

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MICROPROPAGAÇÃO E VIABILIDADE DE REGENERAÇÃO DE
VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXI CONSERVADAS *IN*
*VITRO***

MARTA TALUANA SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO 2008**

**MICROPROPAGAÇÃO E VIABILIDADE DE REGENERAÇÃO DE
VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXI CONSERVADAS *IN*
*VITRO***

MARTA TALUANA SANTOS

Engenheira Agrônoma

Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 2005.

Dissertação submetida à Câmara de Pesquisa e Ensino de Pós-Graduação e da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Co-orientadora: Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Marta Taluana
Micropropagação e viabilidade de regeneração de variedades silvestres de abacaxi conservadas *in vitro* / Marta Taluana Santos. - Cruz das Almas, BA, 2008.
57 f.: il. tab. ; graf.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo.
Co-Orientadora: Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2008.

1. Abacaxi – conservação *in vitro* 2. Abacaxi – micropropagação 3. Abacaxi – cultura de tecidos. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais. I. Título

CDD 20.ed. 634.774

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DA ALUNA MARTA TALUANA SANTOS**

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Dr^a. Janay Almeida dos Santos-Serejo
EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura Tropical

Dissertação homologada pelo Colegiado do programa de pós-graduação em
Ciências Agrárias em.....
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

MENSAGEM

“Se os seus sonhos são pequenos, sua visão será pequena, suas metas serão limitadas, seus alvos serão diminutos, sua estrada será estreita, sua capacidade de suportar as tormentas será frágil.”

Augusto Cury

Á minha mãe Maria Angélica. Obrigada por todo apoio que deu a minha vida, e por incentivar-me a nunca desistir de meus sonhos.

Aos meus irmãos Rita, Jane, Rejane, Sérgio, Lindomar, Zé e Lazaro sobrinhos, cunhados e amigos que colaboraram com compreensão, amor e carinho nesta jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ajudar muito nos momentos difíceis, me dando força e fé para superar as dificuldades, e por iluminar meus caminhos, aos meus familiares que contribuíram para o meu sucesso e que me forneceram estímulo constante para perseverar.

À Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza e ao Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo pelas orientações, paciência e disponibilidade em me guiar pelas etapas de realização deste trabalho.

À Dr^a. Janay Almeida dos Santos-Serejo e a Prof^a.Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa pela contribuição e ensinamento.

À professora Isabel Câmara pela amizade, generosidade, incentivo e disponibilidade em me ajudar sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos em especial Meire, Honorato, Pablo, aos estagiários de graduação e ao funcionário do campo seu Cata pela amizade apoio e agradável convivência.

À meu amigo Juraci Costa pelos momentos de alegrias e dificuldades, sempre ao meu lado me dando aconchego e carinho.

Às minhas amigas Renata, Adriana, Taliane, Edilene, Gal, Cristiane e Ádila por sempre me ouvirem dando força e apoio nos momentos difíceis.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e aos professores da área de fitotecnia pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado, a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo apoio e suporte e a CAPES, pela bolsa a mim concedida.

A todos, muito obrigada! Os momentos serão lembrados com muito carinho, amizade e gratidão.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 1	
CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE GENÓTIPOS SILVESTRES DE ABACAXI.....	10
Capítulo 2	
MICROPROPAGAÇÃO DE GENÓTIPOS SILVESTRES DE ABACAXI APÓS CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48

MICROPROPAGAÇÃO E VIABILIDADE DE REGENERAÇÃO DE VARIEDADES SILVESTRES DE ABACAXI CONSERVADAS *IN VITRO*

Autora: Marta Taluana Santos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO - O Brasil é o centro de origem e dispersão do abacaxi, abrigando uma importante diversidade genética, incluindo formas silvestres e cultivadas. Essa variabilidade é fundamental, tanto para os programas de melhoramento genético, quanto para a conservação do germoplasma. Por outro lado, parte do êxito nos programas de melhoramento depende muito da eficiência na propagação dos materiais usados como parentais ou dos selecionados. Dessa forma são importantes, tanto o estabelecimento de protocolos de propagação eficientes de variedades silvestres, como ações de conservação de germoplasma. A micropropagação e a conservação *in vitro* são técnicas de cultura de tecidos com potencial para dar suporte tanto ao melhoramento genético quanto à conservação de germoplasma. Em vista disso o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência do cultivo de segmentos nodais de genótipos da variedade silvestre *Ananas comosus var. ananassoide* com vistas à micropropagação e conservação *in vitro*, e avaliar a viabilidade e a posterior taxa de multiplicação de diferentes genótipos de *Ananas comosus var. comosus* conservados *in vitro*. Os resultados obtidos de dez genótipos de abacaxi *Ananas comosus var. ananassoide* (25, 203, 205, 206, 207, 232, 233, 465, 472 e 772) mostraram a eficiência no uso de segmentos nodais para incrementar a micropropagação de genótipos silvestres, sendo que dos dez avaliados o 203 foi o que apresentou o melhor desempenho, tanto na formação de segmentos nodais, como na regeneração de plantas. Já a viabilidade dos acessos conservados após um período de quatro meses a um ano de incubação sob condições de crescimento mínimo mostrou que a relação entre o tempo de conservação e o estado fisiológico da planta é resultado de um forte componente genético associado às condições de cultivo estabelecidas para a conservação *in vitro*.

Palavras-chave: *Ananas comosus* (L.) Merrill, cultura de tecidos, conservação de germoplasma.

MICROPROPAGAÇÃO AND VIABILITY OF REGENERATION OF VARIETIES OF WILD PINEAPPLE CONSERVATION *IN VITRO*

ABSTRACT

Author: Marta Taluana Santos

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Brasil is the Center of origin and dispersion of pineapple and has an important genetic diversity considering wild and cultivated species. This variability is fundamental both the breeding program and for the germplasm conservation. However the success of genetic breeding programs depends of an efficient micropropagation protocol of used genotypes like parentals or selected hybrids. So, is very important the establishment of efficient protocols of propagation of wild varieties and the germplasm conservation. The micropropagation and the *in vitro* conservation are techniques from tissue culture with potential to give support to the genetic breeding program and germplasm conservation. The aim of this work was to evaluate the efficiency of nodal segments culture from genotypes of wild variety of *Ananas comosus* var. *ananassoides* with the purpose of micropropagation and *in vitro* conservation and the evaluation of the viability and multiplication rates from different genotypes of *Ananas comosus* var. *comosus* under *in vitro* conservation. The results of ten genotypes of pineapple *Ananas comosus* var. *ananassoide* (25, 203, 205, 206, 207, 232, 233, 465, 472 and 772) showed the efficiency in the use of segments nodal to improve the multiplication rates in wild genotypes and that the ten evaluated the 203 was what made the better performance, both in the training of nodal segments, as in the regeneration of plants. Already the viability of genotypes conservation after a period of four months to one year of incubation under conditions of minimum growth showed that the relation between the time of conservation and the physiological state of the plant is the result of a strong genetic compound associated with the conditions of cultivation set for conservation *in vitro*.

Key-words: *Ananas comosus* (L.) Merrill, tissue culture, germplasm conservation

INTRODUÇÃO

O abacaxi é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, da família Bromeliaceae, que se compõe de um caule curto e grosso ao redor do qual crescem as folhas em forma de calhas estreitas e rígidas, e no qual também se inserem raízes axilares. O gênero *Ananas* é o mais importante da família, pois nele estão incluídas as espécies comestíveis de abacaxi, pertencentes à variedade botânica *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill, assim como outras, usadas para produção de fibras (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) ou para ornamentação de grande beleza, rusticidade e, acima de tudo originais.

Dentre os abacaxis ornamentais já explorados está, o “abacaxi de salão” (*Ananas comosus* var. *ananassoides*), como é conhecido no Brasil, apresenta plantas de porte médio, com folhas longas e estreitas, com espinhos ascendentes. A inflorescência é pequena, já o fruto pode ser globular a cilíndrico, de cores variadas, polpa branca, firme e fibrosa, com altos teores de açúcar e ácido, não servindo para alimentação. (SOUZA et al., 2007).

O fruto do abacaxi comestível é bastante apreciado em todo o mundo por suas qualidades organolépticas, podendo ser consumido, tanto ao natural como na forma de produtos industrializados. Possui reconhecido valor nutritivo e qualidades terapêuticas, justificando a grande demanda e importância econômica, assim como o aumento da área cultivada no país. Atualmente, o Brasil, ocupa o primeiro lugar na produção de fruta fresca totalizando 2,29 milhões de toneladas ao ano (FAO, 2007).

Em relação à produção nacional, o estado do Pará é o principal produtor com 354.244 (mil frutos), seguido da Paraíba com 343.291 (mil frutos), Minas Gerais com 243.268 (mil frutos), Bahia com 134.309 (mil frutos) e São Paulo com 103.638 (mil frutos). O principal destino destes frutos tem sido o mercado nacional de frutas frescas e, em menor proporção, indústrias de suco, polpa, compotas e outras formas de processamento. (IBGE, 2007).

As principais cultivares de abacaxi exploradas nos países produtores/consumidores são: Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Red Spanish, Pérola e Perolera, sendo que as cultivares Smooth Cayenne e Pérola lideram o mercado brasileiro (GONÇALVES et al., 2000; SOUZA, 2000; GRANADA et al., 2004). A concentração do cultivo em poucas variedades, principalmente na Smooth Cayenne, aliada a uma forte pressão antrópica, torna a cultura bastante vulnerável à erosão genética e a severos riscos fitopatológicos (COPPENS D'EECKENBRUGGE; DUVAL, 1999). Essa situação tem gerado ações voltadas para o resgate de variedades locais, para a conservação genética desse germoplasma e geração de novas variedades, por meio de melhoramento genético.

Melhoramento genético do abacaxizeiro

No Brasil, existem poucos programas de melhoramento genético do abacaxi, tendo sido os primeiros trabalhos, realizados por Giacometti (1978), dirigidos para taxionomia e descrição de cultivares. Posteriormente, foram desenvolvidos trabalhos de avaliação de germoplasma e competição de cultivares (GADELHA, 1978; GIACOMELLI; TEÓFILO SOBRINHO, 1984; CABRAL 1985, 1988; RITZINGER, 1992; SPIRONELLO et al., 1997). Com relação a programas de melhoramento, Spironello et al. (1994) estudaram o potencial de produção de sementes em cultivares e clones de abacaxi; Cabral et al. (1993) obtiveram e selecionaram híbridos de abacaxi resistentes à *fusariose*; Pinho et al. (1997) isolaram protoplastos na cultivar Perolera.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, localizada em Cruz das Almas, Bahia, vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético do abacaxizeiro desde o início dos anos 80, visando principalmente obter cultivares produtivas, adaptadas às condições climáticas locais e resistentes às mais importantes pragas e doenças. Como resultados desse programa, já foram lançadas duas variedades, Imperial e Vitória, ambas com folhas lisas, excelentes propriedades organolépticas e resistentes à *fusariose*, principal doença da cultura (CABRAL ; MATOS, 2005). Atualmente, além da obtenção de variedades para o uso na alimentação, o programa visa à geração de variedades ornamentais de

abacaxi, em vista da grande demanda de mercado que existe para esse produto (SOUZA et al., 2006a).

Micropropagação do abacaxizeiro

A forma de propagação do abacaxizeiro é predominantemente assexuada e o método convencional de produção de mudas é a partir de brotações laterais da planta (mudas tipo filhote e tipo rebentão), já que a coroa acompanha o fruto no momento da comercialização (REINHARDT; CUNHA, 1999). O número de plantas obtido por esse método é reduzido, tornando-se um dos fatores limitantes para a expansão da cultura e para o lançamento de novas variedades, uma vez que os ensaios de desempenho regionais demandam elevado número de plantas.

A produção de mudas de abacaxi em laboratório vem sendo realizada com êxito, a partir da técnica de micropropagação, permitindo a obtenção de um elevado número de plantas com uma condição fitossanitária garantida. Esta técnica não só permite a produção massal de plantas, como proporciona um material sadio e uniforme, características fundamentais para se iniciar novos plantios, e obter bons resultados na produção de mudas. As taxas de multiplicação variam de acordo com o genótipo, mas já existe um protocolo padrão para as principais cultivares comerciais de abacaxi garantida. (BARBOZA, 1999; GUERRA et al., 1999; ALBUQUERQUE, et al., 2000; VESCO et al., 2001; FIROOZABADY ; GUTTERSON, 2003; SOUZA et al., 2003).

