

ELEQUISANDRA DA COSTA ARARUNA LIMA

The image shows the coat of arms of the Universidade Federal do Acre (UFAC). It features a golden crown at the top, a shield divided vertically into blue and white halves with the letters 'U' and 'F' on top and 'A' and 'C' on the bottom, and a red star at the bottom center. The shield is flanked by two silver chains.

**PROPAGAÇÃO CLONAL *IN VITRO* DE ABACAXIZEIROS EM
SISTEMA DUPLA-FASE E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA
SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO**

RIO BRANCO

2009

ELEQUISANDRA DA COSTA ARARUNA LIMA

PROPAGAÇÃO CLONAL *IN VITRO* DE ABACAXIZEIROS EM
SISTEMA DUPLA-FASE E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA SOB
REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilson Gomes Mesquita
Co-orientador: Prof. Dr. Jonny E. Scherwinski-Pereira

RIO BRANCO

2009

© LIMA, E. C. A. 2009.

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Acre

L732m LIMA, Elequisandra da Costa Araruna. Propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiros em sistema Dupla-Fase e conservação de germoplasma sob regime de crescimento mínimo. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica - Produção Vegetal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilson Gomes
Co-Orientador: Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

1. *Ananas comosus* L. Merr, 2. Micropropagação, 3. Sistema Dupla-Fase, 4. Enraizamento, 5. Aclimatização, 6. Conservação *in vitro*, I. Título

CDU 634.774

**PROPAGAÇÃO CLONAL *IN VITRO* DE ABACAXIZEIROS EM
SISTEMA DUPLA-FASE E CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA
SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

APROVADA em _____ de 2009

Prof. Dr. Antonio Gilson Gomes Mesquita

UFAC

Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Embrapa Cenargen

Dr^a. Andréa Raposo

Embrapa

Acre

Prof. Dr. Antonio Gilson Gomes Mesquita
(Universidade Federal do Acre)
(Orientador)

Prof. Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(Co-Orientador)

RIO BRANCO
ACRE - BRASIL

OFEREÇO

A todos os familiares e amigos

Aos meus pais: Raimunda e Antonio ;

Ao meu irmão: Charles ;

Aos meus filhos: Lucas e Davi

Ao meu Co-orientador: Jonny Everson

**Por acreditarem, apoiarem, e
me incentivarem nesta nova etapa.**

Essa vitória é nossa!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida em todos os momentos.

Em especial a minha, grande amiga, lutadora e incomparável mãe Raimunda Araruna por estar sempre ao meu lado em todos os momentos difíceis, sempre me incentivado e acreditando no meu crescimento profissional e pessoal. Pelo exemplo, educação, apoio, amor incondicional, carinho, amizade eterna, compreensão e incentivo durante toda a minha vida, em fim, por tudo... E por ser minha referência de vida diária. Te amo!!

Em especial aos homens da minha vida: meu pai Antonio Coutinho, meu irmão Charles Araruna e meus filhos Davi Araruna e Lucas Araruna por estarem sempre ao meu lado e acreditarem em meu potencial e me incentivarem a seguir em frente e por compreender minha ausência e momentos de estresse. Amo vocês!

Em especial ao meu Co-orientador, professor e grande pesquisador, Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira pela maneira sábia de me orientar, com sinceridade, companheirismo, dedicação e boa vontade. Meu muito obrigada!

A grande amiga Simone Maciel pela generosidade, prestatividade nas trocas de experiências e por me ajudar nos experimentos no laboratório (LABMOL). Obrigada Si!

A minha grande amiga e companheira de mestrado, Janiffer Oliveira pela ajuda nos momentos difíceis, pelas trocas de conhecimentos e por ouvir meus desabafos. Obrigada amiga!

À Universidade Federal do Acre, especialmente ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal e todo o corpo docente, pela oportunidade de realização do mestrado.

A toda a equipe do LABMOL, nas pessoas de: Janiffer Oliveira, Luis Gustavo, Lívia Renata, Raifany, Suzana, Simone Maciel, Tatiane Loureiro, Vanessa Silva (bolsistas), Karina Martins, Daniela Bittencurt (pesquisadoras) pelo apoio e companheirismo durante todo o trabalho.

Ao meu orientador Dr. Antonio Gilson Gomes Mesquita por aceitar me orientar.

A pesquisadora Dr^a. Andréa Raposo por contribuir com seus conhecimentos na banca avaliadora.

A professora Dr^a. Regina Lúcia Félix Ferreira, pelo seu apoio e palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

Aos professores: Dr. Sebastião Elviro de Araújo Neto e Dr. Jorge Ferreira Kusdra, por seu ensinamento e sugestões ao longo do trabalho.

A Embrapa Acre, pela oportunidade de desenvolver as atividades em seu campus experimental e utilizar das suas instalações.

A todos os colegas da turma da pós-graduação que estiveram comigo nessa caminhada.

A todas as pessoas que participaram, diretamente ou indiretamente, para esta conquista.

MUITO OBRIGADA!

"Os grandes navegadores devem sua
reputação aos temporais e tempestades".

Epicuro

RESUMO

A cultura do abacaxizeiro ocupa lugar de destaque em regiões de clima tropical, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial. O uso de mudas produzidas convencionalmente pode acarretar problemas para os plantios comerciais, devido à baixa qualidade das mesmas. Por isso, é de fundamental interesse que plantas de alta qualidade genética e fitossanitária sejam produzidas. A micropropagação é uma alternativa para a produção de mudas de abacaxizeiros de qualidade, em larga escala, curto período de tempo e espaço físico reduzido. O objetivo deste trabalho foi produzir um protocolo para a propagação clonal *in vitro* em larga escala de variedades de abacaxizeiros em Sistema Dupla-Fase, além de desenvolver metodologia para a conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxizeiros sob regime de crescimento mínimo. O trabalho foi conduzido no LABMOL e anexos da Embrapa Acre. Como fonte de explantes para os experimentos foram utilizadas gemas axilares de brotações do tipo filhote das variedades Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) e Quinarí (QN), estabelecidos *in vitro*. Num primeiro experimento, brotações foram colocadas para se desenvolver em 40 mL de meio de cultura em dois sistemas de cultivo: Convencional (meio semi-sólido) e Dupla-Fase. No Sistema Dupla-Fase, a cada subcultivo de 30 dias foi adicionado 30 mL de meio líquido sobre o meio semi-sólido inicial, enquanto que no tratamento convencional (semi-sólido) as avaliações e as brotações formadas foram transferidas para novos meios de consistência semi-sólida a cada subcultivo. Foi avaliada a taxa de multiplicação, altura de brotações maiores e menores que 0,5 cm, além da estimativa do número de mudas a serem produzidas em razão do tempo de multiplicação. Ao final do processo de multiplicação, as brotações foram enraizadas em diferentes composições do meio de MS (Pleno e ½) e concentrações de AIB (0; 0,1; 0,5 mg.L⁻¹), sendo em seguida aclimatizadas em viveiro. Brotações de abacaxizeiro também foram avaliadas quanto à conservação *in vitro* por seis meses em meio de cultura de MS e sob três temperaturas: 15 °C, 20 °C e 25 °C. De maneira geral, observou-se que o sistema Dupla-fase foi superior ao semi-sólido em relação a todas as variáveis avaliadas. A produção total de brotações a partir de oito explantes iniciais e após 150 dias de cultivo no Sistema Dupla-Fase, para as variedades RB, SG e QN foi de 488,2; 419,3; e 341,8, respectivamente. Estes

