágulos submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA).

Fonte de variação	GL	QM			
		Número de raízes ⁽¹⁾	Massa Fresca da raiz ⁽¹⁾	Altura da planta	Massa fresca da parte aérea ⁽¹⁾
Tratamento	7	5,54 *	0,02 *	1,39 ns	0,02 *
Resíduo	224	0,4	0,004	0,81	0,004
Total	231				
C.V. (%) =		19,64	5,84	17,38	5,50
Média Geral =		9,93	0,18	5,19	0,40

*Significativo ao nível de 5%

ns- não significativo

⁽¹⁾Valores transformado segundo $\sqrt{X + 1}$

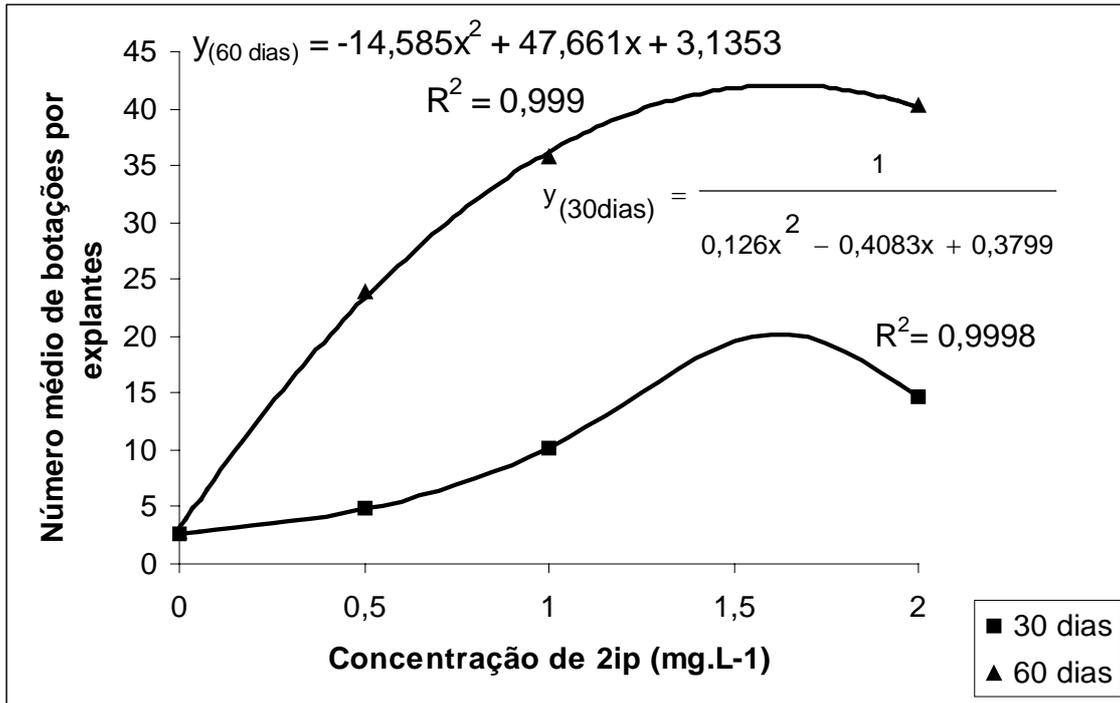


Figura 1. Efeito de concentrações de 2ip na média do número de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 30 e 60 dias.

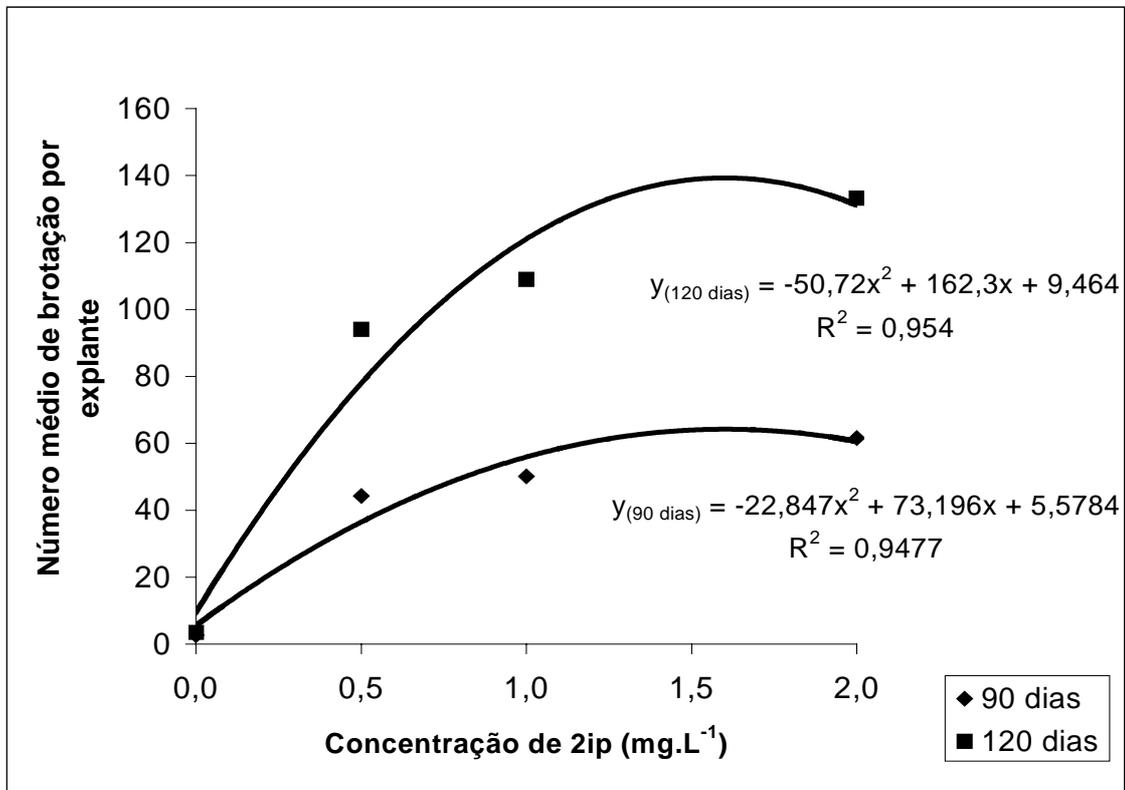


Figura 2. Efeito de concentrações de 2ip na média do número de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 90 e 120 dias.