Na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, os primeiros trabalhos para ajuste de protocolos de micropropagação começaram a ser desenvolvidos no início dos anos 80, como suporte ao programa de melhoramento genético, permitindo a produção de mudas dos clones selecionados (CABRAL et al., 1983; MATOS et al., 1988). Atualmente, a micropropagação é utilizada de forma rotineira no lançamento de novos híbridos, ainda que seja necessária uma adequação do protocolo para cada nova variedade.

Nos últimos anos, no entanto, com a ampliação do programa de melhoramento genético visando a obtenção de variedades ornamentais (SOUZA et al., 2006a), o uso de genótipos silvestres como parentais de interesse vem sendo incrementado a cada dia. No entanto, a micropropagação de variedades

silvestres pela indução de gemas adventícias a partir do cultivo de gemas axilares e subcultivos sucessivos, tem sido inexpressiva, principalmente para os genótipos da variedade botânica *Ananas comosus* var. *ananassoides* (SILVEIRA et al., 2006). Alguns genótipos produziram apenas uma planta, resultado da expressão da dominância apical da gema cultivada, ou um número de plantas muito reduzido, com uma condição fisiológica desfavorável.

A micropropagação por meio do cultivo de segmentos nodais de plantas estioladas *in vitro* é uma estratégia proposta por Kiss et al. (1995) para evitar o surgimento de plantas variantes. De acordo com os autores, as baixas concentrações de reguladores vegetais que são necessárias para favorecer o estiolamento das hastes e a ausência de zonas de corte ao redor dos nós, tornam o risco de variação somaclonal mais baixo. Nos últimos anos vários trabalhos têm relatado a utilização dessa estratégia e com taxas de multiplicação elevadas, demonstrando a eficiência desse processo para incrementar a produção de mudas (MAYNARD; BASSUK, 1996; BARBOZA; CALDAS, 2001; MOREIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2007),

Dessa forma o estiolamento das poucas plantas produzidas, nesses casos específicos, pode ser uma estratégia interessante no incremento das taxas de multiplicação dessas variedades.

Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi

Como suporte aos programas de melhoramento genético, a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical mantém um banco de germoplasma (BAG) com aproximadamente 670 acessos dos gêneros *Ananas* e outras bromeliáceas, sendo considerada a maior coleção de abacaxizeiro e espécies afins do mundo (CABRAL et al., 2006). A conservação dessas espécies vem sendo realizada sob forma de coleção em campo (*ex situ*) e a introdução de uma cópia de segurança *in vitro* vem sendo conduzida desde 2003 (SOUZA et al., 2006a). Estima-se que grande parte da variabilidade genética natural dessa fruteira esteja aí representada a partir de coletas realizadas em diversas partes do território brasileiro.

O Brasil é o centro de origem e dispersão do abacaxizeiro e espécies afins com a ocorrência de uma importante diversidade genética incluindo formas

primitivas, cultivadas e intermediárias, com relações genéticas entre elas (COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 1997). Aliada às diversas estratégias de conservação, como o BAG *ex situ*, e a conservação de sementes, a conservação *in vitro* de plantas micropropagadas é uma das alternativas de conservação de germoplasma e vem sendo largamente utilizada em muitas espécies de importância econômica, notadamente naquelas propagadas assexuadamente. Dentre as vantagens de um BAG *in vitro*, pode-se ressaltar a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo. Adicionalmente, esse método garante maior segurança aos procedimentos de intercâmbio de germoplasma, uma vez que o material vegetal é introduzido, mantido e transportado sob condições assépticas.

A introdução da cópia de segurança do BGA de abacaxi "*in vitro*" deveu-se, principalmente, às perdas expressivas de diferentes acessos, por causas variadas, que podem ser desencadeadas por fatores bióticos, como pragas e doenças, ou abióticos, como problemas de clima e solo, incluindo problemas de adaptação de variedades oriundas de condições edafoclimáticas muito distintas.

A obtenção das plantas para esse tipo de conservação, se realiza principalmente por meio do cultivo asséptico de gemas axilares, técnica básica usada para a micropropagação dessa espécie. (SOUZA et al., 2006a).

A manutenção das plantas *in vitro*, por longos períodos, implica no estabelecimento de condições de crescimento específicas, visto que uma das grandes desvantagens desta técnica é a necessidade de subcultivos periódicos, o que a torna não só laboriosa, mas também onerosa, sendo necessário adequar condições para retardar o crescimento das plantas e diminuir o número de repicagens que devem ser feitas (SOUZA et al., 2006b).

As condições estabelecidas no BAG *in vitro* de abacaxi da Embrapa têm proporcionado resultados promissores para muitas variedades com registros de até vinte e quatro meses de cultivo contínuo sem a realização de subcultivos (SOUZA et al., 2006c). No entanto, a grande variação na resposta ao protocolo estabelecido, principalmente, no que se refere às variedades silvestres, tem se tornado um desafio na manutenção dessa coleção.

Outro aspecto que deve ser considerado na conservação *in vitro* é a viabilidade e a posterior micropropagação das plantas conservadas, principalmente se a condição de conservação se baseia no estabelecimento de

taxas de crescimento mínimo ou reduzido. Em abacaxi, não existem trabalhos que mostrem os efeitos que a redução no metabolismo das plantas conservadas por um longo período possa exercer na sua posterior recuperação. No caso mais específico de intercâmbio de germoplasma, a capacidade de resgate e de multiplicação dessas plantas torna-se um aspecto crucial para o demandante desse material.

Em vista do exposto os objetivos desse trabalho foram a avaliação da eficiência do cultivo de segmentos nodais de genótipos da variedade botânica *Ananas comosus* var. *ananassoides* com vistas à micropropagação e conservação *in vitro* e a avaliação da capacidade de micropropagação e posterior regeneração de diferentes genótipos de *Ananas comosus* var. *comosus* conservados *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. C. et al. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 363-366, abr./jun. 2000.

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**, Brasília, v. 36, p. 417-423, 2001.

BARBOZA, S.B.S.C. **Comparação de protocolos para micropropagação do abacaxizeiro [*Ananas, comosus (L.) Merrill*]**. 1999. 76f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 1999.

CABRAL, J.R.S.; CUNHA, G.A.P.; RODRIGUES, E.M. **Propagação do abacaxizeiro *in vitro***. Cruz das Almas, BA: Embrapa/CNPMP, 1983. 2p. (Pesquisa em andamento, 12).

CABRAL, J.R.S. Caracterização e avaliação de cultivares de abacaxi. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.1, n.130, p.14-16, 1985.

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; CUNHA, G.A.P. da. Caracterização morfológica-agronômica de germoplasma de abacaxi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas, SP. **Anais...** Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v.1, p.35-40.

_____. Selection of pineapple cultivars resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**, n.334, p.53-58, 1993.

_____. **Imperial, nova cultivar de abacaxi**. Cruz das Almas, BA: Embrapa /CNPMP, 2005. (Comunicado técnico, 114).

_____ et al. Representatividade dos acessos do banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. **Magistra**, Cruz das Almas, v.18, p.85. 2006. Número Especial.

COPPENS d'EECKENBRUGGE, et al. Using incompatibility alleles as genetic markers to identify pineapple varieties. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 425, . p. 161-169. 1997.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; DUVAL, M.F. Pineapple germplasm conservation: experiences from the Martinique field collection. In: ENGELMANN, F. (Ed.): **Management of field and *in vitro* genebanks**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, p.59-62. 1999.

FAO statistical databases: agricultural production: crops primary: Brazil: abacaxi. Disponível em: <[http:// www.apps.fao.org/page/collections](http://www.apps.fao.org/page/collections)>. Acesso em: 10 nov. 2007.

FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, Berlim, n.21,p. 844-850, 2003.

GADELHA, R.S.S. Competição de híbridos de abacaxi com a cultivar Pérola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.13, n.1, p.21-25, 1978.

GIACOMELLI, E.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Seleção preliminar de algumas cultivares de abacaxizeiro resistentes à fusariose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1983, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBF/EMPASC, 1984 p. 145-161.

GIACOMETTI, D.C. Melhoramento genético do abacaxi. In: ENCONTRO ESTADUAL DE ABACAXICULTURA, Feira de Santana-BA. **Anais...** Feira de Santana. BA, 1978. p. 25-37.

GONÇALVES, N. B.; CARVALHO, V. D. de. Características da fruta. In: GONÇALVES, N. B. (Org.). **Abacaxi pós-colheita**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. cap. 2, p. 13-27. (Frutas do Brasil, 5).

GRANADA, G. G; ZAMBIAZI, R. C; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subproduto. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 405-422, jul./dez. 2004.

GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília v. 34, n.9. p.1557-1563, set. 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

KISS, E. et al. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.

MATOS, A. P. de. et al . O uso da cultura de tecidos no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **ABCTP Notícias (Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas)**, v. 8, p. 2-5, 1988.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Stock Plant Etiolation, Banding and Shading Effects on the Histology of Adventitious Rooting in Stems of *Carpinus betulus* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 5, p. 853-860, 1996..

MOREIRA, M. A. et al. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, set./out., 2003.

PINHO, N. M. et al., Protoplasts isolation of *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Perolera. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.425, p.259-269, 1997.

REINHARD, D.H.; CUNHA, G. A. P da. Métodos de Propagação. In: CUNHA, G.A. P; CABRAL, R.S., SOUZA, L.F. da SILVA (Org). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília, DF: Embrapa, 1999. Capítulo 5, p.105-138.

RITZINGER, R. **Avaliação e caracterização de cultivares de abacaxi no Acre, Rio Branco**. Rio Branco: EMBRAPA/CPAF, 1992. 28p. (Boletim de pesquisa, 3).

SANTOS, M. da C. et al. Estimativa da taxa de multiplicação de brotos em seções caulinares de uma nova cultivar de abacaxi, no primeiro ciclo de estiolamento e proliferação de gemas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Goiânia/GO, v. 13, p.1037-1040, 2007. Suplemento.

SILVEIRA, D.G. et al. Propagação *In vitro* de variedades de abacaxi silvestre de valor ornamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19. , Cabo Frio. **Anais...** Cabo Frio: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2006. v.1, p.367.

SOUZA, J. da S; SOUZA, L. F. da S. Aspectos socioeconômicos. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. da S.; CABRAL, J. R. S. (Eds) **Abacaxi: produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.p 77, (Frutas do Brasil; 7).

SOUZA, F. V. D. et al. **Produção de mudas de abacaxi por micropropagação**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003. 8 p. (Circular técnica, 61).

SOUZA, F.V.D et al . Identification and selection of ornamental pineapple plants **Acta Horticulturae**. Leuven. N. 702, p. 93-99, feb. 2006a.

_____. Minimum growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**. Leuven. 702, february. p. 41-47. 2006b.

____ CABRAL; J.R.S.; BENJAMIM, D.A. Behavior of wild pineapple genotypes under *In vitro* conservation. **Pineapple News**. n.13, p.10-12, may, 2006c.

SOUZA, F. V. D. et al. Caracterização morfológica de abacaxizeiros ornamentais **Magistra**, Cruz das Almas - BA, v. 19, n. 4, p. 319-325, out./dez., 2007.

SPIRONELLO, A. et al. Potencial de produção de sementes de cultivares e clones de abacaxi visando ao melhoramento genético. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n.2, p.177-184, 1994.

_____. Avaliação agrotecnológica de variedades de abacaxizeiros, conforme os tipos de mudas, em Cordeirópolis, SP **Bragantia**, Campinas, v.56, n.2, p.343-355, 1997.

VESCO, L. L. D. et al. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v. 22, n. 1, p. 80- 85, 2001.

CAPÍTULO 1

CULTIVO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE GENÓTIPOS SILVESTRES DE ABACAXI¹

¹ Artigo ajustado a ser submetido à Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB.