valores foram significativamente superiores aos observados quando o cultivo ocorreu em sistema convencional (meio semi-sólido), que foi de 299,8; 289,7 e 206,8 respectivamente. A partir dos resultados obtidos em Sistema Dupla-Fase, estimou-se a taxa potencial de multiplicação de até 7.465 novas brotações por explante para a variedade RB, 5.329 para a SG e 5.055 para a QN ao final de um segundo subcultivo de 150 dias. Independentemente das concentrações de AIB e dos sais do meio de MS testadas, de maneira geral não foram observadas diferenças nas taxas de enraizamento *in vitro* das brotações, que alcançaram valores próximos a 100%. As brotações enraizadas quando aclimatizadas em viveiro apresentaram 100% de sobrevivência. Quando se avaliou a conservação das brotações verificou-se que a temperatura de 15 °C foi a que proporcionou os menores índices de crescimento, podendo ser indicada para a conservação ou manutenção de germoplasma de abacaxizeiro *in vitro*.

Palavras-chave: *Ananas comosus* L. Merr.; Micropropagação; Sistema Dupla-Fase, Enraizamento; Aclimatização; Conservação *in vitro*.

ABSTRACT

Pineapple is a prominent crop in tropical areas, including Brazil, the second country in production. Propagative plant material produced conventionally can cause problems for commercial pineapple plantations, due to the low phytosanitary quality of the plantlets. Thus, it is of fundamental interest to produce plantlets with high genetic and phytosanitary quality to producers. Micropropagation is an alternative for plantlets production with quality, in wide scale, short period of time and reduced physical space. The objective of this work was to produce a protocol for *in vitro* clonal propagation of pineapple plantlets in Double-Phase Culture System, besides developing a methodology for *in vitro* conservation of pineapple genotypes under minimum growth. The work was carried out in the Laboratory of Plant Tissue Culture and Molecular Biology and nursery of Embrapa Acre, Rio Branco, AC. As source of explants, it was used axillary buds established *in vitro* from Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) and Quinarí (QN) genotypes. In a first experiment, microshoots were placed into 40 mL culture medium and two conditions of *in vitro* multiplication: Conventional (semi-solid medium) and Double-Phase Culture System. On Double-Phase System, in each subculture of 30 days 30 mL of liquid culture was added on the semi-solid medium, while in the conventional treatment (semi-solid medium) the evaluations and the regenerated shoots were transferred into new medium of semi-solid consistency. It was evaluated the multiplication rate, shoot height (larger and smaller than 0.5 cm), besides to estimate the number of plantlets to be produced during the time of multiplication. At the end of the multiplication process, the microshoots were rooted in different compositions of MS salts (Full and ½), and concentrations of IBA (0; 0.1; 0.5 mg.L⁻¹). Rooting shoots were acclimatized in nursery. Pineapple microshoots were evaluated for *in vitro* conservation during six months in MS medium under three temperatures: 15 °C, 20 °C and 25 °C. It was observed that Double-Phase System was superior to Semi-Solid medium. The total microshoots production from eight initial explants and after 150 days in Double-Phase System for RB, SG and QN varieties reached 488.2; 419.3 and 341.8 microshoots, respectively. These means were significantly higher than those observed when the multiplication happened in the conventional system (semi-solid

medium), that it was 299.8; 289.7 and 206.8 microshoots, respectively. From these results obtained, it was estimated the potential rate of microshoots multiplication: 7,465 for RB variety, 5,329 for SG variety and 5,055 for QN variety, at the end of more 150 days of cultivation. Independently of the IBA and MS salts concentrations, in general, it was not observed differences on *in vitro* microshoots rooting which reached almost 100%. When acclimatized in nursery the microshoots rooting presented 100% survival. During the *in vitro* conservation, it was verified that the temperature of 15 °C provided the smallest shoot growth, should be indicated for conservation or maintenance of *in vitro* pineapple germplasm.

Key-words: *Ananas comosus* L. Merr.; Micropropagation; Double-Phase Culture System; Rooting; Acclimatization; Conservation *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Frutos abacaxi da variedade (A) Smooth Cayenne e (B) Pérola.....	24
FIGURA 2	- Variedades de abacaxi recomendadas para o estado do Acre.....	26
FIGURA 3	- Planta de abacaxi adulta, e os diversos tipos de mudas convencionais. (fonte Embrapa, 2006).....	27
FIGURA 4	- Concentrações de N ⁶ -Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L ⁻¹) sobre as taxas de multiplicação total por parcela (número total de brotações formadas a partir de cinco explantes iniciais) nas variedades de abacaxizeiros Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) e Quinari (QN) em Sistema Dupla-Fase. Embrapa Acre, 2007.....	54
FIGURA 5	- Efeito de concentrações de N ⁶ -Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L ⁻¹) sobre o número de brotações formadas por parcela (número total de brotações formadas a partir de cinco explantes iniciais) entre as variedades de abacaxizeiros Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) e Quinari (QN) em Sistema Dupla-Fase. Embrapa Acre, 2007.....	56
FIGURA 6	- Influência de concentrações de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L ⁻¹) sobre o número de brotações produzidas <i>in vitro</i> por explante em três variedades de Abacaxizeiro: SG - Senador Guimard; RB – Rio Branco e QN – Quinari (Subcultivo 1) e potencial estimado de brotações a serem produzidas (Subcultivo 2), após novo subcultivo de 150 dias em Sistema de Cultivo Dupla-Fase. Embrapa Acre, 2007.....	59
FIGURA 7	- (A) Brotos de abacaxizeiro (B) Brotos de abacaxizeiros limpos para experimento Dupla-fase (C) Experimento Dupla-fase. Embrapa 2007.....	60
FIGURA 8	- Propagação clonal <i>in vitro</i> de abacaxizeiro, em sistema dupla-fase com doses: 0; 2; 4 e 6 mg. L ⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L ⁻¹ de ANA,	