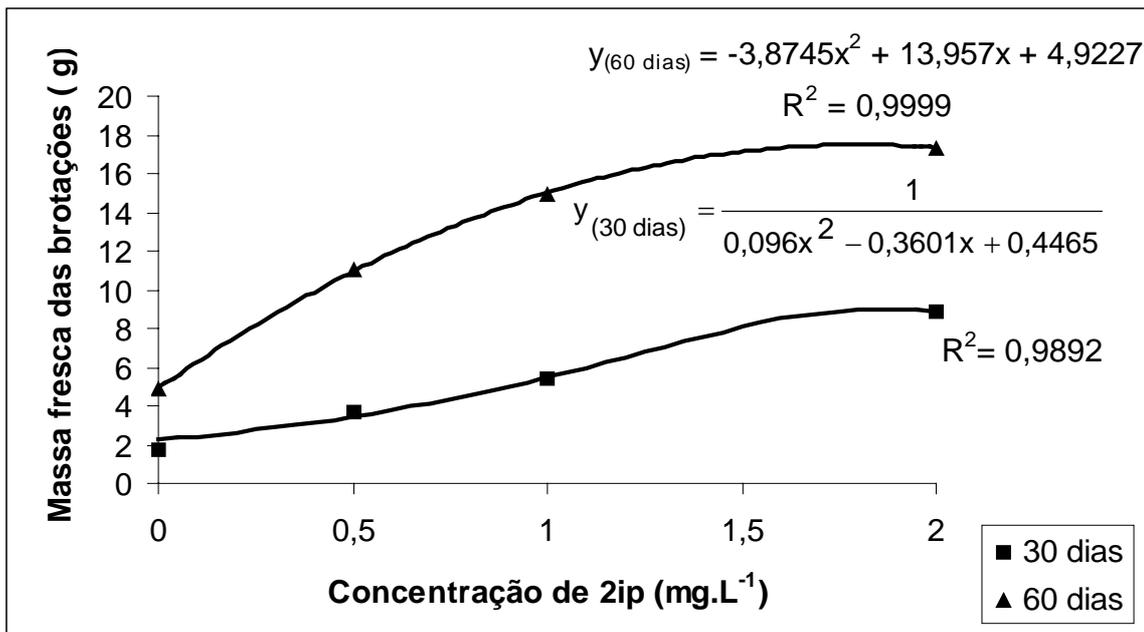


Figura 3. Efeito de concentrações de 2ip na média da massa fresca de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 30 e 60 dias.

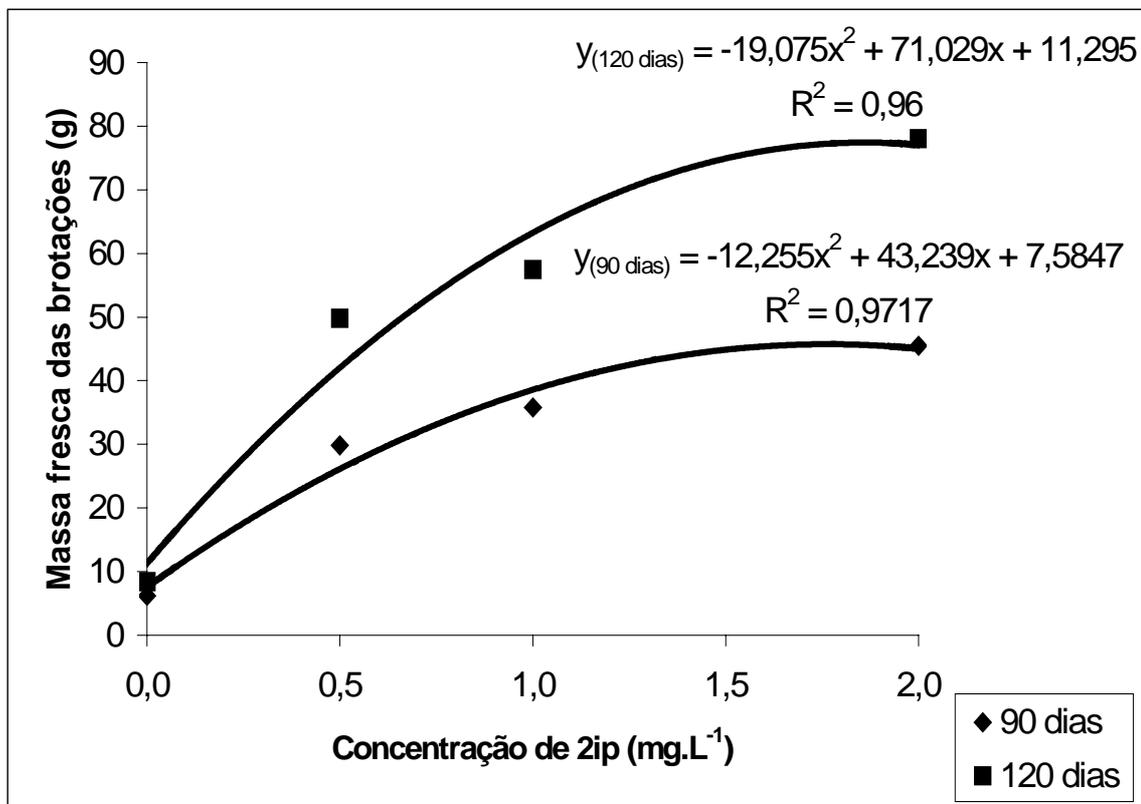


Figura 4. Efeito de concentrações de 2ip na média da massa fresca de brotações por explante nos períodos de subcultivos de 90 e 120 dias.



Figura 5. Brotações enraizadas em meio contendo ANA (0,0; 0,5; 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹) respectivamente, aos 30 dias após a inoculação.

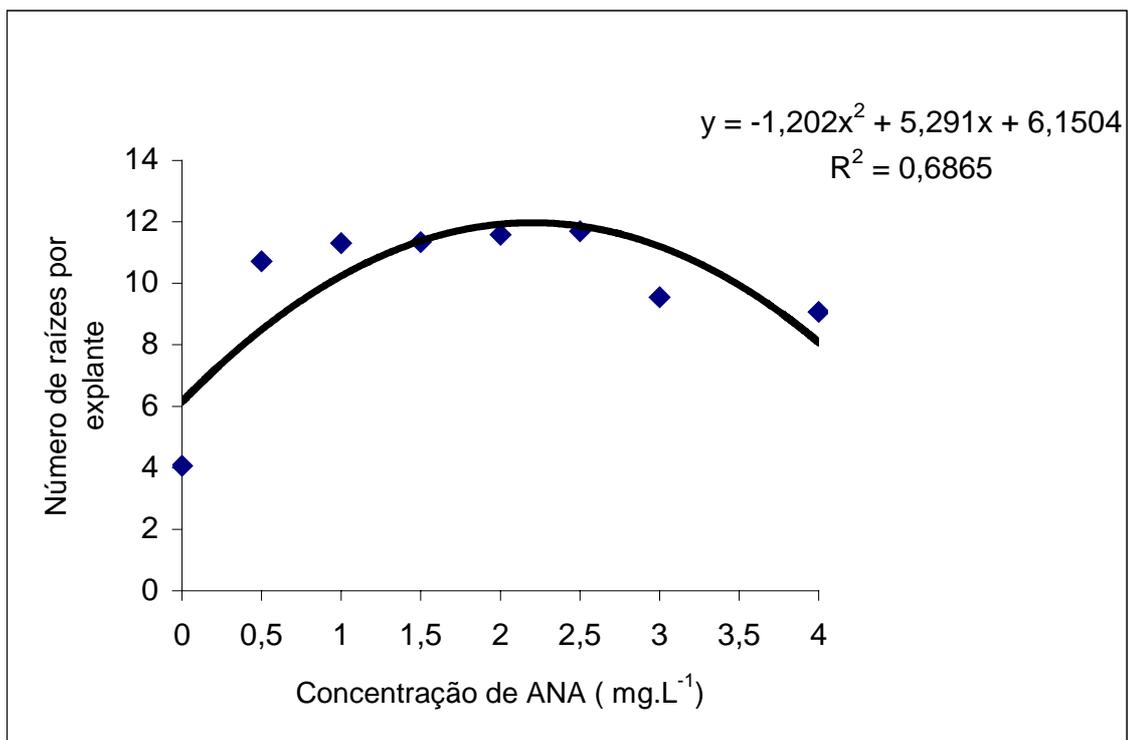


Figura 6. Variação do número de raízes por explante em função da concentração de ANA.