CULTIVO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE GENÓTIPOS SILVESTRES DE ABACAXI

Autora: Marta Taluana Santos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: O uso de segmentos nodais de plantas estioladas consiste em uma alternativa interessante na micropropagação do abacaxizeiro. Este trabalho teve como objetivo avaliar a micropropagação de dez genótipos da variedade botânica *Ananas comosus* var. *ananassoides* de abacaxi utilizando segmentos nodais de plantas estioladas *in vitro*. Foram inoculadas 14 plantas de cada genótipo (25, 203, 205, 206, 207, 232, 233, 465, 472 e 772) em meio de cultura MS, acrescido de 30 g. L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 para a fase de estiolamento, realizada sob condição de escuro a 27±1°C. Os segmentos nodais estiolados, para a etapa de multiplicação, foram cultivados em meio MS acrescido de 30 g. L⁻¹ de sacarose, 0,1 mg. L⁻¹ de ANA e 0,2 mg. L⁻¹ de BAP, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8, sendo as condições de incubação em fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 22 µEm⁻²s⁻¹a 27±1°C. Para avaliar o estiolamento após 60 e 90 dias de incubação foram medidas as seguintes variáveis: comprimento da haste principal (cm) número de hastes, número de segmentos nodais formados por haste e formação de agregados. As taxas de multiplicação, medidas na segunda etapa do trabalho, foram avaliadas em cinco subcultivos, em intervalos de 45 dias, considerando-se o número de brotos/planta. A resposta dos genótipos ao estiolamento foi variável e as melhores taxas de multiplicação foram obtidas com o genótipo 203. A estratégia de estiolamento mostrou-se eficiente para a maioria dos genótipos avaliados.

Palavras-chaves: Produção de mudas, micropropagação, cultura de tecido, *Ananas comosus* var. *ananassoides*.

IN VITRO CULTURE OF NODAL SEGMENTS OF WILD PINEAPPLE GENOTYPES

Author: Marta Taluana Santos

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT: The use of nodal segments from *in vitro* etiolated plants is an alternative to micropropagation of pineapple plants. The aim of this work was to evaluate the micropropagation of ten genotypes (25, 203, 205, 206, 207, 232, 233, 465, 472 e 772) from the wild varieties of *Ananas comosus* var. *ananassoides* using nodal segments from *in vitro* etiolated plants. Fourteen plants of each genotype were introduced in MS medium culture with 30 gL⁻¹ of sucrose and solidified with 7 gL⁻¹ of agar with pH adjusted to 5.8 in the stage of etiolating under dark condition at 27 ± 1 °C. The nodal segments obtained were used for multiplication and were inoculated on MS medium with 30 gL⁻¹ sucrose, 0.1 mg.L⁻¹ of NAA and 0.2 mg.L⁻¹ of BAP, solidified with 7 gL⁻¹ agar and pH adjusted to 5.8, under 16 h photoperiod and light intensity of 22 μEm⁻²s⁻¹. and 27 ± 1 °C. To evaluate plant etiolating the following traits were measured after 60 and 90 days of incubation: length of the principal stem (cm); number of stems; number of nodal segments/stems and formation of aggregates (clusters). The multiplication rates were evaluated in five subcultures at intervals of 45 days, considering the number of buds per plant. The response of genotypes to etiolatin was variable and the best multiplication rates were obtained with the genotype 203. The use of nodal segments from *in vitro* etiolated plants showed to be effective for most genotypes evaluated.

Key words: plant material, micropropagation, tissue culture, *Ananas comosus* var. *ananassoides*

INTRODUÇÃO

O método convencional de propagação do abacaxizeiro é feito por meio de mudas formadas a partir de diferentes partes da planta: coroa, filhote, rebentão ou filhote-rebentão, no entanto, as brotações laterais da planta são mais utilizadas, já que a coroa acompanha o fruto no momento da comercialização. A qualidade da muda é um fator de extrema importância na implantação do cultivo, a produção em larga escala e livre de patógenos tem sido um dos fatores limitantes ao desenvolvimento eficiente da cultura (VESCO et al., 2001; SILVA et al., 2007).

Os métodos utilizados na propagação convencional do abacaxi podem disseminar a fusariose (*Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*), principal doença da cultura e responsável por perdas elevadas de produtividade, resultando em prejuízos econômicos significativos. Adicionalmente, esse tipo de propagação é lento e proporciona um reduzido número de mudas, o que se constitui num problema para os programas de melhoramento genético, em função da grande demanda de plantas para os ensaios regionais de desempenho e, posteriormente, para o lançamento da nova variedade no mercado.

Dessa forma, as técnicas de micropropagação por cultura de tecidos, tornaram-se uma ferramenta importante para superar a baixa produção de mudas do abacaxizeiro e vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas nos últimos anos (BARBOZA, 1999; GUERRA et al., 1999; ALBUQUERQUE, et al., 2000; SOUZA et al., 2002; VESCO et al., 2001; FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003; MACÊDO et al., 2003; SOUZA et al., 2003; TAMAKI et al., 2007; MORAES et al., 2007).

Os explantes usualmente utilizados para a micropropagação do abacaxizeiro são gemas laterais ou axilares, oriundas preferencialmente, de mudas do tipo filhote ou então de filhote-rebentão (GUERRA et al., 1999; SONEJI et al., 2002). A fonte do explante é sem dúvida, um dos fatores mais importantes, tanto para a obtenção de boas taxas de multiplicação, assim como para a manutenção da estabilidade genética das plantas produzidas, evitando a ocorrência de variação somaclonal (SMITH et al., 2002).

As variedades cultivadas de abacaxi, de maneira geral, respondem de maneira satisfatória ao cultivo de gemas axilares, proporcionando um grande número de plantas a partir de uma única gema, necessitando, na maioria das vezes, adequações a partir de um protocolo básico (GUERRA et al., 1999;

BARBOZA; CALDAS, 2001; SONEJI et al., 2002; SOUZA et al., 2003; TAMAKI et al., 2007; MORAES et al., 2007).

No entanto as variedades silvestres, usadas nos programas de melhoramento genético para abacaxis ornamentais têm mostrado um resultado pouco significativo quando multiplicadas por esse sistema. Dentre as variedades silvestres mais utilizadas nos cruzamentos para obtenção de híbridos ornamentais de abacaxi, se encontra a variedade botânica *Ananas comosus* var. *ananassoides*, cujo cultivo *in vitro* por meio de gemas axilares mostrou resultados insignificantes, tendo alguns genótipos, produzido uma única planta, que na realidade é a expressão da dominância apical da gema que foi introduzida (SOUZA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006).

Por outro lado, a estratégia de se utilizar segmentos nodais obtidos de plantas estioladas *in vitro*, proposto em abacaxi por Kiss et al. (1995) para minimizar os riscos de variação somaclonal, pode ser uma boa estratégia na micropropagação e no incremento das taxas de multiplicação de variedades silvestres. Essa técnica vem sendo usada de forma alternativa para as variedades cultivadas e tem mostrado bons resultados no que se refere ao número de plantas produzidas (MAYNARD; BASSUK, 1996; BARBOZA; CALDAS, 2001; MOREIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2007; TAMAKI et al., 2007).

O estiolamento é o desenvolvimento de brotos por meio do alongamento dos internódios da planta em condições de escuro. Pela ausência de luz o tecido se torna desclorofilado e assume uma coloração esbranquiçada, assim como uma consistência mais frágil, succulenta, pela fina espessura das paredes celulares não lignificadas. Essa condição parece favorecer a absorção do meio de cultivo, que aliada a um número maior de zonas de multiplicação (entrenós), aumenta o potencial de multiplicação da variedade a ser micropropagada (HARTMANN et al., 1990; MAYNARD; BASSUK, 1996).

A variedade botânica *Ananas comosus* var. *ananassoides*, objeto desse trabalho, apresenta vasto potencial para uso como planta ornamental e já está inserida no programa de melhoramento genético de abacaxi ornamental da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Vários genótipos dessa variedade estão sendo identificados e caracterizados para essa finalidade, justificando, dessa forma, o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, que

permitam a obtenção de elevado número de mudas e assim, facilitem as futuras avaliações e lançamentos das variedades selecionadas ou dos híbridos obtidos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a micropropagação por segmentos nodais obtidos de plantas estioladas *in vitro* de diferentes genótipos da variedade botânica *Ananas comosus* var. *ananassoides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, utilizando-se dez genótipos de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (25, 203, 205, 206, 207, 232, 233, 465, 472 e 772) oriundos do Banco ativo de Germoplasma (BAG) de abacaxi.

Como explante de partida utilizaram-se plantas regeneradas *in vitro* no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a partir de gemas axilares (SILVEIRA et al., 2006). As plantas obtidas foram reduzidas a um tamanho de aproximadamente 1 cm, após serem retiradas todas as folhas, deixando-se apenas o talo, a fim de tornar homogêneo o material de partida. Para cada genótipo utilizou-se 14 plantas que foram colocadas em tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 0,1 mg. L⁻¹ de ANA e 0,2 mg. L⁻¹ de BAP, acrescido de 30 g. L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 para indução do estiolamento às plantas foram incubadas em condições de escuro e a uma temperatura de 27°C ± 1 °C. Realizou-se uma avaliação após 72 horas de inoculação para verificação de contaminações bacterianas.

Aos 60 e 90 dias de cultivo realizou-se a avaliação das seguintes variáveis: comprimento da haste principal (cm), número de hastes, número de segmentos nodais formados por haste e possível formação de agregados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 14 repetições, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio com um explante. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2000) e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para o ensaio de micropropagação, os segmentos nodais formados foram quantificados e em seguida transferidos para frascos contendo meio de cultura MS acrescido de 0,1 mg. L⁻¹ de ANA e 0,2 mg. L⁻¹ de BAP, solidificado com 7 g.L⁻¹

de ágar e pH ajustado em 5,8. Utilizaram-se 7 segmentos de haste /frascos, que posteriormente, foram incubados em sala de crescimento, fotoperíodo de 16 horas, com temperatura controlada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) e intensidade luminosa de $22 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Foram realizados cinco subcultivos em intervalos de 45 dias e quantificados o número de brotos obtidos por segmento nodal cultivado.

Foi realizada análise de variância para a variável número de brotos considerando o modelo estatístico do delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 10×5 , 10 genótipos e 5 subcultivos. Os dados foram transformados para raiz quadrada ($x + 0,5$) visando o atendimento das pressuposições da análise de variância. Para comparação das médias, utilizou-se o teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade através do programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de se utilizar plantas *in vitro* como explantes de partida, foram observadas porcentagens de contaminações bacterianas nos genótipos 205, 207 e 772 que chegaram a 7,14%, 21,42% e 50% respectivamente. Essas contaminações foram provavelmente, causadas por bactérias endofíticas, de ocorrência muito comum em materiais silvestres, especialmente aquelas que permanecem latentes *in vitro*, ou seja, não apresentam crescimento visível no meio nem sintomas nos tecidos. As bactérias apresentavam consistência leitosa, esbranquiçada e proliferaram ao redor do explante, sintoma característico de contaminações endógenas. Nem sempre é possível detectar a presença desses microorganismos no início do cultivo, muitas vezes, levando vários subcultivos para que surjam, quando um grande número de plantas já está propagado, causando enormes perdas e prejuízos (PEREIRA et al., 2003). Nesse trabalho, o procedimento de repicagem, que implica em corte no tecido, pode ter disparado o processo de contaminação. O uso de antibióticos é indicado em casos de freqüências elevadas de contaminação e, ainda que possam causar problemas de intoxicação ao tecido vegetal, vêm sendo utilizados em casos específicos (LEIFERT et al., 1991; TENG; NICHOLSON, 1997; MONTARROYOS, 2000). Em abacaxi, já existem trabalhos de fitopatologia de plantas que identificaram algumas bactérias endofíticas como, por exemplo, *Erwinia ananas* o que facilita a

escolha do antibiótico específico para o controle *in vitro* (CID; ZIMMERMANN, 2006).

No que se refere a avaliação do estiolamento das plantas, observou-se que aos sessenta dias de incubação em ausência de luz, as hastes cresceram muito pouco e praticamente não houve formação de entrenós. O tempo de estiolamento e da formação de entrenós é bastante dependente, não apenas do genótipo, mas também do meio de cultivo utilizado, como vem sendo registrado na literatura. Kiss et al. (1995) precursores no uso dessa estratégia, registraram que aos 35 dias de cultivo, o comprimento médio das plantas estioladas da variedade Espanhola Roja, chegou a aproximadamente 7,0 cm formando de seis a nove segmentos nodais por haste em meio MS contendo 10 μM de ANA. Por outro lado, Barboza; Caldas (2001) obtiveram 11,3 segmentos nodais por broto estiolado aos 60 dias de cultivo com o abacaxizeiro híbrido PE x SC-52, após avaliar as auxinas ANA e AIA alcançando os melhores resultados com o uso de 1,86 mg. L⁻¹ de ANA.