	respectivamente. Broto de abacaxi estabelecido, (A) cv Senador Guimard (SNG-3) cv Rio Branco (RBR-1), e cv Quinarí (SNG-2). Embrapa, 2007.....	61
FIGURA 9	- Brotos de abacaxi em sala de crescimento, para enraizamento Embrapa, 2007.....	65
FIGURA 10	- Brotos de abacaxizeiros conservados em BOD na temperatura de 15 °C, 20 °C e 25 °C após de 6 meses. 15 °C figuras:(A e D) 20 °C figuras(B e E) e 25 °C figuras(C, F, G e H) Embrapa, 2007.....	68
FIGURA 11	- (A) Planta de abacaxi em tubete plástico de 115 cm ³ , preenchido com substrato (terra de encosta, vermiculita e esterco bovino); (B) Plantas de abacaxizeiros em condições de viveiro, coberto com filme de polietileno transparente (150 µm) e sombrite (50% de interceptação luminosa), após 50 dias. Embrapa, 2007.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Características botânico- agronômicas das variedades de abacaxi recomendadas para o estado do Acre.....	25
TABELA 2	- Taxas de multiplicação e tamanho de brotações maiores e menores que 0,5 cm por parcela ⁺ (a partir de oito explantes iniciais) e por explante ⁺⁺ (a partir de um único explante) das variedades de abacaxizeiro Rio Branco (RB), Senador Guiomard (SG) e Quinari (QN), propagadas em meios de cultura de consistência semi-sólida (S.S.) (Sistema convencional) e Dupla-fase (D.F.), após quatro subcultivos de 40 dias cada*. Embrapa Acre, 2007.....	50
TABELA 3	- Efeito de diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,1 e 0,5 mg.L ⁻¹) e da concentração de sais do meio de MS (MS ½ e MS Pleno) sobre a percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes (cm) nas variedades de abacaxizeiro Rio Branco, Senador Guiomard e Quinari. Embrapa Acre, 2007.....	64
TABELA 4	- Influência da temperatura de conservação (15 °C, 20 °C e 25 °C) sobre a altura (cm), número total de folhas, número de folhas vivas e número de folhas mortas em três variedades de abacaxizeiro: Rio Branco, Quinari e Xapuri, após 3 e 6 meses de manutenção <i>in vitro</i> . Embrapa Acre, 2007.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - 3-indolacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA – Ácido naftalenoacético

Atm – Pressão atmosférica

BAP – N⁶ – Benzilaminopurina

D.F – Dupla-Fase

FAEP – Federação da Agricultura do Estado do Paraná

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas

MS – Meio de cultura formulado por Murashige and Skoog, 1962

PBZ – Paclobutatról

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

S.S – Sistema-Sólido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 CULTURA DO ABACAXIZEIRO.....	23
2.2 PROPAGAÇÃO DA CULTURA.....	26
2.2.1 Propagação convencional.....	28
2.2.2 Propagação por cultura de tecidos ou Micropropagação	28
2.3 MEIOS NUTRITIVOS.....	30
2.4 CULTURA GEMAS LATERAIS E TERMINAIS.....	30
2.5 ENRAIZAMENTO.....	34
2.6 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS.....	37
2.7 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA <i>IN VITRO</i>	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS E MATERIAL PROPAGATIVO UTILIZADO.....	41
3.2 ESTABELECIMENTO DO MATERIAL <i>IN VITRO</i>	41
3.3 ENSAIOS EXPERIMENTAIS.....	42
3.3.1 Avaliação da propagação clonal <i>in vitro</i> de abacaxizeiros em Sistema Dupla Fase.....	42
3.3.1.1 Experimento 1. Análise comparativa de sistemas de multiplicação clonal <i>in vitro</i> de abacaxizeiros.....	42
3.3.1.2 Experimento 2. Estimativa da produção de mudas <i>in vitro</i> de abacaxizeiros em Sistema Dupla-Fase.....	43
3.4 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE GENÓTIPOS DE ABACAXIZEIROS MULTIPLICADOS <i>IN VITRO</i>	44
3.5 CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIROS SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO.....	45
3.6 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS DE ABACAXIZEIROS PRODUZIDAS <i>IN VITRO</i>	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 AVALIAÇÃO DA PROPAGAÇÃO CLONAL <i>IN VITRO</i> DE ABACAXIZEIROS EM SISTEMA DUPLA-FASE.....	48

4.1.1 Análise comparativa de sistema de avaliação clonal <i>in vitro</i> de abacaxizeiros.....	48
4.1.2 Estimativa da produção de mudas <i>in vitro</i> de abacaxizeiros em Sistema de cultivo Dupla-Fase.....	51
4.2 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES VARIEDADES DE ABACAXIZEIROS.....	62
4.3 CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIROS SOB REGIME DE CRESCIMENTO MINIMO.....	65
4.4 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS DE ABACAXIZEIROS PRODUZIDAS <i>IN VITRO</i>	68
5 CONCLUSÃO.....	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A eficiência de qualquer sistema de produção agrícola depende do conhecimento básico referente às características relacionadas ao produto com que se deseja trabalhar, tais como a adaptabilidade edafoclimáticas e condições de cultivo.

No caso das frutas, o Brasil, com sua vastidão territorial, apresenta uma grande diversidade nas condições ambientais, tendo condições climáticas e de solo para expandir ainda mais sua produção. O País é o terceiro maior produtor mundial de frutas, depois da China e da Índia, e o décimo quinto exportador, devido a um significativo consumo interno (IBRAF, 2008).

A fruticultura é uma atividade bastante promissora para o desenvolvimento do setor agropecuário no Brasil, apresentando um ambiente favorável ao seu crescimento. Além de geralmente poder ser desenvolvida em pequenas propriedades rurais, sendo esta atividade uma das mais rentáveis e que emprega grande quantidade de mão-de-obra (FAEP, 2006).

Neste contexto, a produção de frutas tropicais apresenta grande importância, tanto para o mercado interno, como para externo, destacando-se as culturas da laranja, banana, tangerina, mamão e abacaxi. Mas para que o Brasil tenha maior destaque no mercado internacional de frutas tropicais é necessária uma constante melhoria nos sistemas de cultivo destas espécies, especialmente voltados à qualidade e produtividade, sem desconsiderar a sustentabilidade dos sistemas (TIBOLA, 2004).

O abacaxi é uma fruta tropical muito apreciada mundialmente pelo seu aroma e sabor acentuado. Além de apresentar propriedades medicinais e alto valor nutricional (ANTONIALI e SANCHES, 2008). Dados da FAO (2008) indicam que a produção mundial de abacaxi em 2006 foi de aproximadamente 18,2 milhões de toneladas. Cerca de 60% dessa produção concentrou-se nos seis principais países produtores: Tailândia (15%), Brasil (14%), Filipinas (10%), China (8%), Índia (7%) e Costa Rica (7%).

Apesar de diversos fatores influenciarem a produtividade, qualquer que seja a espécie vegetal, a produção de mudas se constitui em um dos itens mais importantes do cultivo. Por isso, o sucesso de empreendimentos agrícolas, em

grande parte, depende da qualidade e sanidade das mudas utilizadas, sendo que estas quase sempre apresentam resistência a uma série de doenças e pragas que trariam prejuízos ao plantio e a produção (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003).