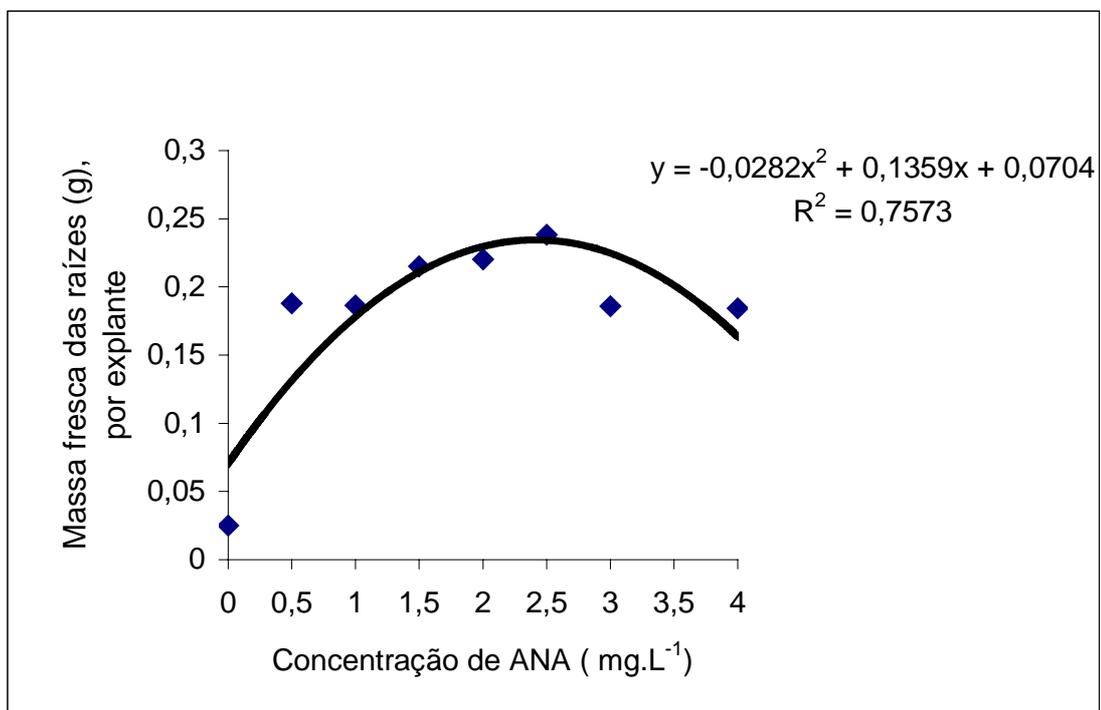


Figura 7. Variação na massa fresca de raízes por explante em função da concentração de ANA.

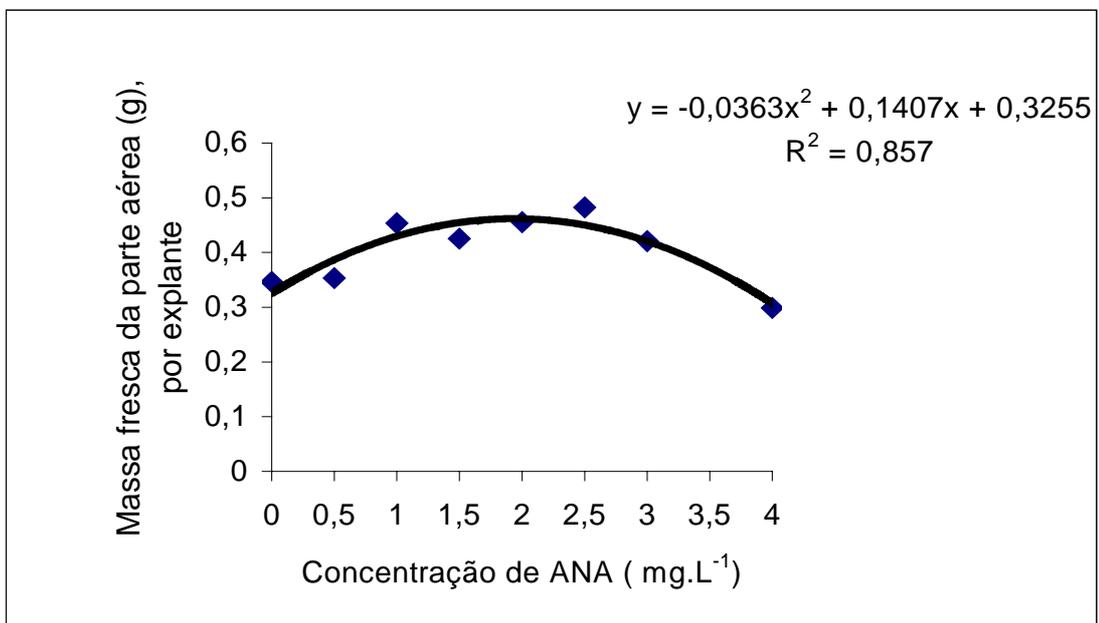


Figura 8. Variação da massa fresca da parte aérea por explante em função da concentração de ANA.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ANATÔMICA DE FOLHAS DE PLANTAS DE ABACAXIZEIRO ORNAMENTAL [*Ananas comosus* *var. bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] PROPAGADAS *IN VITRO*

(Trabalho a ser submetido para publicação na Acta Botânica Brasílica).

**Caracterização morfológica e anatômica de folhas de plantas de
abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley)
Coppens & Leal] propagadas *in vitro***

Maria do Desterro Mendes dos Santos¹, Dalva Graciano-Ribeiro², Antonio Carlos Torres³

^{1,2}Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, C.P. 4.457, CEP 709190-970, Brasília, DF. E-mail: maria@cnph.embrapa.br; dalvagraciano@gmail.com; ³Embrapa Hortaliças, C.P. 218, CEP 70359-970, Brasília, DF. E-mail: torres@cnph.embrapa.br

Resumo

O objetivo desse trabalho foi o de descrever as características morfológicas e anatômicas da folha do abacaxizeiro ornamental micropropagado, visando aplicações no processo de aclimação das plantas provenientes da cultura *in vitro*. A morfologia da folha do abacaxizeiro ornamental consiste da lâmina – parte clorofilada e uma base expandida, não clorofilada. A lâmina apresenta a forma laceolada e formada por uma camada de células epidérmicas, hipoderme, parênquima aquífero, parênquima clorofiliano, idioblastos contendo ráfides e fibras intercalando os feixes vasculares. Na epiderme ocorrem tricomas e escamas. No processo de aclimação *ex vitro*, as tampas dos frascos de cultura foram removidas cinco dias antes de transplântio dos propágulos para casa de vegetação. Os propágulos foram transplântados para uma mistura 1:1 de areia e vermiculita esterilizadas ou para o substrato Plantmax. Foram observadas, em ambas as condições, um bom pegamento das plantas transplântadas (~90%) e bom desenvolvimento posterior.

Termos para indexação: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; morfologia foliar; anatomia foliar; aclimação

Morphological and anatomical characterization of leaves from *in vitro* propagated ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] plants

Abstract

The objective of this work was to provide a description of morphological and anatomical features of micropropagated ornamental pineapple leaf tissue, in order to apply this information in the process of acclimatization of plants produced by *in vitro* culture. The leaf morphology of ornamental pineapple consists of lamina – the part containing chlorophyll and an expanded base without chlorophyll. The blade is lanceolated in shape and formed by a layer of epidermal cells, hypoderm, water-storage parenchyma and parenchyma cells with chlorophyll, raphid idioblasts and fibers intercalating the vascular bundles. Trichomes and scales were observed in the epiderm. In the process of *ex vitro* acclimatization, the lids of the culture flasks were removed five days prior the transfer of the plants to greenhouse conditions. The plantlets were transplanted to either a 1:1 mixture of sterile sand and vermiculate or to Plantmax® substrate. In both conditions the acclimatization was found to be very effective with a surviving rate of 90% and with the plants displaying regular development.