O uso de reguladores de vegetais, assim como diferentes períodos de escuro para a indução do estiolamento de plantas de abacaxi da cultivar Pérola, também foram testados por Moreira et al. (2003). A combinação de 1,8 mg. L⁻¹ de ANA e 2 mg.L⁻¹ de BAP proporcionou os melhores resultados aos 50 dias de cultivo (10,78) em contraste com o outro tratamento, 0,1 mg.L⁻¹ de ANA com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, que proporcionou 8,19 segmentos nodais em 80 dias de cultivo. Entretanto, esses mesmos autores ressaltaram que o maior incremento no comprimento de brotos em função do tempo de escuro, foi observado quando não se usou nenhum regulador de crescimento, concordando com os resultados de Praxedes et al. (2001), que verificaram que o estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola pode ser obtido sem a adição exógena de reguladores vegetais.

Tamaki et al. (2007), em trabalho mais recente com a cultivar 'Smooth Cayenne' testaram diferentes concentrações de macronutrientes para o cultivo *in vitro* de clones dessa variedade, a partir de segmentos nodais de hastes estioladas cultivadas em meio MS sem qualquer regulador de crescimento. Procederam a sucessivos ciclos de estiolamento para se obter novas plantas, onde o processo foi repetido até a obtenção de cerca de 700 nós no total número de explantes necessários para o estabelecimento do experimento de multiplicação. Este fato vem consolidar a viabilidade desse tipo de trabalho para obtenção de

mudas de qualidades. (SOUZA et al., 2007; CANTO, 2003), avaliaram diferentes tratamentos, combinando ANA e GA₃, para o estiolamento de plantas do híbrido PE x SC-60 (Perolera x Smooth Cayenne) e verificaram que o meio de cultura suplementado com 1 mg.L⁻¹ de ANA, proporcionou a média de 9,6 segmentos por haste aos 90 dias de cultivo.

Os resultados discutidos acima, evidenciam que as respostas aos meios de cultivo para a indução do estiolamento são bastante variáveis entre os genótipos avaliados, tanto no tempo necessário para o estiolamento da planta, quanto no número de segmentos nodais obtidos. Ainda que o uso de ANA, de acordo com alguns trabalhos, favorece o estiolamento quando utilizado, não parece ser fundamental para que o processo ocorra ao contrário da condição de escuro, que parece ser essencial para a obtenção do alongamento da haste.

Os resultados obtidos nesse trabalho diferem principalmente, no que se refere ao tempo necessário para o alongamento da haste. Aos trinta dias não havia praticamente nenhum crescimento, enquanto aos sessenta dias de cultivo, o que se observou, na maioria dos genótipos, foram folhas estioladas, porém sem nenhuma formação de segmentos nodais (Figura 1).

No entanto o BGA203 e BGA205 foram aqueles que apresentaram hastes ligeiramente estioladas, com entrenós mais definidos aos 60 dias de cultivo.



Figura 1. Plantas em condições de escuro aos 30 (A) e 60 dias de cultivo com entrenós mais definidos (B) e sem hastes com presença de entrenós, onde se observa apenas o estiolamento das folhas (C).

Esse é o primeiro trabalho de estiolamento a ser realizado com diferentes genótipos silvestres de abacaxi, cujo comportamento *in vitro* ainda não está bem esclarecido, ainda que têm demonstrado, por vários ensaios preliminares,

demandas próprias, quando comparadas com as variedades cultivadas. Com exceção das variedades de *Ananas comosus* var. *erectifolius* (= *Ananas lucidus*) já largamente usada como planta ornamental e da variedade *Ananas comosus* var. *bracteatus*, ambas com altas taxas de multiplicação *in vitro*, as outras variedades silvestres de abacaxi demandam desenvolvimento de protocolos mais eficientes de micropropagação (SILVEIRA et al., 2006; CUNHA et al., 2006).

Aos noventa dias, no entanto, já foi possível medir e avaliar as variáveis determinadas no início do trabalho, como pode ser observado na Tabela 1. Porém, se compararmos as médias obtidas para o comprimento da haste aos 90 dias de cultivo, com os trabalhos discutidos anteriormente, concluímos que o desempenho dos genótipos silvestres é bem menor do que o observado com as variedades cultivadas.

Tabela 1. Média do comprimento da haste principal, número de hastes e número de segmentos nodais formados por haste após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipos	Comprimento da haste principal (cm)	Número médio de hastes secundárias	Número médio de segmentos nodais por haste
BGA 25	4,28 b	0,93 b	3,00 b
BGA 203	7,90 a	2,14 a	6,46 a
BGA 205	6,15 a	0,93 b	5,00 a
BGA 206	3,19 b	0,57 c	1,57 c
BGA 207	5,37 a	0,86 b	4,50 a
BGA 232	2,90 b	0,64 c	1,93 c
BGA 233	1,47 b	0,29 c	0,50 c
BGA 465	3,46 b	0,57 c	3,36 b
BGA 472	1,71 b	0,55 c	1,09 c
BGA 772	7,04 a	0,85 b	3,07 b
CV (%)	71,90	74,52	81,22

Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a% de probabilidade

Os genótipos BGA203 BGA205, BGA207 e BGA772 apresentaram os maiores comprimentos de hastes variando de 5,37 a 7,90 cm, enquanto as menores hastes foram observadas nos acessos BGA233 e BGA472.

Quanto ao número de hastes secundárias formadas registrou-se pouca produção de haste para a maioria dos genótipos, sendo que o BGA203 produziu em média 2,14 hastes por planta inoculada. O uso de reguladores vegetais pode estimular a produção de hastes secundárias no processo de estiolamento. Nesse

trabalho o uso de BAP nessa fase pode ter induzido à formação dessas estruturas, aumentando dessa forma a quantidade de explantes de partida para trabalhos com micropropagação. Outro aspecto observado foi a diferença no diâmetro das hastes entre os genótipos (Figura 2).

Tão importante quanto o comprimento da haste é o número de nós, ou segmentos nodais que possam ser gerados pelas condições de estiolamento, uma vez que serão essas estruturas que servirão de explantes para a posterior multiplicação do material.



Figura 2. Detalhes da formação de hastes secundárias e de agregados na base das plantas e diferenças no diâmetro de hastes de diferentes genótipos.

Em análise de correlação realizada foi possível verificar que a correlação entre o comprimento da haste e o número de segmentos nodais é alta (0,85**) e caracteriza um comportamento importante e já observado em trabalhos anteriores. (MOREIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2007).

Souza et al. (2007) constataram igualmente uma correspondência entre essas variáveis, inferindo que os diferentes tratamentos que utilizaram não influenciaram na distância entre os nós. Esse comportamento vem sendo registrado também em outras espécies, como é o caso das orquídeas (RAMOS; CARNEIRO, 2007). O aumento do número de segmentos nodais pode ser obtido com maior alongamento da haste, que por sua vez pode ser independente do uso de reguladores vegetais.

O BGA203, que mostrou os melhores resultados nas três variáveis observadas, apresentou, no entanto a formação de agregados na base das plantas, que pode ter sido induzido pela adição do BAP ao meio de cultura ainda que em baixa concentração. No caso de agregados, gemas minúsculas em grandes quantidades, pode ser interessante para a posterior fase de multiplicação. Moreira et al. (2003), no entanto, constataram expressiva presença de calos, ao inocular plantas da variedade cultivada Pérola, para estiolar em meio com $1,8 \text{ mg. L}^{-1}$ de ANA e 2 mg. L^{-1} de BAP, nesse caso, provavelmente devido à presença de uma concentração elevada de auxina.

Os resultados obtidos entre os diferentes acessos para o estiolamento, principalmente no que se refere ao comprimento da haste, confirma o efeito do genótipo dentro de uma mesma variedade.

Na Tabela 2 são apresentados as médias dos números de brotação para os dez genótipos nos cinco subcultivos realizados, assim como o coeficiente de correlação de Pearson do número total de plantas e o número de segmentos nodais formados. A correlação é altamente significativa em todos os subcultivos, deixando evidente que o meio utilizado foi eficiente para a regeneração das plantas a partir dos segmentos cultivados, apesar das diferenças observadas no crescimento das plantas (Figura 3).

Os genótipos 203, 205 e 207 apresentaram as melhores médias nos dois primeiros subcultivos, sendo que apenas o 203 continua até o quinto subcultivo como o material mais produtivo em termos de brotos. Por outro lado os genótipos 233 e 472 tiveram a média de brotações mais baixa nesses subcultivos iniciais. Com exceção do genótipo 25 que obteve o maior número de brotos no 3º subcultivo, os demais genótipos apresentaram os maiores valores do número de brotos nos dois últimos subcultivos.

Segundo Grattapaglia; Machado (1998) as gemas axilares podem não apresentar a mesma razão de multiplicação *in vitro*; enquanto algumas gemas apresentam maiores e mais rápido potencial de multiplicação. Essa diferença observada é esperada uma vez que, vários relatos, não apenas em abacaxi, ressaltam a genótipo-dependência no cultivo *in vitro*, independente da técnica a ser utilizada.

Tabela 2. Número de brotos médios 10 genótipos de *Ananas comosus* var. *ananassoides* após 240 dias de incubação em sala de crescimento, cultivados no meio MS suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP, durante cinco subcultivos e coeficientes de correlação de Pearson do número total de brotos com o número de segmentos nodais formados.

Genótipos	Subcultivo					número total de brotos
	1 °	2 °	3 °	4 °	5 °	
25	3,00 bC	6,50 aC	17,25 bA	6,50 cC	9,50 cB	201
203	6,46 aC	7,87 aC	33,14 aB	30,50 aB	43,71 aA	1693
205	5,00 aA	5,67 aA	10,67 cA	8,40 cA	10,60 cA	253
206	1,57 cB	1,67 bB	6,14 dA	5,33 cA	7,43 cA	164
207	4,50 aB	5,00 aB	12,29 cA	14,63 bA	18,00 bA	455
232	1,93 cB	3,00 bB	4,67 dB	10,80 bA	15,20 bA	203
233	0,50 cC	3,00 bB	13,00 cA	11,00 bA	15,38 bA	350
465	3,36 bC	2,38 bC	6,69 dB	11,08 bA	12,92 bA	477
472	1,09 cB	2,00 bB	7,80 dA	10,75 bA	13,25 bA	181
772	3,07 bC	4,17 aC	8,50 dB	15,50 bA	17,50 bA	317
r	0,99**	0,74*	0,66*	0,67*	0,66*	0,70*

** e * significativo a 1 e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste de t. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Barboza e Caldas (2001) realizaram apenas um subcultivo para verificar a capacidade de regeneração dos segmentos nodais e verificaram que em todos os tratamentos houve uma tendência de redução do número de plântulas regeneradas por nó a medida que o número de nós em cada haste aumentava. De acordo com os autores, ainda que meio o MS suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP tenha proporcionado a maior média de plantas regeneradas, o meio enriquecido com ANA promoveu um grande número de gemas na base da planta, ou seja, quanto maior o número gemas/ hastes menor o número de brotações. Os mesmo autores sugerem que um segundo subcultivo os resultados poderia ser diferentes.



Figura 3. Plantas regeneradas a partir de segmentos nodais estiolados de diferentes genótipos de abacaxi silvestre.

No presente trabalho, não foi realizado um experimento para avaliar diferentes meios de cultura na etapa de regeneração, mas se utilizou o meio básico empregado para diferentes variedades de abacaxi, onde as concentrações baixas de ANA ($0,1 \text{ mg. L}^{-1}$) e de BAP ($0,2 \text{ mg. L}^{-1}$), garantem boa taxa de multiplicação, para as variedades cultivadas, sem risco de variação somaclonal (SOUZA et al., 2005). Se compararmos as taxas de multiplicação obtidas nesse trabalho com as taxas de multiplicação registradas para as variedades cultivadas, se verifica que são significativamente inferiores (BARBOZA, 1999; GUERRA et al., 1999; ALBUQUERQUE et al., 2000; PASQUAL et al., 2001; VESCO et al., 2001; FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003; MACÊDO et al., 2003; SOUZA et al., 2003; TAMAKI et al., 2007; MORAES et al., 2007), evidenciando as dificuldades de se proceder à multiplicação *in vitro* dessas variedades silvestres. Entretanto, se compararmos os resultados com os trabalhos preliminares realizados com essa variedade (SILVEIRA et al., 2006), se constata que o estiolamento incrementa de forma satisfatória as taxas de multiplicação, mostrando-se uma estratégia interessante e que pode ser aprimorada, não apenas na etapa de indução do estiolamento, mas na regeneração das plantas a partir dos segmentos nodais obtidos.