Em abacaxizeiro, a produção de mudas pode ser feita pela via sexuada ou assexuada. A primeira é baseada no uso de sementes, que só se justifica em trabalhos de melhoramento genético, quando se pretende obter novas variedades (RUGGIERO et al. 1994a). Giacomelli e Sobrinho (1982) comentam, ainda, que a produção de sementes é indesejada tendo em vista a industrialização do abacaxi em fatias. Para León (1984), a reprodução sexual é dificultada pelo fato da cultura apresentar autoincompatibilidade, exigindo, assim, cruzamentos intervarietais para a produção de sementes, fato que, segundo Fachinello et al. (1995), causa uma variação induzindo o surgimento de novas variedades, pela ocorrência de divisões meióticas e segregação de caracteres.

Assim, a via assexual é a mais comumente utilizada na cultura do abacaxizeiro para a produção de mudas, podendo-se usar partes vegetativas da planta como a coroa, mudas filhote e rebentão para a regeneração de plantas completas (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003).

No entanto, o uso de mudas produzidas convencionalmente pode acarretar problemas para os plantios, devido à baixa qualidade que estas apresentam, principalmente relacionadas às pragas da cultura, em especial, a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans*, considerada a principal doença do abacaxizeiro no Brasil (SANCHES, 1999). Assim, mesmo que novas áreas sejam utilizadas para plantios, se as mudas forem produzidas de materiais infectados, a plantação apresentará problemas fitossanitários, podendo comprometer a futura produção.

Técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo largamente aplicadas para a propagação de diversas culturas, não só pela possibilidade de obter plantas de qualidade fitossanitária superior, mas também pela rápida propagação clonal *in vitro*. No caso do abacaxizeiro, tais técnicas estão sendo utilizadas comercialmente como uma importante ferramenta visando à produção e distribuição de mudas, em quantidade e qualidade genética e fitossanitária (ALBUQUERQUE, 1998). Segundo Barboza et al. (2004), a cultura de tecidos permite a produção de milhares de mudas de abacaxizeiro a partir de uma única gema em pequeno período de tempo e totalmente livres de problemas fitossanitários.

Contudo, diversos trabalhos com multiplicação *in vitro* de diferentes cultivares de abacaxizeiro demonstram haver grande variação no número final de plantas produzidas, havendo necessidade de adequar protocolos de micropropagação para cada cultivar, sobretudo no que se refere à utilização de concentrações adequadas dos reguladores de crescimento (COSTA et al., 2007) .

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) alguns genótipos apresentam boa adaptação a diferentes meio de cultura, enquanto outros necessitam de modificações para cada clone ou grupo de clones, havendo a possibilidade de que a adição de reguladores de crescimento supra as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios dos explantes isolados da planta matriz.

Outro fator a ser considerado é o estado físico do meio de cultivo. A utilização de meios de cultura de consistência líquida, testados em diversas espécies vegetais como o abacaxi, a banana e a cana de açúcar, tem proporcionado igual ou superior eficiência do que os meios semi-sólidos (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003). Ainda, segundo estes autores, têm sido crescente o interesse pelo cultivo em meios de consistência líquida devido à facilidade no preparo e manipulação do meio de cultura, eliminação do Agar, componente que possui custo elevado, e pela possível utilização de menor volume de meio de cultura. Porém, deve-se ter certeza da sanidade do material vegetal a ser utilizado, pois nesse sistema um único explante contaminado pode disseminar aos demais brotos (LEVIN et al., 1997; ESCALONA et al., 1999).

Juntamente com a multiplicação *in vitro* é de grande importância a conservação dos recursos genéticos vegetais, frente ao atual cenário de destruição ambiental e, também das intempéries que ocorrem em materiais mantidos sob condições de campo. Desta forma, é imperativo priorizar e desenvolver novas estratégias para a conservação dos genótipos em bancos de germoplasma, como a manutenção de coleções *in vitro*, para assegurar o acesso facilitado dos melhoristas de plantas, além de manter seguro os recursos genéticos do país. Além disso, dependendo da espécie a ser conservada, a manutenção *in vitro* pode facilitar a rápida e multiplicação de cultivares de interesse (AMARAL, 2005; CAMILLO et al., 2009), como é o caso do abacaxizeiro (BALZON et al., 2008).

Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir um protocolo para a propagação clonal *in vitro* em larga escala de variedades de abacaxizeiros recomendados para as condições ambientais da Amazônia Sul Ocidental, a partir de Sistema Dupla-

Fase, além de desenvolver metodologia para a conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxizeiro sob regime de crescimento mínimo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO ABACAXIZEIRO

O termo abacaxi vem do tupi guarani que significa planta cheirosa (CUNHA, 2005). Pertencente a família bromeliácea, do gênero *Ananas* o abacaxizeiro é uma planta perene e auto-estéril. Produz um único fruto situado no ápice, com ramificação lateral do talo, onde aparecem outros frutos. Seu ciclo natural pode variar de 10 a 36 meses (EMBRAPA, 2007).

O abacaxizeiro é uma fruteira de clima tropical de destacada expressão econômica. Seu fruto é muito apreciado em várias regiões do mundo, constituindo-se num dos principais produtos da fruticultura internacional (ARAÚJO et al., 2009), sendo a Tailândia o maior produtor mundial com 2.320, seguido pelo Brasil que produziu, no mesmo período (2007), 2.266 toneladas (FAO, 2008).

Os principais estados brasileiros produtores de abacaxi, em 2007, foram o Pará com 695.099 toneladas, a Paraíba com 630.560 e Minas Gerais com 597.895 toneladas (IBGE, 2008). No estado do Acre o abacaxi é a quarta espécie frutífera mais produzida (IBGE, 2006).

As condições brasileiras para a produção de abacaxi apresentam vantagens comparativas em relação aos países concorrentes, devido às condições climáticas favoráveis, boas condições do solo, além da ampla disponibilidade de áreas (MORGADO, AQUINO e TERRA, 2004). No estado do Acre a cultura do abacaxizeiro pode ser uma alternativa para o agricultor, devido à forte demanda do mercado consumidor regional, possibilidade de consorciação com outras culturas e por se adaptar bem às condições climáticas locais (CAVALCANTE et al., 2001).

O que mais prejudica a comercialização e a abertura de novos mercados no Brasil é a baixa qualidade do produto devido, principalmente, à qualidade das mudas, que é fundamental para a cultura do abacaxizeiro, devido aos problemas fitossanitários. Entre estes problemas, incluem-se a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *Ananas* e a cochonilha (*Pseudococcus brevipes*), cujas estimativas de perdas em lavouras de abacaxi, causadas pela ocorrência dessas

doenças, em nível nacional, é de cerca de 50% podendo chegar a 100% em algumas regiões (SANTOS et al., 2002).