Index terms: *Ananas comosus* var. *bracteatus*; leaf morphology; leaf anatomy; acclimatization

Introdução

O abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal)] é uma planta monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae (Collins, 1960; Reinhardt, 2000; Coppens & Leal, 2003). No Brasil, a família Bromeliaceae destaca-se como um dos principais componentes da flora e da fisionomia dos ecossistemas abrigando, aproximadamente, 40 gêneros e 1200 espécies (Souza & Lorenzi, 2005), distribuídas desde a região Norte até a região Sul, em todos os ecossistemas. A região Sudeste apresenta a maior diversidade de espécies, principalmente, na área da Mata Atlântica (Paula & Silva, 2004). Dentre as espécies cultivadas como flor de corte está o abacaxizeiro ornamental que, atualmente, vem sendo muito apreciado nos mercados nacional e internacional, pela

beleza de sua inflorescência e pelo longo período de conservação após o corte (Souza *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007).

A cultura de tecidos nas espécies do gênero *Ananas* tem sido empregada para a produção de plantas livres de doenças, para aumentar a uniformidade dos propágulos, para multiplicação em larga escala e também no melhoramento genético e no intercâmbio e conservação de germoplasma (Zepeda & Sagawa, 1981; Rangan, 1984; Reinhardt & Cunha, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2001; Costa & Zaffari, 2005). Um dos aspectos importantes na adoção da tecnologia de mudas micropropagadas é a aclimação das plantas oriundas da cultura *in vitro*. A mudança dos propágulos do ambiente *in vitro*, caracterizado pelas condições assépticas, níveis de irradiância baixo ($30-60 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), alta umidade relativa ($\sim 100\%$), baixa transpiração e desenvolvimento heterotrófico para as condições *ex vitro*, predominantemente, não asséptica, níveis de irradiância mais alto, baixa umidade relativa, alta transpiração e desenvolvimento autotrófico podem causar estresse hídrico na planta, comprometendo a sobrevivência das mudas transplantadas (Campostrini & Otoni, 1996; Fidelis *et al.*, 2000). A avaliação das características anatômicas das plantas micropropagadas, aptas para o processo de aclimação, é uma condição necessária para o estabelecimento de um protocolo eficiente de adaptação das mudas, quando transplantadas para condições *ex vitro*.

Dentre os estudos anatômicos em *Ananas* destacam-se os conduzidos por Krauss (1948; 1949) que descrevem a anatomia dos órgãos vegetativos de *A. comosus* var. *comosus*. Barbosa *et al.* (2006) também descreveram a anatomia foliar de plantas micropropagadas dessa espécie como subsídio ao processo de aclimação de plantas. No entanto, nenhum protocolo de aclimação foi sugerido nestes estudos. Na literatura consultada não foram encontrados estudos relacionados à anatomia foliar de *A. comosus* var. *bracteatus*. O objetivo do presente estudo foi o de descrever a morfologia e caracterizar anatomicamente a estrutura foliar do abacaxizeiro ornamental micropropagado, visando as possíveis aplicações na produção comercial de mudas e aclimação das plantas bem como em estudos de anatomia comparativa da organogênese de explantes foliares *in vitro*.

Material e métodos

Para o estudo anatômico usou-se folhas de propágulos oriundos de brotações de abacaxizeiro ornamental estabelecidas *in vitro*, mediante cultura de gemas axilares de mudas tipo coroa. Esses propágulos foram regenerados em meio composto de macro e

micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962) com de 3% de sacarose e, em mg.L⁻¹: inositol, 100; tiamina.HCl, 0,2; ácido nicotínico, 0,05; piridoxina.HCl, 0,05; glicina, 2; 6-benzyladenina, 1,0; e phytigel, 2.000. O pH do meio foi ajustado a 5,7 antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas a temperatura de 27±2 °C e fotoperíodo de 16h, densidade de fluxo de fótons 32 μmol.m⁻².s⁻¹, subcultivadas a cada 30 dias, durante 120 dias.

Para o estudo anatômico foram feitas secções à mão livre, com auxílio de uma lâmina, na região mediana da terceira folha, a contar do ápice para base. As secções obtidas foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,25%, durante 15 minutos e, em seguida, transferidas para solução de hipoclorito de sódio a 1,25%, durante 10 minutos. Após a clarificação, as secções foram lavadas em água destilada, por cinco vezes, e transferidas para série etanólica para total desidratação. Em seguida, os cortes foram submetidos ao processo de dupla coloração com solução de azul alcian/safranina, na proporção 4:1, e montados em lâminas com verniz vitral incolor.

A epiderme foi destacada, manualmente, desidratada em série etanólica, e os cortes obtidos foram submetidos ao processo de coloração com safranina e montados em verniz vitral incolor (Paiva *et al.*, 2006). Para a estimativa da densidade estomática por mm², na face abaxial, utilizou-se 10 folhas. Foi feita a projeção de um campo correspondente a um quadrado de 1mm de lado, calculando-se a média aritmética dos estômatos em 20 campos, de acordo com Albuquerque & Neves (2004). A espessura dos cortes anatômicos foi medida com auxílio de régua micrométrica.

Um total de 200 mudas foram aclimatizadas mediante abertura das tampas dos frascos de cultura, cinco dias antes do transplântio para os substratos, respectivamente, PlantMax e mistura 1:1 de areia e vermiculita autoclavadas. Foi determinada a percentagem de sobrevivência das plantas 15 dias após o transplântio, em condições de casa de vegetação.

Resultados e discussão

Nas condições *in vitro*, as folhas do abacaxizeiro ornamental desenvolvem-se de maneira acrópeta ao longo do caule e consiste de limbo – porção laminar, plana e clorofilada, e da bainha expandida, não clorofilada. A folha apresenta a forma lanceolada, com comprimento variando de 2,5 a 8,0 cm; largura de 0,6 a 1,0 cm (porção central) e espessura de 45 a 65 μ (parte central), sendo classificada como simples, invaginada, alongada, côncava, de base larga e ápice acuminado. Em secção transversal possui a forma

crescente. Essas características, dentre outras, fornece a rigidez da folha do abacaxizeiro (Kraus, 1949). A bainha é a parte basal da folha, que envolve o caule. A sobreposição das bainhas foliares forma a morfologia tipo roseta (Figura 1a). Essa morfologia é mantida com o desenvolvimento da planta *in vivo*, permitindo o acúmulo de água e nutrientes na região central, contribuindo para instalação de uma flora e fauna neste micro-habitat (Paula & Silva, 2004). As folhas mais velhas estão localizadas na base do caule, na parte externa da planta, e as mais novas em direção centrípeta. O limbo apresenta a margem com espinhos espaçados e ascendentes (Figuras 1a), de tamanho e forma variadas. As nervuras são paralelinérveas. A folha é revestida, parcialmente, na face abaxial, por escamas (tricomias peltadas) que lhe confere a tonalidade cinza-prateado. Em plantas desenvolvidas *in vivo* essa tonalidade é mais acentuada. Situação semelhante às apresentadas por Kraus (1948; 1949) em abacaxizeiro comercial e por Souza *et al.* (2007) em abacaxizeiros ornamentais na descrição da morfologia das folhas de plantas desenvolvidas em condições naturais.