CONCLUSÃO

A formação de segmentos nodais para uso na regeneração de plantas dessa variedade se dá aproximadamente aos 90 dias de cultivo.

Entre os 10 genótipos avaliados de *Ananas comosus* var. *ananassoides* o 203 foi o que apresentou o melhor desempenho, tanto na formação de segmentos nodais, como na regeneração de plantas.

A estratégia de multiplicar genótipos silvestres de abacaxi *Ananas comosus* var. *ananassoides* utilizando segmentos nodais de plantas estioladas *in vitro* produziu resultados satisfatórios para todos os genótipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. C. et al. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 363-366, abr./jun. 2000.

BARBOZA, S.B.S.C. **Comparação de protocolos para micropropagação do abacaxizeiro [*Ananas, comosus (L.) Merril*]**. 1999. 76f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 1999.

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**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 417-423, mar. 2001.

CANTO, A. M. M. E. **Conservação de germoplasma de abacaxi**: viabilidade de cultivos mantidos *in vitro*. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

CID, L. P. BARRUETO; ZIMMERMANN J.M. A contaminação *in vitro* de planta. Brasília: DF Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 122).

CUNHA, E.C. et al. Multiplicação *In vitro* de abacaxi ornamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19. **Anais...** Cabo Frio: frutas do Brasil: saúde para o mundo, 2006. v.1, p.370.

FIROOZABADY, E; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, n.21, p. 844-850, 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. ; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do Abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília v. 34, n.9. p.1557-1563, set. 1999.

HARTMAN, H. T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F. T. **Plant propagation**: principles and practices. Englewood Cliffs: Prentise-Hall, Inc, 1990. 647p.

KISS, E. et al. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.

LEIFERT, C. et al. Elimination of *Lactobacillus plantarum* , *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

MACÊDO, C. E. C. de et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 25, n. 3, p. 501-504, dez. 2003.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Stock plant etiolation, banding and shading Effects on the histology of adventitious rooting in stems of *Carpinus betulus* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 5, p. 853-860, 1996.

MOREIRA, M. A. et al. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, set./out., 2003.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, n. 36/ 37, p.5-10, 2000.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F.A.C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia e Ciência Agropec.** João Pessoa, v.1, n.2, p.39-44, dez, 2007.

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

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, jul. 2003.

PRAXEDES, S. C. et al. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, v.14, p.13-15, dez., 2001.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquitae* pelo método de estiolamento de seguimentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 10-15, mar., 2007.

SANTOS, M. da C. et al. Estimativa da taxa de multiplicação de brotos em seções caulinares de uma nova cultivar de abacaxi, no primeiro ciclo de estiolamento e proliferação de gemas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Goiânia/GO, v. 13, p.1037-1040, 2007. Suplemento

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT: user's guide**, v.8.0. Cary NC, 2000. 3v.

SILVEIRA, D.G. et al. Produção *in vitro* de mudas de abacaxi silvestre de valor ornamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19. , Cabo Frio. **Anais...** Cabo Frio: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2006. v.1, p.367.

SILVA, A. B. et al. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, set. 2007.

SOUZA, A. da S. et al. Multiplicação do abacaxizeiro híbrido PE x SC 60 sob diferentes níveis de paclobutrazol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002. 1 CD- Room.

SOUZA, F. V. D. et al. **Produção de mudas de abacaxi por micropropagação**. Cruz das Almas. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003. (Circular técnica, 61).

_____. Efeito da concentração de sais e do ácido abscísico na conservação *in vitro* do abacaxizeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3. , 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo, 2005. 1 CD- Room.

_____. Identification and selection of ornamental pineapple plants **Acta Horticulturae**. Leuven. 702, p. 93-99, feb. 2006.

_____. Efeito de reguladores de crescimento na obtenção *In vitro* de segmentos nodais de um novo híbrido de abacaxi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007. São Lourenço. **Anais....** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2007. v 4, p. 1-3.

SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). **Journal of Horticultural Science ; Biotechnology**, v. 77, n.1, p. 28-32, jan. 2002.

SMITH, M. K. et al. Pineapple transformation: managing somaclonal variation. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 575, p.69-74, 2002

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 n. 1, p. 69-73, 2007.

TENG, W. L.; NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin-G and streptomycin minimize internal infections and have post-treatment effects on the morphogenesis of ginseng root culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 531-535, 1997.

VESCO, L. L. D. et al. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v.22, n.1, p.80-85, 2001.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE GENÓTIPOS SILVESTRES DE ABACAXI APÓS CONSERVAÇÃO *IN VITRO*²

² Artigo a ser submetido ao periódico *Bragantia*.

VIABILIDADE E MICROPROPAGAÇÃO DE GENÓTIPOS SILVESTRES DE ABACAXI APÓS CONSERVAÇÃO *IN VITRO*

Autora: Marta Taluana Santos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: A conservação *in vitro* de abacaxizeiro se baseia no estabelecimento de condições que visam à redução das atividades metabólicas das plantas a fim de reduzir seu crescimento e aumentar os intervalos entre subcultivos, facilitando dessa forma o manejo da coleção. Pouco se sabe, no entanto, dos efeitos que essa condição estabelecida tem sobre as plantas conservadas por longos períodos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade e a micropropagação de diferentes genótipos silvestres da variedade botânica *Ananas comosus* var. *comosus* conservados *in vitro* por um período de quatro meses a um ano. As plantas foram retiradas da câmara de conservação e cultivadas em meio MS suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose. Em seguida foram mantidas em sala de crescimento com intensidade luminosa de 22 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de 27°C e fotoperíodo de 16 horas. Os resultados obtidos não mostraram correlação do tempo de cultivo com a viabilidade das plantas conservadas, sugerindo um forte componente genético no comportamento observado. As taxas de multiplicação foram variáveis, sendo que o genótipo BGA16, conservado por 4 meses e que apresentava plantas bem desenvolvidas apresentou o maior número total de plantas, contabilizando 524 ao final do quinto subcultivo. O BGA334, com 4 meses de conservação apresentou a menor viabilidade com as menores taxas de multiplicação.

Palavras-chave: *Ananas comosus* var. *comosus*, crescimento mínimo, micropropagação, cultura de tecidos

VIABILITY AND MICROPROPAGATION OF WILD GENOTYPES AFTER *IN VITRO* CONSERVATION

Author: Marta Taluana Santos

Adviser: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT:

The pineapple *in vitro* conservation of is based on slow growth conditions in order to reduce the metabolic activities promoting the reducing plant growth and to enlarge the intervals of subculture, facilitating the management of the collection. There are few information about the effect of the time conservation and that specific condition on the plants. This work was to evaluate the viability of the micropropagation of different wild genotypes of *Ananas comosus* var. *comosus* kept *in vitro* conservation period. for a period of four months to one year. The plants were taken from conservation chamber and cultivated in MS supplemented with 0,2 mg.L⁻¹ of BAP and 0,1 mg.L⁻¹ of NAA solidified with 7 g.L⁻¹ of ágar and added with 30 g.L⁻¹ of sucrose. The plants were incubated under 16 h photoperiod at 24 ± 2 °C, 70% and fluorescent light providing 22 µEm⁻²s⁻¹. The results showed no correlations between plant viability and the conservation suggesting a significant genetic compound on the observed behavior. The multiplication rates were variable and the best results was obtained with the BGA16 conserved by four month. This genotype presented well developed plants and produced 524 plants after five subcultures. The BGA334 with four month of conservation presented the lower viability and multiplication rates.

Key words: *Ananas comosus* var. *comosus*, minimum growth, micropropagation, tissue culture.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos centros de origem e diversidade genética do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill, família Bromeliácea) abrigando uma expressiva variabilidade genética do gênero em seu território. No entanto, o cultivo sistematizado de poucas variedades e a ação antrópica desordenada de áreas de ocorrência desses materiais, tem causado erosão genética no gênero, demandando ações voltadas para a conservação desse importante germoplasma (CABRAL; SOUZA, 2006).

Desse modo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de atividades como a coleta organizada, seguida de conservação, caracterização, avaliação e uso, atividades consideradas de grande importância para a sustentabilidade da cultura do abacaxi, já que o produto em questão possui uma base genética muito estreita (CABRAL et al., 1998).

Uma expressiva coleção de germoplasma desse gênero e de espécies afins se encontra conservada atualmente no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas, no Estado da Bahia. Os acessos são mantidos em parcelas de 40 plantas, em fileiras simples no espaçamento de 1,20 m x 0,40 m, sob irrigação, adotando-se as práticas culturais recomendadas no sistema de produção para abacaxi (CABRAL et al., 2006). No entanto tem sido registrada ao longo dos anos, a perda de diferentes acessos do gênero, devido a falta de adaptação às condições edafoclimáticas da região, ou após cultivos sucessivos, provavelmente devido a incidência de pragas e doenças. Dessa forma, mais de 100 acessos já foram perdidos desde a implantação do BAG em campo, que conta atualmente com 670 acessos (SOUZA et al., 2006a).

Dentre as diversas estratégias *ex situ*, a conservação *in vitro* de plantas micropropagadas é uma alternativa de conservação de germoplasma que vem sendo largamente utilizada em muitas espécies de importância econômica, notadamente naquelas propagadas assexuadamente (WHITERS, 1989; DODDS, 1991; ENGELMANN, 1997; MALAURIE et al., 1998; LEMOS et al., 2002; SOUZA et al., 2006). Essa estratégia de conservação está baseada no cultivo das coleções em laboratório, em condições assépticas, a partir de técnicas de cultura de tecidos. Dessa forma, elimina os riscos inerentes às coleções de campo,

causados por fatores bióticos ou abióticos, com a vantagem adicional de ocupar um pequeno espaço físico e facilitar sobremaneira o intercâmbio de germoplasma.

As condições de cultivo normalmente estabelecidas para a conservação de germoplasma, visam à redução do metabolismo celular, influenciando, dessa forma, as taxas de crescimento das plantas. A desaceleração do crescimento *in vitro* tem por objetivo aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão-de-obra, os custos e os riscos de variação somaclonal, decorrentes da excessiva manipulação do tecido vegetal.

Em abacaxi existem poucos relatos publicados sobre essa estratégia de conservação. Ainda que coleções sejam mantidas na França (CIRAD), Havaí e Cuba, os principais estudos estão sendo desenvolvidos no Brasil (CANTO et al., 2004; SOUZA et al., 2006).

Em 2004 deu-se início ao estabelecimento de uma cópia de segurança *in vitro* do germoplasma de abacaxi sob a guarda da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (SOUZA; CABRAL, 2004). A obtenção das plantas para a conservação *in vitro* se realizou por meio dos sistemas de micropropagação dos acessos a serem introduzidos, seguindo os protocolos básicos para introdução desses materiais, a partir de gemas axilares (SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2006a). O delineamento do Banco *in vitro* prevê a conservação de dez plantas por acesso em condições de crescimento mínimo, em meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a metade da concentração de sais, sem nenhum tipo de regulador de crescimento, a uma temperatura de 21 ± 1 °C, intensidade luminosa de $7,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 12 h. A redução dos sais, da luz e da temperatura, em conjunto, influencia na taxa de crescimento das plantas *in vitro*, especialmente do abacaxi, bastante sensível, principalmente às baixas temperaturas e ao fotoperíodo, considerando diferentes técnicas apesar de várias espécies, necessitarem na maioria das vezes, da presença de reguladores vegetais ministrados de forma exógena no cultivo de tecidos, o uso dessas substâncias na conservação *in vitro* não é recomendada (VIEIRA ; DORNELAS, 1996), ainda que em algumas espécies vem sendo registrado o uso de inibidores de crescimento.

O manejo dessa coleção busca a manutenção das plantas pelo maior período possível em bom estado fisiológico a fim de garantir um retorno sem

problemas às condições normais de multiplicação *in vitro* ou para a aclimatização *in vivo*. A retomada do crescimento das microplantas após o período de conservação sob crescimento lento deve ser restabelecida nas condições normais de cultivo (LEMOS et al., 2002). Subcultivos freqüentes podem levar a ocorrência de variações somaclonais, comprometendo todo o esforço de conservação do germoplasma. Esse, no entanto, é um dos aspectos que pode tornar esse tipo de conservação extremamente laboriosa, visto que o comportamento *in vitro* dos genótipos tem se mostrado bastante diferenciado, como mostraram algumas avaliações preliminares realizadas nessa coleção (SOUZA et al., 2006b). Registrou-se tempos de conservação (intervalos entre subcultivos) que variaram de 90 a 709 dias, praticamente dois anos em aproximadamente 100 genótipos. (SOUZA et al., 2006c).