A maior produção mundial de frutos é obtido pelas cultivares Smooth Cayenne e Pérola (REINHARDT et al., 2002; ARAÚJO et al., 2009). Os frutos da cultivar Smooth Cayenne (Figura-1a) são cilíndricos, com coroa pequena, peso entre 1,5 e 2kg, de polpa amarela, adequado à industrialização e à exportação. A cultivar Pérola (Figura-1b), possui porte médio e crescimento ereto, é vigorosa, com folhas com cerca de 65 cm de comprimento e espinhos nas bordas. O pedúnculo do fruto é longo (em torno de 30 cm). Produz muitos filhotes (5 a 15) presos ao pedúnculo, próximos da base do fruto, o qual apresenta forma cônica, casca amarelada (quando maduro), polpa branca, sucosa, e o fruto pesa de 1,0 kg a 1,5 kg (EMBRAPA, 2002).

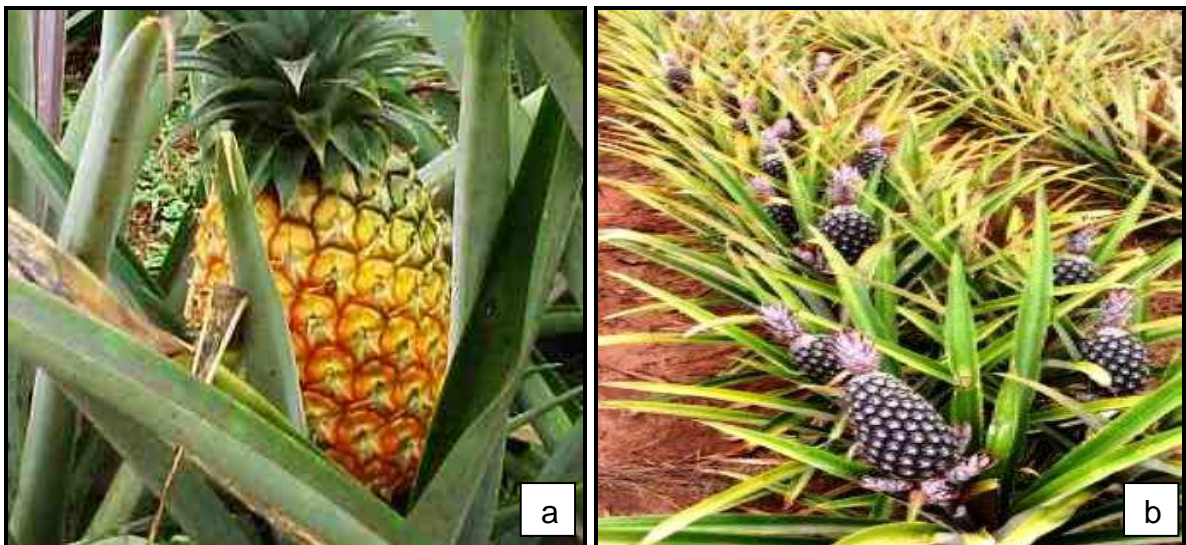


FIGURA 1 Frutos de abacaxi da variedade (a) Smooth Cayenne (fonte: FAPESP, 2009) e (b) Pérola (fonte: Cunha, 2003).

Em 1992 a Embrapa Acre caracterizou (Tabela 1) e recomendou as variedades RBR-1, RBR-2, SNG-2 e SNG-3 (Figura 2). Já em 1994 foi realizada nova caracterização que incluiu as variedades RBR-1 (Rio Branco), RBR-2 (Cabeça-de-Onça), RBR-3 (Rio Branco-3), SNG-1 (Senador Guimard), SNG-2 (Quinari), SNG-3 (Senador Guimard-3), RBS-1 (Brasiléia), Gigante de Tarauacá e Pérola do Acre e na oportunidade implantou o banco de germoplasma local.

TABELA 1 Características botânico- agronômicas das variedades de abacaxi recomendadas para o estado do Acre

Características	Variedades			
	RBR-1 (Rio Branco)	RBR-2 (cabeça-de-onça)	SNG-2 (Quinari)	SNG-3 (Senador Guimard)
Porte da planta	semi-ereto	tendência horizontal	ereto	tendência horizontal
Cor da folha	verde	Verde-arroxeadada	verde	Verde
Número de filhotes	8	9	12	10
Forma do fruto	cilíndrica	cilíndrica	cilíndrica	Cilíndrica
Coloração externa do fruto	alaranjada	alaranjada	amarela	Amarela
Brix (%)	13,6	12,0	13,4	13,3
Acidez(ml NaOH 0,1 N)	7,2	7,3	10,1	11,1

Fonte: FAZOLIN et al., 2001



FIGURA 2 - Variedades de abacaxi recomendadas para o estado do Acre (Embrapa, 2001).

2.2 PROPAGAÇÃO DA CULTURA

O sucesso na exploração comercial, principalmente de plantas frutíferas, depende, basicamente, da qualidade do material propagativo utilizado (NASCENTE 2005). É de suma importância a obtenção de lavouras uniformes, com a seleção de plantas matrizes em bom estado fitossanitário, e altamente produtivas para o sucesso econômico da cultura do abacaxizeiro (GOTTARDI et al., 2001).

A reprodução do abacaxizeiro pode ser feita pela via sexuada ou assexuada. A via sexuada, baseada no uso de sementes só se justifica nos trabalhos de melhoramento genético da espécie pela segregação de caracteres. A maioria das espécies de *Ananas* são consideradas como alógamas, podendo ser hibridizadas por diversas outras espécies do gênero em condições naturais ou artificiais.

Sementes foram estudadas para uso no melhoramento genético com o objetivo de se obter novas variedades (FIGUEIREDO et al, 2003). Além disso, a produção de sementes é indesejada tendo em vista a industrialização do abacaxi ser feita em fatias. Assim, a produção de mudas pela via sexuada em escala comercial é desaconselhável pela variabilidade induzida no material em razão da ocorrência de divisão meiótica e possível segregação de caracteres (SOUZA et al., 2003).

A via assexuada (vegetativa) é a mais comumente utilizada para a produção de mudas comerciais na cultura do abacaxizeiro. Podem-se usar partes vegetativas da planta (Figura 3) como a coroa, filhote rebentão e rebentão (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003). Pode-se, ainda, utilizar outras estruturas, como as seções do caule contendo gemas e pedaços de entrenós (Figura 3), ou ainda, induzir brotos laterais em plantas adultas, ou utilizar fragmentos da planta para induzir múltiplas brotações a partir de técnicas da cultura de tecidos de plantas, também conhecida como cultivo *in vitro*.