Em corte transversal observa-se que o limbo é constituído de epiderme, hipoderme, parênquima aquífero, parênquima clorofiliano, feixes vasculares e fibras (Figura 1b). A epiderme é unisseriada, envolvida por uma camada de cutícula pouco desenvolvida nas faces adaxial e abaxial, entretanto, na região do bordo o espessamento é mais pronunciado. Em vista paradérmica a epiderme apresenta células de formato retangular com paredes longitudinais e transversais sinuosas. Maior sinuosidade foi observada nas paredes longitudinais (Figura 1c). Essa característica é comum no abacaxizeiro comercial e em outras espécies da família Bromeliaceae e pode estar relacionada com a capacidade da planta de se adaptar ao estresse resultante do colapso do tecido de armazenamento de água abaixo da epiderme, em situações de déficit hídrico (Kraus, 1949). A relação entre sinuosidade da parede e condições ambientais de desenvolvimento da plantas tem sido relatada em outros trabalhos. Por exemplo, em *Piper hispidinervium* folhas desenvolvendo em pleno sol apresenta as paredes retas e em plantas mantidas em bosque as paredes são sinuosas (Santiago *et al.*, 2001).

Os estômatos são do tipo tetracíticos, encontram-se restritos à face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática (Figura 1c), com distribuição por toda extensão da epiderme. Os estômatos inserem-se acima do nível das células adjacentes e as células-guardas possuem uma dimensão média de 25 X 21 μm , apresentam crista cuticular externa com câmara subestomática (Figura 1d). A estimativa média do número de estômatos variou de 45 a 52 por mm^2 . Resultados similares foram obtidos por Barbosa *et*

al. (2006) em plantas de *A. comosus* var. *comosus*, mantidas *in vitro* que apresentaram uma média de 54 estômatos por mm², enquanto em folhas de plantas desenvolvendo em casa de vegetação esse número foi de 62 estômatos por mm². Em abacaxizeiro comercial, desenvolvendo em condições naturais, o número de estômatos, na porção central de uma folha desenvolvida é em média de 75 por mm², esse número varia com a posição na folha (Kraus, 1949).

Como anexos epidérmicos ocorrem tricomas filiformes e peltados (escamas). O tricoma filiforme é pluricelular e não ramificado, presentes em ambas as faces da epiderme (Figura 1e). Esse tipo de estrutura também ocorre em plântula jovem de abacaxizeiro comercial, não sendo encontrada em plantas adultas, conforme observado por Kraus (1949). Barbosa *et al.* (2006) relatam a presença de tricoma glandular em folhas de propágulos de abacaxizeiro regeneradas *in vitro* e, em folhas de planta desenvolvendo *ex vitro*. Entretanto, a ilustração apresentada no trabalho não corresponde ao tricoma glandular. De acordo com a descrição de Kraus (1949, p.387) a denominação tricoma glandular não adequada para se referir a essa estrutura nas espécies da família Bromeliaceae.

As escamas, compostas normalmente, de pedículo e escudo, revestem parcialmente, a face abaxial da folha podendo ser encontradas na face adaxial. O escudo é formado por um anel periférico de células mortas (Figura 1f). O pedículo é uma pequena coluna de células vivas que une o tecido da folha com o escudo (Figura 2a) e, através dessa estrutura a água e os nutrientes penetram nos tecidos foliares da planta. Em vista frontal, evidencia-se apenas o escudo das escamas epidérmicas (Figura 1f), com dimensão se 142 X 178 µm. Observação semelhante foi relatada por Kraus (1949) em *Ananas comosus* var. *comosus* que atribuiu às escamas as funções de absorção de água e proteção da folha contra transpiração excessiva, por formarem um indumento de proteção sobre os estômatos. Tomlinson (1969) acrescenta que as escamas podem absorver sais minerais e proteger a planta contra insolação. Outras funções das escamas incluem proteção contra predadores e patógenos, e atração de polinizadores e dispersores, por formarem um denso indumento sobre inflorescências e frutos, que reflete a luz e secretarem enzimas digestivas (Benzing, 2000).

Em secção transversal da lâmina foliar nota-se a hipoderme em ambas as faces, constituída por uma camada de células aclorofiladas com dimensões maiores que as células epidérmicas, apresentando a forma poligonal (Figura 1b), estando aderida à epiderme. Kraus (1949) relata que a hipoderme tem duas funções: mecânica (rigidez e reforço) para a

folha longa e estreita; e proteção contra a perda de água. Na família Bromeliaceae esse tecido está relacionado ao armazenamento de água e, nas epífitas com metabolismo ácido crassuláceo, tem função na economia de calor (Madison, 1977). Para Tomlinson (1969) essas sinuosidades e a forma de aderência da epiderme à camada externa da hipoderme constituem adaptações que mantêm as camadas superficiais unidas, durante possíveis expansões e contrações celulares, às mudanças de variação de turgor do ambiente.

O mesofilo é heterogêneo na região central do limbo e homogêneo na região do bordo foliar. Na região central o mesofilo da face adaxial é constituído de parênquima aquífero, caracterizado por células translúcidas e grandes, arredondadas com paredes delgadas (Figura 2b) e, na face abaxial, de parênquima clorofiliano, constituído por células pequenas e arredondadas com formato regular (Figura 2b). Da região central para o bordo foliar ocorre diminuição gradual do tamanho e número de camadas do parênquima aquífero, até observar um mesofilo completamente homogêneo, constituído de parênquima clorofiliano (Figura 2c). O parênquima clorofiliano é constituído de 5-10 camadas de células no eixo central do limbo e diminui o número de camadas a medida que se aproxima do bordo da folha.

Foram observados idioblastos com ráfides distribuídos no mesofilo (Figura 2d). Em Bromeliaceae esta característica está relacionada a necessidade de neutralização do ácido oxálico produzido pelas folhas (Brighina, 1984).

Observam-se feixes de fibras distribuídos em todo o mesofilo e ao redor dos feixes vasculares (Figuras 1b,d). Os feixes vasculares são colaterais (Figuras 1b,d,2e), posicionados no parênquima clorofiliano, apresentando tamanhos diferentes que se alternam. O xilema e o floema estão guarnecidos por um conjunto de células esclerenquimáticas, em forma de duas calotas de fibras, mais volumosas na porção xilemática (Figuras 1b,d,2e). O conjunto feixe vascular e fibras está envolvido por uma bainha de células parenquimáticas, de forma poligonal com tamanhos variados (figura 2e). Grãos de amido ocorrem nas células do mesofilo de folhas jovens, próximo ao ápice caulinar e no caule. Esse é um aspecto a ser considerado para a sobrevivência das plantas quando transferida para condições *in vivo*, principalmente, nas primeiras semanas, conforme relatado por Wardle *et al.* (1979). Lamhamedi *et al.* (2003) mostraram que propágulos de *Picea glauca* aclimatizados apresentavam maior quantidade de amido do que propágulos não aclimatizados, após transferidos para condições *ex vitro*, provavelmente como resultado de sua grande capacidade fotossintética.