Pouco se sabe sobre os efeitos que as condições de cultivo, próprias para a conservação *in vitro* têm sobre a viabilidade e multiplicação dessas plantas, aspecto de suma importância, principalmente, no intercâmbio de germoplasma. Considerando-se o tamanho da coleção de abacaxi, são grandes os esforços no sentido de se realizar esses estudos em grupos de genótipos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade e o potencial de micropropagação de genótipos silvestres da variedade botânica *Ananas comosus* var. *comosus* após períodos variados de conservação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecido da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Foram utilizados nove acessos de *Ananas comosus* var. *comosus* oriundos do BAG *in vitro* de abacaxi (BGA16, BGA147, BGA334, BGA344, BGA555, BGA699, BGA710, BGA720, BGA800). Essas variedades estavam sendo mantidas em meio MS com a metade da concentração de sais acrescido de 30 g. L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 e incubadas em sala de conservação, com temperatura de 21°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 7,5 µE m⁻² s⁻¹ por períodos que variaram de quatro meses a um ano. Nos quais os acessos (BGA16, e BGA720) estavam com quatro meses, o (BGA334) com cinco

meses o (BGA555, BGA699 e BGA800) com seis meses, o (BGA344) com sete meses o (BGA147) com oito meses e o (BGA701) com um ano.

Em câmara de fluxo laminar foram realizadas avaliações utilizando as seguintes variáveis: comprimento da folha D (CFD), com o auxílio de uma régua graduada, considerando-se a medida compreendida entre a base do caule e a extremidade da folha com maior tamanho, número de folhas senescentes (NFS) e número de folhas verdes (NFV) avaliadas pela contagem das folhas individualmente. A partir das variáveis NFS e NFV foi calculada a percentagem de folhas senescentes (PFS).

Após as análises, seis plantas de cada acesso, oriundas do BAG foram seccionadas próximas ao talo, sendo retiradas todas as folhas a fim de tornar homogêneo o material de partida em 1 cm e colocadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,1 mg.L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilamino purina), solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8. Em seguida foram mantidas em sala de crescimento com intensidade luminosa de 22 μEm⁻²s⁻¹, temperatura de 27°C e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação do número de brotações foi realizada a cada subcultivo, em intervalos de 35 dias. Foram realizados cinco subcultivos no total. Foi calculada a taxa de crescimento geométrica (r), entre dois subcultivos subseqüentes, dada pela expressão $r = \left(\sqrt[t]{V_f / V_i} - 1\right) \times 100$, em percentagem, onde V_f refere-se ao número de brotos no subcultivo posterior, V_i o número de brotos no subcultivo anterior e t o intervalo de 35 dias entre os 5 subcultivos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com nove tratamentos (acessos) e seis repetições, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio com uma planta. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para o estudo das relações entre as variáveis CFD, NFS, NFV, PFS, número de brotos nos cinco subcultivos e tempo de conservação foi estimado o coeficiente de correlação linear de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2000). Para avaliar as condições fisiológicas iniciais dos genótipos e sua relação com o número de brotos formados nos cinco subcultivos foi realizada análise multivariada pela

técnica de componentes principais utilizando-se o programa STATISTICA (STATISTICA, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 podem ser observadas plantas pertencentes aos acessos avaliados e que foram selecionadas ao acaso dentro das repetições do banco, para a realização desse trabalho. Em alguns acessos identificou-se a formação de agregados com estruturas folhosas e malformadas, que nitidamente interferiram no desenvolvimento das plantas durante o tempo de conservação, como se observa no BGA334, BGA344 e no BGA555. Essa formação de agregados não corresponde ao que se espera quando as condições estabelecidas de cultivo visam à redução do crescimento da planta. É um evento característico nos processos de multiplicação *in vitro* e depende muito do efeito do genótipo que está sendo multiplicado, visto que é o resultado da interação entre reguladores vegetais ministrados aos meios de cultivo e os níveis endógenos desses reguladores no explante (ALBUQUERQUE et al., 2000; FIROOZABADY ; GUTTERSON, 2003).

Vale destacar, que o procedimento realizado para a introdução das plantas na conservação inclui o corte da planta, com a retirada das folhas verdes, usado também na multiplicação com o objetivo de eliminar a dominância apical e estimular as brotações laterais. Os genótipos que apresentaram esse comportamento deviam ter níveis endógenos de reguladores que em combinação com a eliminação da dominância apical, foram suficientes para estimular brotos laterais, que por sua vez não se desenvolveram bem, devido às condições estabelecidas na conservação.

As avaliações referentes à folha D, ao número de folhas verdes e de folhas senescentes foram realizadas com o objetivo de indicar mais precisamente a situação fisiológica das plantas no momento de sua retirada da conservação *in vitro* e transferência para as condições normais de crescimento. A apresentação da porcentagem de folhas senescentes é importante, à medida que a abscisão foliar é um dos indicativos mais claros da dinâmica de envelhecimento em várias espécies vegetais. A retomada normal do crescimento depende preferencialmente da

viabilidade da planta no momento da transferência que por sua vez está estreitamente relacionada com o estado fisiológico da planta (LEMOS et al., 2002).

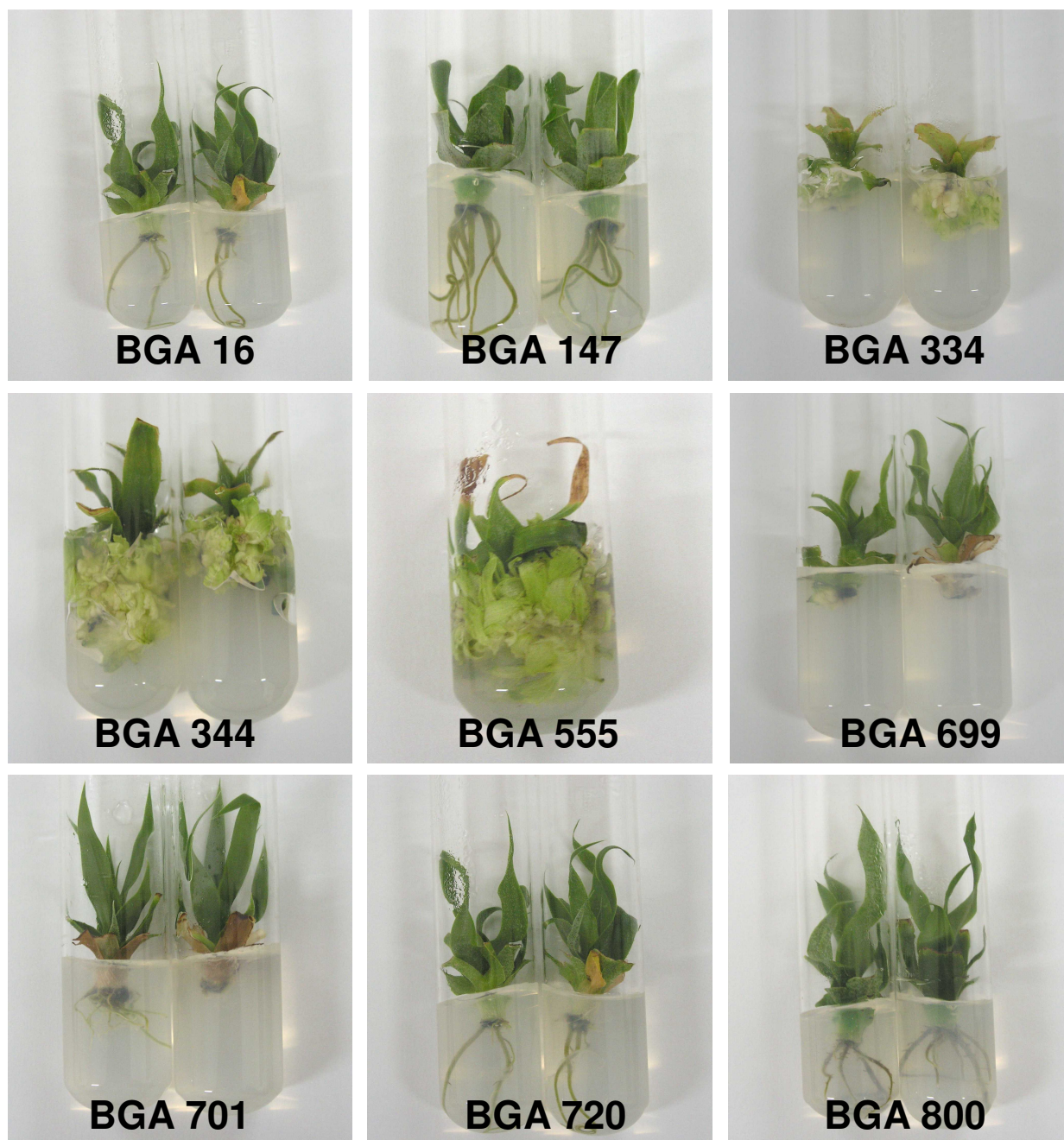


Figura 1. Plantas pertencentes aos diferentes acessos de *Ananas comosus* var. *comosus* após diferentes tempos de conservação *in vitro* no BGA da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Os valores médios das variáveis analisadas podem ser vistos na Tabela 1, incluindo a porcentagem de folhas senescentes e o coeficiente de correlação de

Pearson com o tempo de conservação *in vitro* dos nove acessos usados nesse trabalho. Por outro lado, na Figura 2 está o resultado referente à análise de componentes principais considerando apenas essas variáveis com o objetivo de identificar acessos que estivessem em condições fisiológicas semelhantes no momento da transferência para as condições normais de crescimento. Os dados mostram que o estado fisiológico das plantas parece ser independente do tempo de conservação dos genótipos, visto que não foram observadas correlações significativas (Tabela 1) e nem padrões nos agrupamentos. (Figuras 2). Alguns genótipos apresentaram condição única de desenvolvimento, não pertencendo a nenhum grupo, como é o caso do BGA701, com 12 meses de conservação e os genótipos BGA720 e BGA699 com 4 e 6 meses de conservação, respectivamente. Essa falta de padrão no comportamento das diferentes variedades ao longo do tempo de cultivo é talvez a maior limitação da manutenção e manejo de um banco de germoplasma *in vitro* e vem sendo registrada em diferentes espécies. (MALAURI et al. 1998; LEMOS et al., 2002; MARTIN ;PRADEEP, 2003; CANTO et al., 2004; FUKUDA et al., 2005; SOUZA et al., 2006). O acesso BGA334 foi o que apresentou o desenvolvimento mais comprometido, com 5 meses de conservação, plantas muito pequenas, pouco desenvolvidas e com (60,64%) de folhas senescentes; além do comportamento discutido anteriormente quanto à formação de agregados. Por outro lado, o BGA699, que também apresentou uma elevada porcentagem de folhas senescentes (53,31%) aos 6 meses de conservação, tinha plantas mais desenvolvidas e visivelmente mais vigorosas. Esse comportamento fica evidente principalmente com os genótipos conservados por 4, 5 e 6 meses, dispersos em diferentes grupos.

A condição fisiológica dessas plantas quando nas condições de conservação, é um importante indicativo para determinar o momento do subcultivo para cada acesso. No entanto, a maior dificuldade é determinar com precisão qual o indicador que melhor expressa essa condição e o melhor momento para realizar a transferência para um meio fresco. O resultado discutido acima, em relação aos genótipos BGA334 e BGA699, reflete bem essa dificuldade, visto que o acesso BGA334, deveria impreterivelmente ser repicado, enquanto o BGA699 ainda poderia ser mantido em cultivo.

Tabela 1. Comprimento da folha D (CFD), número de folhas verdes (NFV), número (NFS) e percentagem (%FS) de folhas senescentes e coeficiente de correlação de Pearson das variáveis com o tempo de conservação *in vitro* de 10 genótipos de *Ananas comosus* var. *comosus*.