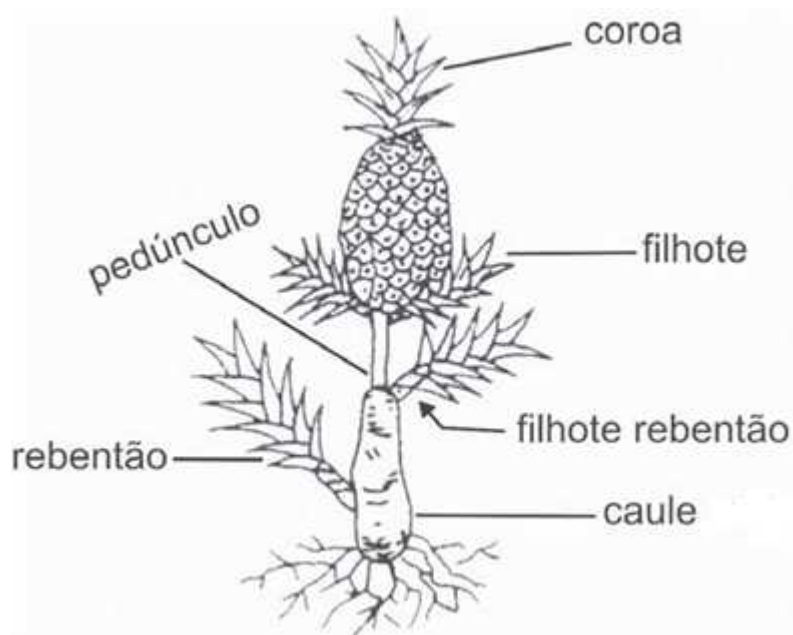


FIGURA-3. Planta de abacaxi adulta, esquema mostrando os diversos tipos de mudas convencionais. (fonte NASCENTE, 2005).

2.2.1 Propagação convencional

Apesar de teoricamente as diferentes partes da planta apresentarem condições de serem utilizadas, alguns genótipos podem apresentar maior ou menor abundância de partes propagativas, fato que pode facilitar sua multiplicação. A variedade Pérola (Figura 1B), por exemplo, é normalmente propagada a partir de mudas do tipo filhote, devido à produção abundante deste tipo de propágulo, enquanto na variedade Smooth Cayenne (Figura 1A) a propagação é mais rotineiramente feita a partir de propágulos tipo filhote rebentão, devido a pouca produção de partes vegetativas tipo filhotes (GIACOMELLI e SOBRINHO, 1982).

O uso da coroa do fruto como propágulo vegetativo para a produção de mudas, apesar de viável, é restrito devido ao fato desta porção ser, normalmente, comercializada com o fruto, bem como pela maior demora das plantas formadas a partir deste propágulo em iniciar a produção (CUNHA, 2003).

A multiplicação do abacaxizeiro pode ser feita, também, por meio do enviveiramento de seções do talo da planta, ou das mudas, contanto que cada seção apresente pelo menos uma gema vegetativa. Este método, também conhecido por multiplicação rápida, consiste na produção de mudas a partir de gemas axilares de seções do talo ou de mudas. É possível a seleção minuciosa dos pedaços selecionados, descartando-se os infectados com fusariose, o que não é possível a partir de mudas inteiras (VENTURA, 1994; REINHARDT, 1985; CUNHA, 2003).

2.2.2 Propagação por cultura de tecidos ou micropropagação

Na micropropagação é realizado o cultivo de plantas ou partes destas, também chamados de explantes, em meio de cultura e ambiente asséptico, controlando temperatura, fotoperíodo, umidade e irradiância, em local apropriado

chamado *sala de crescimento*. Dentro dessa técnica existe a fase de multiplicação, cujo principal objetivo é produzir o maior número de plantas no menor espaço de tempo (ERIG et al., 2004).

A cultura de tecidos de plantas *in vitro* é uma alternativa para a produção de mudas de abacaxizeiros em larga escala. A técnica permite produzir mudas em grande quantidade e com qualidade, aliado a redução no período para a obtenção das mesmas. Além disso, a técnica pode ser aplicada tanto para multiplicar mudas comerciais, como para auxiliar a reprodução e multiplicação de materiais em programas de melhoramento genético. Em certos casos obtêm-se uma única planta com as características desejáveis, que, através dos processos tradicionais o melhorista poderia levar entre 10 e 12 anos para os testes de seleção até se obter uma cultivar (EMBRAPA, 2007).

Reguladores de crescimento do tipo citocininas são utilizadas para o desenvolvimento do material cultivado *in vitro*. O papel estimulante das citocininas na divisão celular em sistemas de cultura de tecidos é bastante conhecido (JUNIOR, 2007). A benzilaminopurina (BAP) tem se destacado, entre as citocininas, pela sua eficiência em induzir a formação de grande número de brotos e elevadas taxas de multiplicação em várias espécies de plantas e, por isso, tem sido mais utilizado em trabalhos de multiplicação *in vitro* do que outras citocininas (ALVES et al., 1998; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A exigência de grandes quantidades de mudas de abacaxizeiros para o plantio comercial, aliado à necessidade do uso de mudas sadias, livres de doenças, principalmente da fusariose, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *Ananas*, que pode causar queda na qualidade das plantas, bem como perdas de 40% do material propagativo no pré e pós-plantio, tem sido fatores limitantes à expansão da cultura (CUNHA, 2003).

A técnica de micropropagação em abacaxizeiro foi primeiramente aplicada por Aghion e Bauchesne em 1960 (FITCHET, 1990b). Empregando-se a metodologia adequada e a depender da variedade, pode-se obter num período de 18 meses, a partir de uma planta, aproximadamente 50.000 mudas, enquanto que seriam necessários 7 anos para se obter cerca de 32.000 plantas, partindo-se também de uma planta que produza em média 8 mudas, mediante a propagação vegetativa tradicional (CUNHA, 2003).

Mudas de batata, morango, banana, abacaxi e até plantas ornamentais são hoje amplamente comercializadas no país pelas biofábricas. Uma alternativa para o

pequeno produtor é adquirir um pequeno lote nas biofábricas, e fazer a multiplicação das mudas pelo método convencional (NASCENTE, 2005).

Gemas obtidas da coroa têm sido utilizadas como explantes, na micropropagação do abacaxizeiro, e têm apresentado baixa taxa de variação somaclonal. Uma coroa, dependendo do seu tamanho, apresenta dezenas de gemas, que, por sua vez, poder gerar vários brotos *in vitro* (COELHO et al., 2007).

As vantagens da multiplicação *in vitro* podem ser resumidas em: alta taxa de multiplicação; rapidez na obtenção de mudas; controle das condições de cultivo; propagação continuada ao longo do ano com fidelidade genética; propágulos livres de doenças e pragas; custo baixo uma vez estabelecido e otimizado o protocolo; necessidade de espaço reduzido e possibilidade de armazenamento em longo prazo de germoplasma (PORTELA, 2008).