A análise das folhas estudadas mostrou caracteres anatômicos (hipoderme, idioblastos com ráfides, parênquima aquífero e amido) e morfológicos que podem ser interpretados como estratégias de adaptação da planta a ambientes com déficit hídrico. Assim sendo, considera-se o abacaxizeiro ornamental de natureza xerofítica, concordando com o observado em várias espécies da família Bromeliaceae (Pittendrigh, 1948; Kraus, 1949; Segerin & Scatena 2004; Barbosa *et al.*, 2006). Essas características xerofíticas podem estar relacionadas a alta percentagem de sobrevivência dos propágulos quando transplantados da condição *in vitro* para *ex vitro*, facilitando o processo de aclimação.

A pré-aclimação consistiu na remoção progressiva das tampas dos frascos de cultura, contendo as plantas enraizadas *in vitro*, cinco dias antes do transplante para casa de vegetação, permitindo a troca gasosa, gradual, das plantas com o ambiente, e uma melhor adaptação dos estômatos (pré-aclimação). Essa estratégia proporcionou 90% de sobrevivência dos propágulos quando transplantados para tubetes ou bandejas contendo o substrato Plantmax ou mistura 1:1 de areia e vermiculita. Propágulos que não foram pré-aclimatados apresentaram uma percentagem de sobrevivência de 70%, após o transplante, com desenvolvimento inicial lento quando comparado com propágulos que foram pré-aclimatados antes de serem transferidos para casa de vegetação..

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

Referências bibliográficas

- ALBUQUERQUE, C.V.; CÂMARA, T.R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v.57, p.363-366, 2000.
- ALBUQUERQUE, E.S.B. DE; NEVES, L. DE J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasília**, v.18 p.109-121, 2004
- BARBOSA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.185-194, 2006.

- BENZING, D.H. **Bromeliaceae**: profile of an adaptative radiation. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690p.
- BRIGHIGNA, L.; FIORDI, A.; PALANDRI, M.R. Structural characteristics of mesophyll in some *Tillandsia* species. **Phytomorphology**, v.34, p.191-200, 1984.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP Notícias**, n.25, p.2-12, 1996.
- COLLINS, J.L. **The Pineapple**: botany, cultivation, and utilization. London: Leonard Hill, 1960. 294p.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G (Eds). **The Pineapple**: botany, production and uses. New York: CAB International, 2003. 320p.
- COSTA, T. da; ZAFFARI, G.R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Schultz) cv. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.109-113, 2005.
- FIDELIS, I.; CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.327-336, 2000.
- GUERRA, M.P.; DAL VESVO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1557-1563, 1999.
- KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. I. Introduction, organography, the stem, and the lateral branch or axillary buds. **Botanical Gazette**, v.110, p.159-207, 1948.
- KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. II. The leaf. **Botanical Gazette**, v.110, p.333-404, 1949.

- LAMHAMEDI, M.; CHAMBERLAND, H.; TREMBLAY, F.M. Epidermal transpiration, ultrastructure characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. **Physiologia Plantarum**, v.118, p.554-561, 2003.
- MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**, v.2, p.1-13, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PAIVA, J.G.A.; FANK-DE-CARVALHO, S.M.; MAGALHÃES, M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500[®]: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, p.257-264, 2006.
- PAULA, C.C.; SILVA, H.M.P. **Cultivo prático de bromélia**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 106p.
- PITTENDRIGH, C.S. The bromeliad-anopheles-malaria complex in Trinidad. I - The bromeliad flora. **Evolution**, v.2, p.58-89, 1948
- RANGAN, T.S. Pineapple. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Eds). **Handbook of plant cell culture**. v.3. New York: MacMillan Publishing Company, 1984. p. 373-381.
- REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, C.A.P. Métodos de propagação. Cap. 5. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.105-138, 1999.
- REINHARDT, D. H. A planta e o seu ciclo. In: REINHARDT, D.H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. (Org). **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77p. (Frutas do Brasil 7).

- SANTIAGO, E.J.A.; PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M.; LAMEIRA, O.A.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; GAVILANES, M.L. Aspectos da anatomia foliar de pimenta-longa (*Piper hispidinerviun* C.D.C.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.1035-1042, 2001.
- SOUZA; V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum, 2005, p.162-166.
- SOUZA, F. V.; SEREJO, J. A. S.; CABRAL, J. R. S. Beleza Rara. **Cultivar**, Pelotas, v.5, p.06-08, 2004.
- SOUZA, F.V.D.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, E.H.; SANTOS, O.S.N.; SANTOS-SEREJO, J.A.; FERREIRA, F.R. Caracterização morfológica de abacaxizeiros ornamentais. **Magistra**, v.19, p.319-325, 2007.
- TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. **Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação**. Documentos 70. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 26p., 2001.
- TOMLINSON, P.B. Commelinales – Zingiberales. In: METCALFE, C.R. (Ed). **Anatomy of the monocotyledons**. v.3. Oxford: Clarendon Press, 1969.
- WARDLE, K.; QUINIAN, A. ; SIMPKINS, I. Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleraceae* L. var. *botrytis* regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, v.43, p.745-752, 1979.
- ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. **HortScience**, v.16, p.495, 1981.



Figura: 1. Morfologia da planta e cortes histológicos da folha de abacaxizeiro ornamental micropropagado. a) Planta desenvolvida *in vitro*; b) corte transversal da folha mostrando a epiderme, hipoderme, parênquimas aquífero e clorofiliano, feixes vasculares e fibras (barra = 50 μm); c) vista paradérmica da epiderme mostrando células com paredes onduladas e estômatos tetracíticos com células guardas (barra = 25 μm); d) corte transversal mostrando feixes vasculares, fibras, estômato e câmara subestomática (seta) (barra = 25 μm); e) tricoma filiforme pluricelular (barra = 50 μm); f) vista frontal das escamas epidérmicas assimétricas, mostrando os escudos (barra = 25 μm).