Genótipos	Período de conservação <i>in vitro</i>	CFD	NFV	NFS	% FS
BGA 16	4 meses	7,00 b	9,33 c	3,50 c	27,28
BGA 147	8 meses	10,58 a	9,67 c	3,17 c	24,69
BGA 334	5 meses	4,25 c	4,33 d	6,67 b	60,64
BGA 344	7 meses	3,67 c	6,00 d	4,50 c	42,86
BGA 555	6 meses	7,75 b	13,83 b	4,17 c	23,17
BGA 699	6 meses	7,85 b	8,17 c	9,33 a	53,31
BGA 701	1ano	10,17 a	11,33 b	6,83 a	37,61
BGA 720	4 meses	10,83 a	17,50 a	3,33 c	15,99
BGA 800	6 meses	5,17 c	9,50 c	4,17 c	30,50
r		0,25 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,12 ^{ns}

Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

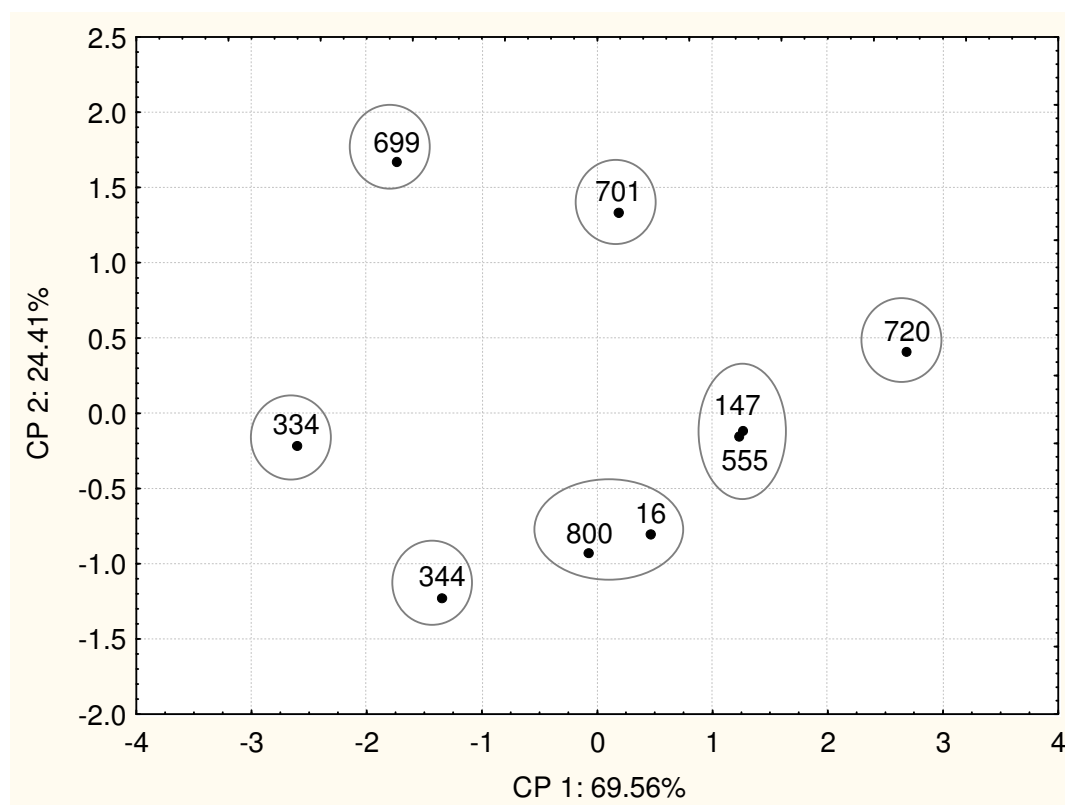


Figura 2. Dispersão gráfica dos escores em relação aos componentes principais (CP 1 e 2) de 9 acessos de *Ananas comosus* var. *comosus* oriundos do BAG *in vitro* de abacaxi considerando as variáveis comprimento da folha D, número de

folhas verdes, número de folhas senescentes e percentagem de folhas senescentes.

A viabilidade das plantas após o período de conservação se reflete pela retomada do crescimento normal, o que pode ser obtido cultivando-se as plantas no meio de multiplicação e condições padrões de crescimento usados para micropropagação das principais variedades cultivadas (TEIXEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2005; BARBOZA; CALDAS, 2001). As taxas de crescimento registradas nos 9 genótipos ao longo dos 5 subcultivos podem ser observadas na Tabela 2, juntamente com a correlação das mesmas com o tempo de conservação. Da mesma forma que o observado com o estado fisiológico das plantas, o tempo de conservação não influenciou as taxas de crescimento ao longo dos subcultivos, como mostra os resultados do coeficiente de Pearson, onde nenhuma correlação foi significativa.

Alguns genótipos apresentaram taxas de crescimento negativas, o que significa que houve morte de algumas plantas após o procedimento de transferência, que implica na retirada de todas as folhas senescentes e no corte das folhas verdes e raízes velhas, cultivando-se a planta com aproximadamente 1 cm no novo meio fresco. O número total de brotos por acesso nos 5 subcultivos pode ser observado na Figura 3. É interessante observar que os acessos (334, 344 e 555), que apresentaram a formação de agregados durante o período de conservação apresentaram os menores números de plantas produzidas ao final dos cinco subcultivos.

Tabela 2. Taxa de crescimento entre subcultivos e coeficientes de correlação de Pearson entre o número de brotos e o tempo de conservação *in vitro* de 9 genótipos de *Ananas comosus* var. *comosus*.

Genótipos	S1-S2	S2-S3	S3-S4	S4-S5
BGA 16	1,65	2,51	1,74	0,47
BGA 147	0,00	1,61	1,86	2,34
BGA 334	-0,82	2,31	1,17	1,10
BGA 344	0,23	-0,23	2,45	2,20
BGA 555	-0,64	1,61	2,20	2,23
BGA 699	1,69	1,17	1,13	2,41
BGA 701	-0,27	0,64	2,17	2,24
BGA 720	2,13	0,46	1,95	1,97
BGA 800	2,28	0,89	1,10	2,37
r	-0,45 ^{ns}	-0,36 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,50 ^{ns}

S = subcultivo.

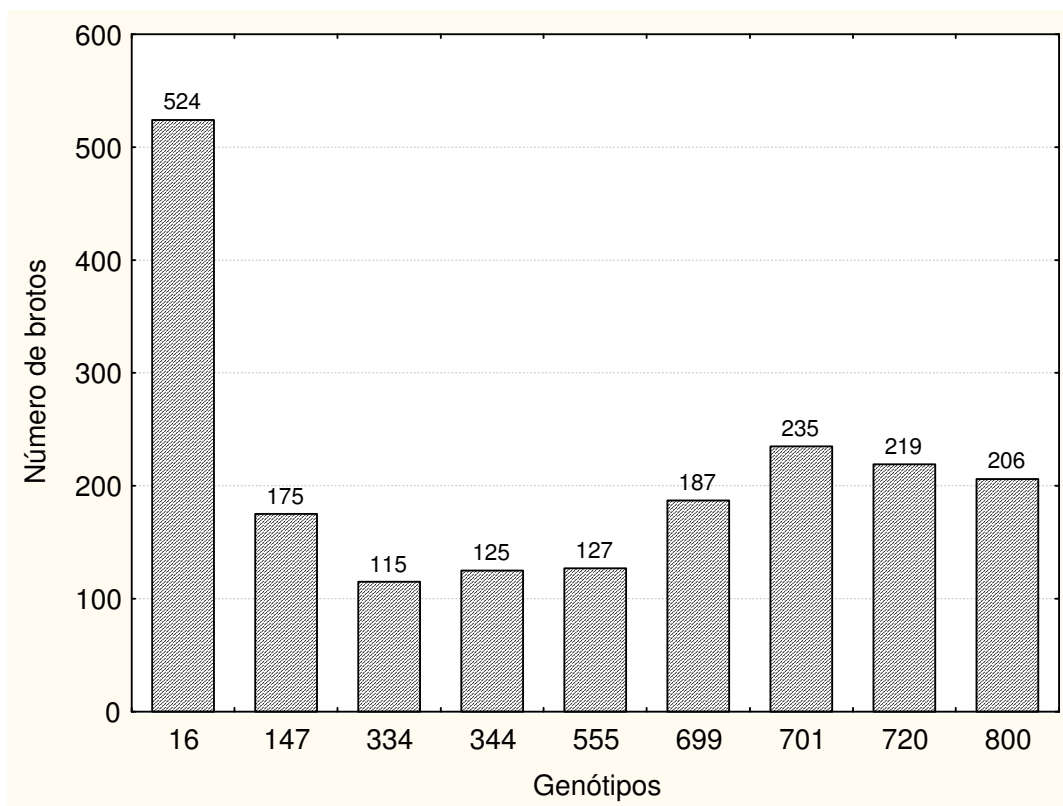


Figura 3. Número total de brotos formados ao final dos cinco subcultivos dos genótipos silvestres de *Ananas comosus* var. *comosus*.

No entanto ao se realizar a análise de componentes principais, considerando as variáveis CFD, NFV, NFS, que determinam o estado fisiológico das plantas, e os números de brotos nos 5 subcultivos, os resultados mostram 3 grupos bem definidos (Figura 4).

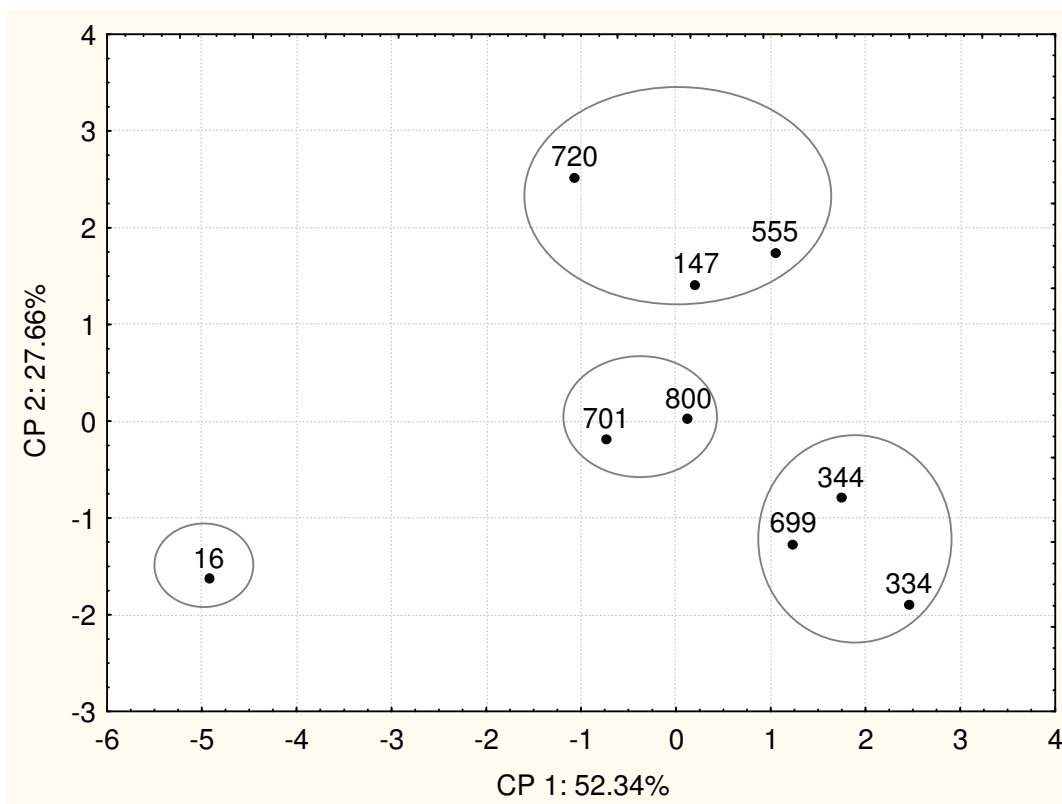


Figura 4. Dispersão gráfica dos escores em relação aos componentes principais (CP 1 e 2) de 9 acessos de *Ananas comosus* var. *comosus* oriundos do BAG *in vitro* de abacaxi considerando as variáveis comprimento da folha D, número de folhas verdes, número de folhas senescentes, percentagem de folhas senescentes e número de brotos nos cinco subcultivos.