2.4 MEIOS NUTRITIVOS

A capacidade de proliferação e o rendimento de mudas *in vitro* são fortemente influenciados pelo genótipo, composição do meio nutritivo, condições de crescimento *in vitro* e aclimatização. Assim, os meios nutritivos devem ser modificados para que se obtenham resultados satisfatórios, não podendo ser recomendado um único meio para as diferentes espécies e cultivares (FORTES e SCHERWINSKI-PEREIRA, 2001), pois estas diferem geneticamente entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003).

O meio nutritivo MS é uma contribuição significativa para a formulação de um meio de crescimento definido, adequado para uma ampla série de aplicações, foi desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), tornando-se uns dos meios de cultura mais amplamente utilizados em trabalhos de cultura de tecidos, uma vez que suas diluições e modificações têm apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies, compondo-se de elementos essenciais e opcionais. Dentre os essenciais estão à água, os sais inorgânicos (macro e micro nutrientes), os carboidratos, as vitaminas e os reguladores de crescimento. Os opcionais podem incluir os

compostos orgânicos nitrogenados, ácidos orgânicos e mio-inositol (TEIXEIRA et al., 2007).

A solidificação ou semi-solidificação do meio de cultivo é obtida tradicionalmente mediante a adição de Agar, que é um polissacarídeo extraído de algas marinhas. Além de que o pH do meio de cultura, a concentração de sais e a presença de substâncias também interferem na geletificação (TEIXEIRA et al., 2007).

A maioria dos trabalhos com bananeira e abacaxizeiro *in vitro* baseia-se no uso de meios de cultura semi-sólidos utilizando o Agar ou o phytigel como agentes geleificantes do meio (MACEDO et al., 2003; PEDROSO et al., 2000). Na busca da maior eficiência econômica no processo de propagação de plantas em laboratório, alguns pesquisadores tem testado a substituição do Agar por amido de milho ou de mandioca (fécula) (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003). Costa et al., (2007) testaram a substituição do Agar total e parcial pelo amido de mandioca (fécula) na composição de meios de cultura para o estabelecimento e multiplicação de bananeira da cv Grande Naine e abacaxizeiro das variedades Rio Branco e Quinari, e concluíram que as duas variedades testadas de abacaxizeiros responderam de forma satisfatória, reforçando que a variedade Rio Branco se sobrepôs a cv Quinari na multiplicação *in vitro*. Já para a cv de bananeira Grande Naine o uso isolado ou combinado da fécula com o Agar não proporcionou aumento nas taxas de multiplicação do material em cultivo.

Outro fator a ser considerado é o estado físico do meio de cultivo, em que a utilização de meios de cultura líquidos tem proporcionado igual ou superior eficiência para diversas espécies vegetais, como o abacaxi, a banana e a cana de açúcar. Tem sido crescente o interesse pelo cultivo em meios de consistência líquida devido à facilidade no preparo e manipulação, eliminação do Agar, que possui custo elevado, e pela possível utilização de menor volume de meio. Porém, deve-se ter certeza da sanidade do material vegetal a ser utilizado, pois nesse sistema um único explante contaminado pode contaminar todos os demais, devido a facilidade na disseminação dos contaminantes (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003).

Moreira (2001), estudando suplementação hormonal do meio MS no crescimento *in vitro* de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola verificou que o número máximo de brotações ocorreu na ausência de Agar. Liu *et al.*, (1988) obtiveram a

maior proliferação de brotos *Ananas* sp. da cultivar de abacaxizeiro Red Spanish, em meio MS líquido suplementado com $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

2.4 CULTURA DE GEMAS LATERAIS E TERMINAIS

Na fase de estabelecimento ou cultura inicial, recomenda-se a utilização de gemas da coroa das frutas. A regeneração de plantas a partir de gemas pré-existentes, geralmente é fiel na reprodução do genótipo da planta matriz (HARTMANN et al., 2002).

Fitchet (1990b) trabalhando com propagação *in vitro* de gemas laterais da coroa de abacaxizeiro das cultivares Queen e Smooth Cayenne, concluíram que as gemas oriundas da cv. Queen podem ser utilizadas frescas, ou seja, imediatamente após da obtenção da coroa. Porém, para a cv. Smooth Cayenne deve-se deixar a coroa dessecar para que haja a quebra de dormência das gemas. Em seus trabalhos, os autores testaram diferentes consistências de meio MS e aplicação exógena de diferentes reguladores de crescimento. Concluíram que as gemas laterais de abacaxizeiro podem ser estabelecidas com sucesso nas culturas *in vitro*, e que a soma dos tempos relativos à fase de estabelecimento + alongação das brotações e o enraizamento podem ser completados em 12 semanas. Na fase de multiplicação, com três subcultivos do material, pode-se produzir até 30.000 plantas a partir de 40 gemas laterais. O enraizamento das plantas foi feito *in vitro* e durou 3-4 semanas. A seguir as mudas foram tratadas com benomyl, obtendo-se 100% de sucesso no estabelecimento das plantas em casa de vegetação.

No Brasil alguns trabalhos têm sido feitos usando a micropropagação *in vitro* na cultura do abacaxizeiro. Cabral et al. (1984) usaram gemas laterais de mudas tipo rebentão de abacaxizeiros da variedade Smooth Cayenne como explantes. As folhas das mudas foram destacadas para exibição das gemas e estas foram extraídas na forma de cubos, que foram imersos rapidamente com álcool 70% e em seguida desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 1,5% durante 10 minutos, lavando-se em seguida com água estéril por três vezes de 10 minutos cada. As

gemas foram cultivadas *in vitro* sob condições assépticas, 16 horas de luz e 27 ± 1 °C com pH do meio ajustado para 5,6. Foram utilizadas quatro composições no meio MS, sendo: a) MS (líquido) + 30 mg.L⁻¹ de sacarose com pontes de papel filtro; b) MS + 30 mg.L⁻¹ de sacarose + 1,8 mg.L⁻¹ ANA + 2,0 mg.L⁻¹ AIA + 2,1 mg.L⁻¹ BAP (solidificado com 0,7% de Agar); c) MS + 30 g.L⁻¹ sacarose + 0,18 mg.L⁻¹ ANA + 0,4 mg.L⁻¹ BAP (solidificado com 0,7% de Agar); d) MS + 30 g.L⁻¹ sacarose (solidificado com 0,7% de Agar). Concluiu-se que o meio “a” favoreceu o crescimento mais rápido dos explantes e que o meio “c” induziu a formação de gemas múltiplas e início do enraizamento. O meio “b” proporcionou a formação de calos sem haver regeneração de plantas.