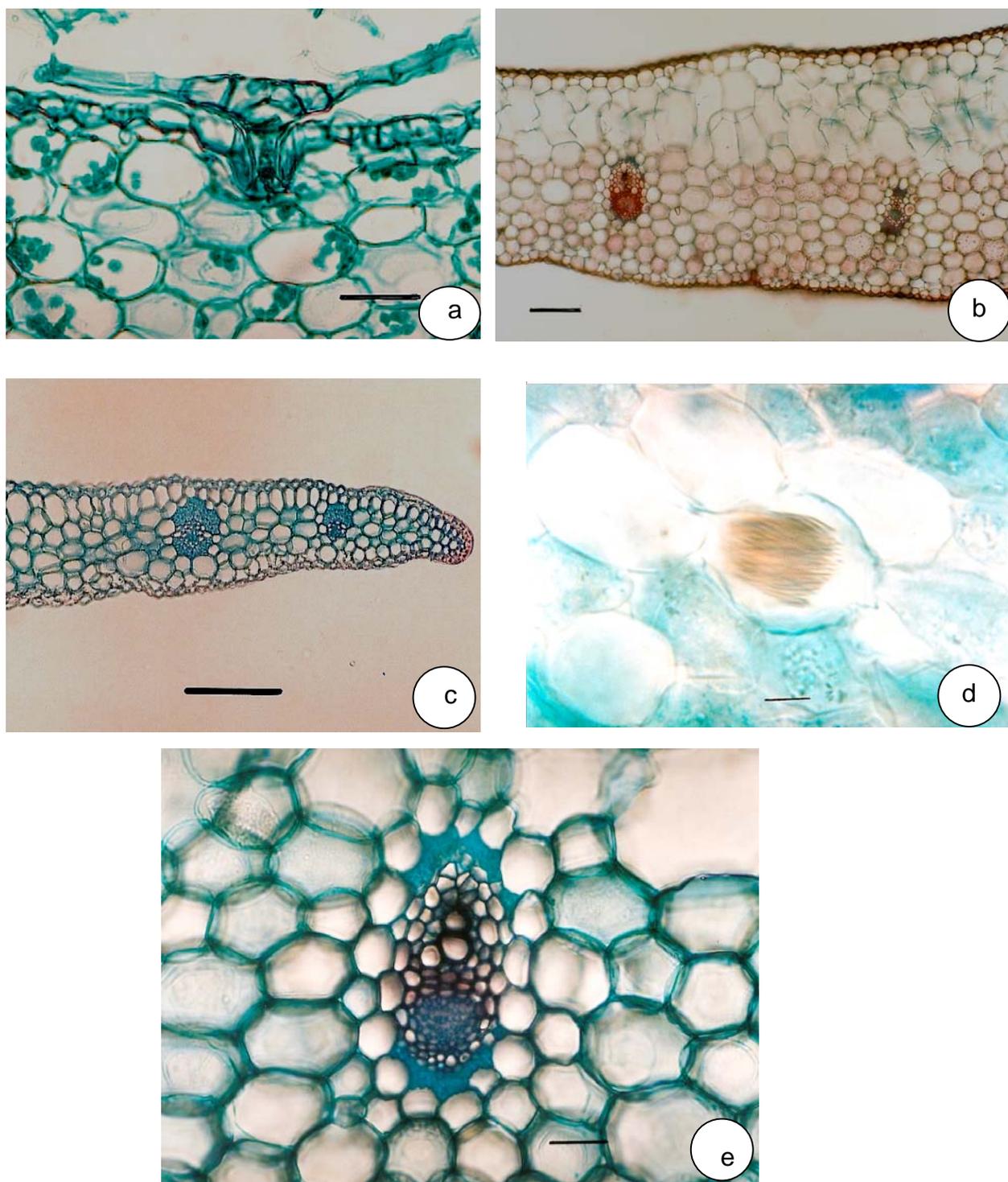


Figura 2. Cortes histológicos da folha de plantas de abacaxizeiro ornamental desenvolvidas *in vitro*. a) Corte transversal da folha mostrando escama peltada com pedículo (barra = 25 μm); b) corte transversal da folha mostrando distribuição do parênquima aquíífero e clorofiliano (barra=100 μm); c) corte transversal da folha mostrando mesofilo homogêneo na região do bordo foliar (barra = 100 μm); d) idioblasto com ráfides (barra = 10 μm); e) corte transversal mostrando detalhe do feixe vascular e fibras, circundado por células parenquimáticas (barra = 25 μm).

ANEXOS

No início dos trabalhos foi conduzido experimento para selecionar o meio para o estabelecimento das culturas *in vitro* de *Ananas comosus* var. *bracteatus*. Os dados referentes a esse experimento e outro de anatomia do desenvolvimento de nódulos não estão no corpo principal da dissertação e estão nessa secção com uma breve descrição da metodologia e dos resultados.

ANEXO 1 - Estabelecimento da cultura *in vitro* de gemas axilares do *Ananas comosus* var. *bracteatus*

Foram utilizados como fonte de explantes mudas provenientes da coroa de plantas de abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*), desenvolvidas no campo com, aproximadamente, um ano de idade. As mudas de coroa foram desfolhadas (Figura 1a) e as gemas removidas com auxílio de pinça e bisturi (Figura 1b) e, colocadas em placa de Petri, contendo papel de filtro umedecido. As gemas foram lavadas em água corrente e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1,0%, contendo 300 µl de Tween 80 por 100 ml de solução, durante 20 minutos. Em capela de fluxo laminar as gemas foram submetidas a três lavagens sucessivas com água destilada autoclavada. Inicialmente, as gemas foram inoculadas em frasco de 100 ml de capacidade com 12 ml de meio básico, contendo sais minerais MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose, 0,2% de phytigel e, em mg.L⁻¹: i-inositol, 100; tiamina.HCl, 0,2; ácido nicotínico, 0,05; piridoxina.HCl, 0,05 e glicina, 2,0. A esse meio foram adicionados, respectivamente: a) 1,75 mg.L⁻¹ de AIB, 1,75 mg.L⁻¹ de ANA e 150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico (Murashige, 1974); b) 1 mg.L⁻¹ de BA e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA (Borges *et al.*, 2003); c) 0,56 mg.L⁻¹ de BA e 0,11 mg.L⁻¹ de ANA (Teixeira *et al.*, 2001); e d) 1 mg.L⁻¹ de BA, 2 mg.L⁻¹ de GA₃ e 0,01 mg.L⁻¹ de ANA. O pH dos respectivos meios de cultura foi ajustado a 5,7 ± 0,1, conforme recomendado para os trabalhos de cultura de tecidos de plantas.

Após inoculação, as culturas foram mantidas em câmara de crescimento, a 27°C e iluminadas com lâmpadas fluorescentes luz do dia, com fotoperíodo de 16 horas, e densidade de fluxo de fótons de 32 µmol.m⁻².s⁻¹. As culturas foram subcultivadas a cada 30

dias para meio de mesma composição, por um período de 90 dias. Após, foi avaliada a porcentagem de brotações formadas por tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 50 repetições. Cada parcela consistiu de um frasco inoculado com um explante.

Observou-se que a maior porcentagem de brotações, acima de 1,0 cm de comprimento, foi obtida em meio básico suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP, 2 mg.L⁻¹ de GA₃ e 0,01 mg.L⁻¹ de ANA. Nesse meio 58% dos explantes desenvolveram *in vitro* (Tabela 1). Esse meio foi escolhido para os trabalhos de estabelecimento *in vitro*. A estimativa do intervalo de confiança denota que na repetição dessa população em 95% dos casos a média estará entre os valores (39-76). Os meios propostos por Borges *et al.* (2003) e Teixeira *et al.* (2001) propiciaram, respectivamente, 26 e 20% de explantes desenvolvidos. A Figura 2 mostra o desenvolvimento das gemas nos respectivos meios de cultura. Não houve desenvolvimento de brotações em meio básico com 1,75 mg.L⁻¹ de AIB, 1,75 mg.L⁻¹ de ANA e 150 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, conforme proposto por Murashige (1974), para propagação de bromélias.

Referências bibliográficas

- BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A.G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.9, p.37-44, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. **Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação**. Documentos 70. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 26p.



Figura 1. (a) Fonte de explante do abacaxizeiro ornamental; (b) explante utilizado para estabelecimento das culturas *in vitro*.

Tabela 1. Efeito de diferentes meios de cultura na percentagem de explantes desenvolvidos de abacaxizeiro ornamental.

Suplementação do meio básico	Número de explantes inoculados	Percentagem de explantes desenvolvidos
1 mg.L ⁻¹ de BAP, 2 mg.L ⁻¹ de GA ₃ e 0,01 mg.L ⁻¹ de ANA	50	58 (39-76)*
1 mg.L ⁻¹ de BA e 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA	50	26 (12-45)
0, 56 mg.L ⁻¹ de BA e 0, 1 mg.L ⁻¹ de ANA	50	20 (8-38)
1,75 mg.L ⁻¹ de AIB, 1,75 mg.L ⁻¹ de ANA e 150 mg.L ⁻¹ de ácido cítrico	50	0)

*Números em parêntesis denota 95% de intervalo de confiança



Figura 2. Brotações desenvolvidas *in vitro* em abacaxizeiro ornamental a partir de gemas axilares inoculadas em diferentes meios de cultura, conforme ilustrado.