No primeiro grupo estão incluídos os acessos BGA344, BGA699 e BGA334, com percentagens de folhas senescentes que variaram de 42,86% a 60,64% e número total de brotos nos cinco subcultivos que variaram de 115 a 187. No segundo grupo, se inserem os acessos BGA800 e BGA701 com percentagem de folhas senescentes de 30,50% e 37,61% respectivamente e números totais de brotos de 206 e 235, respectivamente, enquanto no terceiro grupo estão os acessos BGA720, BGA555 e BGA147 com percentagens de folhas senescentes de 15,99 % a 24,69% e valores de brotos totais de 127 a 219. O BGA16 apareceu isolado, certamente pelos elevados números de brotos totais obtidos, se comparado com os outros genótipos. De uma forma geral, é possível inferir que, mais do que o comprimento da folha D, a percentagem de folhas senescentes parece ser um fator de maior influência na multiplicação dos genótipos conservados, visto que, no grupo onde a percentagem de folhas

senescentes foi maior (BGA344, BGA699 e BGA334) houve menor produção de brotos. Os resultados desse trabalho deixam evidente a complexidade de se delinear um manejo mais racional para o BAG *in vitro* de abacaxi, considerando que todos os genótipos avaliados pertencem a mesma variedade botânica, porém mostraram comportamento diferenciado, tanto na conservação, quanto na transferência para as condições normais de crescimento.

Fica evidente a necessidade de se realizar esse tipo de trabalho com todos os acessos conservados a fim de determinar o melhor momento para a realização de cada subcultivo durante a conservação, garantindo a posterior viabilidade das plantas.

Uma estratégia interessante se constitui em ajustar e agrupar as variedades conservadas por tempo de conservação: seis, doze, dezoito e vinte e quatro meses, tempo máximo registrado para a conservação de abacaxi (SOUZA et al., 2006), estabelecendo-se dois períodos do ano para os trabalhos de repicagem, facilitando dessa maneira o manejo.

É importante fazer a diferença entre os acessos que entram em senescência em poucos meses, porque crescem muito rapidamente, e as variedades que se desenvolvem mal, e em pouco tempo as plantas estão em situação fisiológica comprometida. Em ambos os casos as plantas necessitam de repicagens com pouco tempo de cultivo. As causas são diferentes e geram duas situações que precisam ser consideradas: 1) o meio e as condições de cultivo estabelecidas não funcionaram para reduzir efetivamente o crescimento das plantas, e por isso elas crescem tão aceleradamente, que pode ser o caso do BGA699; 2) o meio e as condições de cultivo são insuficientes para que a planta se desenvolva, o que resulta no comprometimento das condições fisiológicas do acesso, como é o caso do BGA334 (Figura 5 A e 5B).

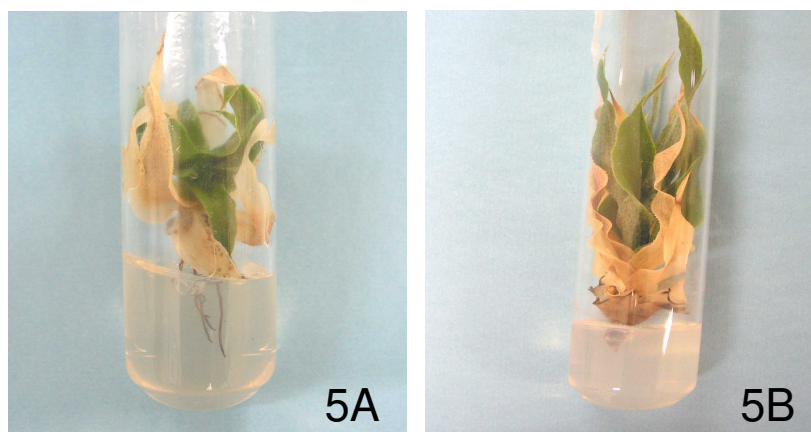


Figura 5. Planta do BGA334 após 5 meses de conservação (5A) e planta do BGA699 aos 6 meses de conservação (5B).

Essas duas situações geram estratégias diferentes para a solução desses problemas. Pode ser interessante o uso de inibidores de crescimento, como o ácido abscísico (ABA) que vem apresentando ação efetiva para algumas espécies. Em cana-de-açúcar, o uso de 1 mg.L^{-1} de ácido abscísico e de 20 g.L^{-1} de sacarose associadas às condições de temperatura reduzida (15°C) permitiu que os brotos permanecessem viáveis por um ano no mesmo meio de cultura, sem a necessidade de serem subcultivados (LEMOS et al., 2002).

Em abacaxi já foram testados, o Paclobutrazol, e o ácido abscísico, porém os resultados não foram muito animadores. O Paclobutrazol promoveu alterações morfológicas, que nas concentrações mais elevadas, persistiram até a fase de campo. Plantas com o formato de roseta, mostravam uma alteração morfológica não desejada (CANTO et al., 2004; SOARES et al., 2006). O ácido abscísico, por sua vez, afetou preferencialmente a coloração das folhas e reduziu pouco o crescimento, quando usado em baixas concentrações, enquanto que as doses mais elevadas foram deletérias para as plantas. Observou-se também um efeito residual desse regulador na emissão de brotos, afetando as taxas de multiplicação, posterior à conservação (SOARES et al., 2007). No entanto é preciso destacar que esses experimentos foram realizados com o híbrido PE x SC 73 não existindo até o momento nada registrado na literatura com genótipos silvestres.

CONCLUSÕES

Não houve influência do tempo de cultivo na viabilidade e nas taxas de multiplicação dos acessos conservados.

A relação entre o tempo de conservação e o estado fisiológico da planta é resultado de um forte componente genético associado às condições de cultivo estabelecidas para a conservação *in vitro*;

O manejo da coleção *in vitro* deve considerar a criação de grupos com tempos de conservação pré-estabelecidos de acordo com experimentos prévios, como o que foi realizado nesse trabalho, estabelecendo-se, a partir disso, três períodos de repicagens ao ano considerando o número de folhas senescentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. C. et al. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 363-366, abr./jun. 2000.

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**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 417-423, mar. 2001.

CABRAL, J.R.S. et al. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas, BA: Embrapa / CNPMF, 1998. 30p. (Documentos, 80).

_____. Representatividade dos acessos do banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. **Magistra**, Cruz das Almas, v.18, p.85. 2006. Número Especial.

_____; SOUZA, F. V. D. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi**. Cruz das Almas, BA: Embrapa/CNPMF, 2006.

CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 39, n. 7, p. 717-720, 2004.

DODDS J. H. ***In vitro* methods for conservation of plant genetic resources**. London: Chapman and Hall, 1991. p. 93-109.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation methods. In. FORD-LLOYD, B.V.; NEWBERRY, H.J.; CALLOW J.A. (Eds.). **Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use**. Wallingford: UK CABI, 1997. p. 119-162.

FIROOZABADY, E; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, n. 21, p. 844-850, 2003.

FUKUDA, W.M.G.; COSTA, I.R.S.; SILVA, S.O. **Manejo e conservação de recursos genéticos de mandioca (*Maniot esculenta crantz*) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Cruz das Almas, Bahia, EMBRAPA/CNPMF, 2005. (Circular técnica 74).

LEMOS, E. P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37 n.10, p.1359- 1364, out, 2002.
MALAURIE, B. et al. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Electron. J. Biotechnol**, v.1, n.3, p.26-27, dc. 1998.

MARTIN K.P.; PRADEEP A.K. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipea malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 2, p. 197-200. 2003.

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

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT**: user's guide, v.8.0. Cary, NC, 2000. 3v.

SOUZA, F.V.D.; CABRAL, J. R.S.; .*In vitro* conservation of pineapple germplasm at Embrapa Cassava and Fruits. **Pineapple News**, n. 11.p.21-22, may, 2004.

SOUZA, F.V.D. et al. Efeito da concentração de sais e do ácido abscísico na conservação *in vitro* do abacaxizeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo, 2005. 1 CD- Room.

SOUZA, F.V.D. et al. Minimum growth conditions in the conservation of pineapple germplasm *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Leuven. n. 702. p.90 -96, 2006a.

_____.Identification and selection of ornamental pineapple plants **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 702, p.93-99, feb. 2006b.

_____.Micropropagação. In: SOUZA, A. da. S.; JUNGHANS, T.G. (Eds). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 38-52.

_____. CABRAL; J.R.S.; BENJAMIM, D.A. Behavior of wild pineapple genotypes under *In vitro* conservation. **Pineapple News**. n.13, p. 10-12, may, 2006c.

SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. Acclimatization of pineapple plants from *in vitro* conservation. **Pineapple News**, n. 13.p.12-14, may, 2006.

_____.Efeito das condições de conservação *in vitro* no resgate e micropropagação de plantas de abacaxi. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas. v.13, p. 510, 2007. Suplemento.

STATSOFT, INC. STATISTICA. **Data analysis software system**: version 6. Disponível em: <www.statsoft.com. 2001> Acesso em: 10 nov. 2007.

TEXEIRA, J. B. et al. **Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 26 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 70).

VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS. M. C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (Passion Fruit). In: Y.P.S. BAJAJ (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. Springer Verlag, Berlin: Plant Protoplasts and Genetic Engineering, 1996. p. 108-119.

WITHERS LA. *In vitro* conservation and germplasm utilization. In: BROWN, A. H. D. et al (Eds.). **The use of plant genetic resources**. Cambridge: Cambridge University Press., 1989. p. 309-334.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O abacaxi está entre as fruteiras tropicais mais apreciadas em todo mundo e vem apresentando uma demanda crescente por novas variedades que possam se adaptar à diferentes regiões e sejam resistentes às doenças mais importantes da cultura. Dessa forma se faz necessário um programa de melhoramento genético robusto e que possa garantir a continuidade na geração de novos materiais.

Vale destacar também que novas ações de melhoramento genético estão sendo implementadas visando o desenvolvimento de variedades ornamentais, assim como se tem buscado fontes para a produção de fibras e fármacos a partir de variedades de abacaxi.

O Brasil sendo o centro de origem e diversidade do abacaxi, abriga em seu território uma variabilidade genética representativa dessa espécie, proporcionando os alicerces, tanto para a prospecção de novos materiais, como para os programas de melhoramento genético. A conservação e caracterização desse germoplasma se constituem no passo básico para o estabelecimento e a continuidade de um programa desse porte. As alternativas de conservação de germoplasma *in situ*, no entanto, tornam-se cada dia mais complicadas, devido principalmente à ocupação de grandes áreas de ocorrência desses materiais, demandando, dessa forma, ações voltadas para a conservação *ex situ* desse germoplasma. A conservação e a caracterização do germoplasma devem estar alinhados com o melhoramento genético da espécie.

A realização do presente trabalho, com foco principal em variedades silvestres, buscou gerar informações que pudessem auxiliar, tanto na geração de novas variedades, por meio da produção de mudas em larga escala, quanto na conservação *in vitro* do germoplasma de abacaxi. A micropropagação de variedades silvestres e a conservação *in vitro* são técnicas de cultura de tecidos que estão sendo utilizadas com êxito em várias espécies vegetais.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a estratégia de estiolamento promove uma melhoria significativa na micropropagação de *Ananas*

comosus var. *ananassoides* quando comparado com o cultivo de gemas axilares. Esses resultados sinalizam um potencial que pode ser melhor explorado pela realização de novos ensaios, avaliando, por exemplo, diferentes meios de cultura. A importância dessa variedade silvestre no melhoramento genético para abacaxis ornamentais justifica a realização de trabalhos de ajustes para esse protocolo.

Outro aspecto que deve ser considerado nas coleções mantidas *in vitro* é a viabilidade das plantas após a conservação, uma vez que as condições estabelecidas buscam a redução do crescimento por períodos prolongados por meio da redução da atividade metabólica das plantas. Os efeitos dessas condições sobre a posterior viabilidade da planta são ainda pouco conhecidos. Os resultados obtidos não mostraram uma correlação da viabilidade com o tempo, o que pode ser justificado pelo tempo máximo de conservação avaliado nesse trabalho, que foi de doze meses, provavelmente pouco para acusar uma correlação positiva. Fica bem evidente, no entanto, a dependência em relação ao genótipo, demandando novos experimentos que possam aumentar o tempo de conservação de alguns genótipos, como é o caso do BGA334.

Para facilitar o manejo do banco, no entanto, não basta aumentar o tempo de conservação de cada genótipo, mas agrupar vários genótipos em um mesmo intervalo de repicagem, assim como são necessários trabalhos que possam medir o efeito da conservação em plantas adultas e em fase de campo.