ANEXO 2 – Indução de nódulos e diferenciação de brotações adventícias de explantes foliares do *Ananas comosus* var. *bracteatus* *in vitro*

Folhas de brotações desenvolvidas *in vitro* em meio líquido, contendo sais minerais MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose e, em mg.L⁻¹: i-inositol, 100; tiamina.HCl, 0,2; ácido nicotínico, 0,05; piridoxina.HCl, 0,05, glicina, 2,0, e benzilaminopurina, 1,0, foram utilizadas como explantes. Os explantes foram inoculados em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo em meio básico composto de sais minerais MS, suplementado com 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel, e, em mg/L: mio-inositol, 100; tiamina.HCl, 0,1; ácido nicotínico, 0,5; piridoxina.HCl, 0,5; glicina 2,0; e TDZ 0,05. A esse meio foram adicionadas concentrações de picloran (0; 0,0625; 0,125; 2,5 e 5 mg/L). O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Cada repetição consistiu de uma placa de Petri com 10 explantes. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, no escuro à temperatura de 27°C, por 30 dias. Após esse período, para indução de brotações, as culturas foram subcultivadas para meio contendo sais minerais MS, mistura orgânica de White, 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel e 1,0 mg/L de BAP, mantidas sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 32µmol.m⁻².s⁻¹.

Para o estudo anatômico as folhas contendo os calos foram fixados em FAA₇₀ (formol: ácido acético glacial: etanol 70%, 5:5:90 v/v), por 24 horas. Em seguida foram desidratados progressivamente em série etanólica e incluídos em parafina a 60° C segundo Kraus & Arduin,1977, com algumas modificações. O processo de desidratação foi feito a vácuo para retirada de ar existente no material. Em seguida, foram incluídos em parafina.

Cortes histológicos longitudinais e transversais, com seções de 10µm, foram obtidos por meio de micrótomo rotativo Leica, modelo RM 2145. Os cortes foram distendidos em placa histológica a 42°C e aderidos em lâminas com adesivo Haupt (Kraus & Arduin, 1997), desparafinizados e corados com dupla coloração safranina-fastgreen 1%. A montagem final foi feita com Entellan, conforme técnicas habituais.

Fotomicrografias foram obtidas através de um microscópio ótico Zeiss, modelo Axioskop, com câmera Zeiss, modelo MC 80 DX, acoplada ao microscópio.

Nódulos foram obtidos em todas as concentrações de picloran testadas. Inicialmente os nódulos diferenciaram-se na porção basal abaxial das folhas, e posteriormente na porção adaxial (Figura 1 a,b,c,d,e). Em meio sem picloran não ocorreu a diferenciação de nódulos. Em meio suplementado com Picloran nas concentrações de 0,625 e 1,25 mg.L⁻¹ observou-

se formação de brotações a partir de nódulos (Figura 1 a,b). A transferência de módulos e calos para meio com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP propiciou a diferenciação e crescimento de brotações (Figura 1f).

Referências bibliográficas

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural, 1997. 198p.

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

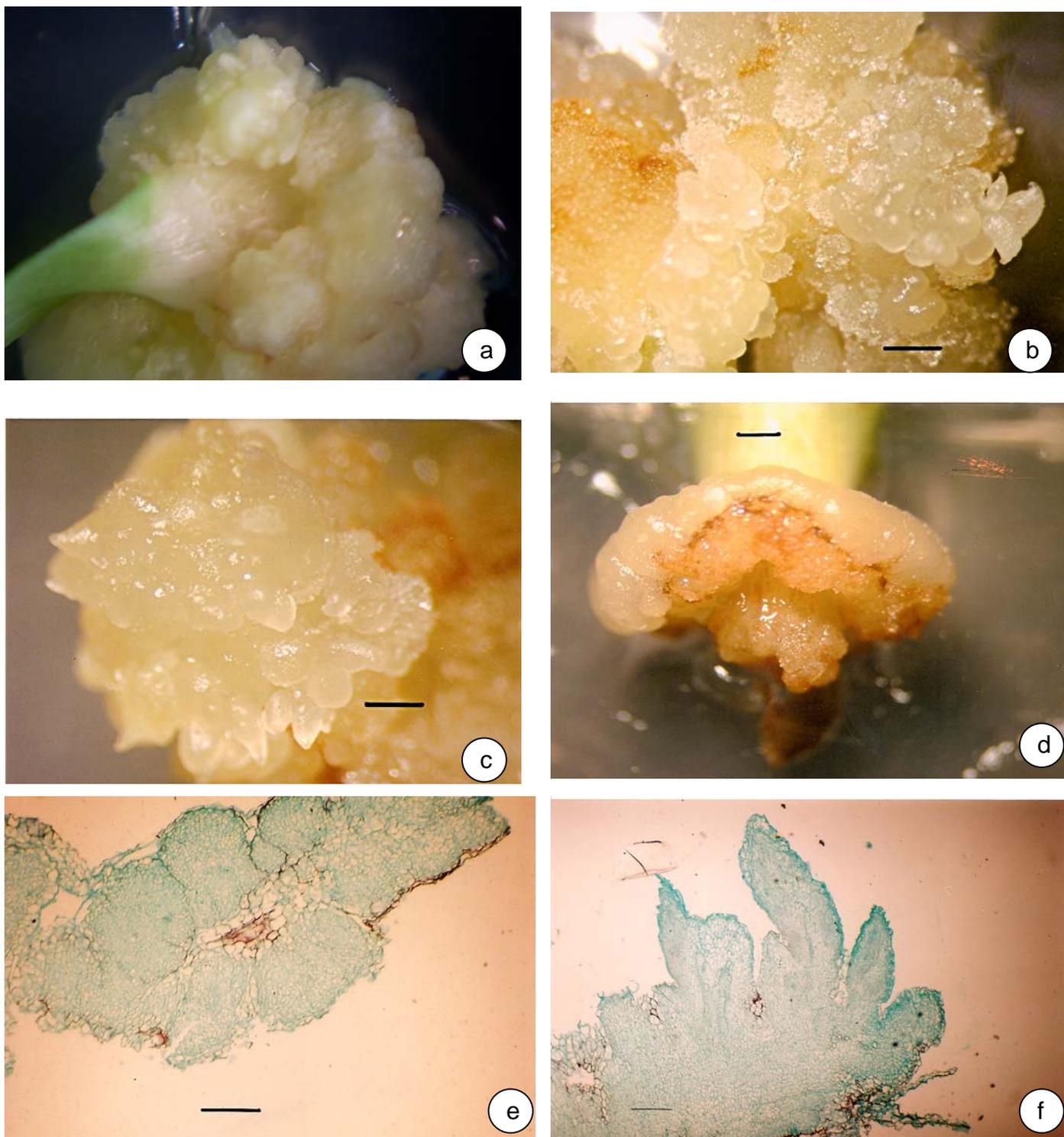


Figura 1. Diferenciação de calo e nódulos na base da folha de *A. comosus* var. *bracteatus* em meio suplementado com picloran; a) 0,0625 mg.L⁻¹; b) 0,125 mg.L⁻¹; c) 2,5; d) 5,0 mg.L⁻¹; corte transversal em calo de *A. comosus* var. *bracteatus* mostrando a formação de calo e nódulos na base da folha em meio com 2,5 mg.L⁻¹ de picloran; e) corte transversal na base da folha em cultura mostrando formação de nódulos; f) diferenciação de brotações de nódulos em meio suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.