Costa et al., (2007) utilizou gemas axilares na multiplicação *in vitro* de plantas matrizes de abacaxizeiro, variedades Rio Branco e Quinarí, coletadas de brotações do tipo filhote. As gemas axilares foram extraídas e submetidas ao processo de assepsia que consistiu da imersão em álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (50% da solução comercial) por quinze minutos e três lavagens em água destilada e esterilizada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios de 15 x 150 mm com 10 mL de meio de cultura de estabelecimento de abacaxi, constituído pelos sais e vitaminas de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 2,0 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,25 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). Para avaliação do Agar e amido de mandioca (fécula) como geleificantes, concluíram que as gemas axilares de abacaxizeiros responderam satisfatoriamente as variáveis analisadas.

Pescador e Koller (1992) utilizaram como explantes gemas axilares de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola, cultivadas em casa de vegetação. Fez-se a assepsia dos explantes em álcool 70% por um minuto e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio (2,29%) por 20 minutos, lavando-se a seguir três vezes em água deionizada e autoclavada. Os tratamentos constaram basicamente de meio MS com 3% de sacarose, vitaminas do meio e 7% de Agar, complementados com: M1) 2,0 ppm ANA + 3,0 ppm BAP; M2) 4,0 ppm ANA + 6,0 ppm BAP; M3) 6,0 ppm ANA + 9,0 ppm BAP. As condições em que foi conduzido o experimento foram de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e 600 lux de luminância. Não foram encontradas diferenças no número médio de brotos entre os diferentes meios, sendo a média de 10,5 brotos em um período de 45 dias.

2.5 ENRAIZAMENTO

A rizogênese é uma das fases mais importantes da micropropagação, pois ela determina indiretamente a sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Raízes mal formadas e pouco funcionais é uma característica de plantas micropropagadas. Durante a fase de aclimatização é necessário que haja emissão de novas raízes para que ocorra a absorção de água e sais minerais de forma mais eficiente, pois deficiência de água no início do ciclo do abacaxizeiro dificulta o enraizamento e atrasa o desenvolvimento das plantas (CUNHA, 2003).

Dentre os fatores determinantes na indução e na formação de raízes *in vitro*, destacam-se, os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenildade, genótipo, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento, carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, além das condições ambientais de crescimento das plantas *in vitro* (ROCHA et al., 2008).

No enraizamento de brotos de abacaxizeiros *in vitro* deve ser evitado o uso de carvão ativado, pois reduz tanto a porcentagem de brotos enraizados como o número médio de raízes (BORGES et al., 2001; NICOLOSO et al 2001).

Barbosa et al. (2004) em seu trabalho comprova que brotos de abacaxi da cultivar Smooth Cayenne multiplicados em presença de BAP a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentam melhor desempenho na rizogênese *in vitro* quando comparados às demais concentrações de BAP testadas, independentemente da presença ou ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo para enraizamento.

Estudos sobre enraizamento adventício tiveram grandes avanços a partir do ano de 1928, com a identificação do primeiro fitohormônio de ocorrência natural: a auxina ácido 3-indolacético (AIA). Posteriormente, em 1935, auxinas sintéticas análogas ao AIA, como os ácidos indolbutírico (AIB) e naftaleno-acético (ANA) foram preconizados como fitorreguladores de enraizamento. Atualmente as auxinas como o AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético) e ANA (ácido naftalenoacético) são os principais reguladores envolvidos no processo de enraizamento *in vitro*. A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subsequente alongamento das células, sendo que essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (FORD

et al., 2001). O AIB tem sido bastante utilizado por não causar fitotoxicidade aos explantes e ser eficiente no enraizamento de muitas espécies (HARTMANN et al., 2002). As auxinas promovem o enraizamento, mas nem sempre a porcentagem de enraizamento e o número de raízes formadas podem ser maximizados com o aumento da concentração de auxina. A utilização de elevadas concentrações no meio de cultura pode induzir a formação de calo na base dos explantes (ROGALSK, 2003) que é indesejável.

Além das auxinas, outras substâncias também foram avaliadas e indicadas como importantes para o enraizamento, como por exemplo, as vitaminas do grupo B1 efetivas no crescimento de raízes induzidas *in vitro* (WHITE, 1937).

Entretanto, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença destes reguladores, o que pode ser explicado pelos elevados níveis endógenos desses fitohormônios (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PINTO e LAMEIRA, 2001). Como também em alguns tratamentos severos utilizando altas concentrações de auxina durante reduzido período e a transferência das plantas para um meio livre de regulador de crescimento pode promover, de forma mais eficiente, o enraizamento (HOVÁRTH, 2001).

De modo geral pode-se observar que a relação concentração de auxina e tempo de exposição do explante pode ser determinante para o desenvolvimento do enraizamento *in vitro* (NEGASH, 2000; BOSA et al., 2003).

Kotsias e Roussos, (2001) realizaram experimentos com Citrus limon e observaram que a maior porcentagem de enraizamento (80%) e maior número de brotos foi obtido quando a base desses permaneceram por 5 segundos imersos em 1000 mg L⁻¹ de AIB. Segundo Nodoye et al. (2003) o tempo de permanência, o tipo e a concentração de auxinas também afetaram a indução de raízes adventícias *in vitro* em brotos de *Balanites aegyptiaca*. Estes autores relataram que ocorreu maior porcentagem de brotos enraizados, maior número e comprimento das raízes quando os explantes permaneceram em meio MS por 10 dias em 5 mg. L⁻¹ de AIB. Resultados semelhantes foram obtidos com as espécies *Cornus florida*, *Artocarpus lakoocha*, *Withania sominifera* e *Acacia sinuata* (MANICKAM et al., 2000; VENGADESAN, 2000; SHARMA, 2005).

Alguns trabalhos comprovam que as concentrações de carboidratos (sacarose) adicionados ao meio de cultura influenciam na porcentagem de enraizamento *in vitro*. Nos estudos realizados por Leite et al. (2000) com porta

enxerto de pereira, verificaram que a maior porcentagem de enraizamento foi obtida com 20 g.L⁻¹ de sacarose; entretanto foi a concentração de 30 g.L⁻¹ que promoveu maior comprimento de raízes. Santana (2003), estudando os fatores que afetam o enraizamento *in vitro* em brotações e estacas de *Annona glabra* L., verificou que os maiores percentuais de enraizamento ocorreram em meio de cultura suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose. Faria e Segura (1997) obtiveram altas taxas de enraizamento (100%) para espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em meio de MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose.

Alguns experimentos de enraizamento *in vitro* substituíram o Agar pelo uso de outros substratos como vermiculita e cinza vegetal com o objetivo de tornar a produção *in vitro* com um custo menor, pois o Agar é um dos componentes que mais encarecem a produção (ROCHA et al., 2008; VIEIRA et al., 2007). Os autores citados evidenciaram que a vermiculita e a cinza vegetal apresentaram bons resultados no enraizamento *in vitro* com miniestacas de porta-enxerto de macieira. No entanto Ribeiro et al., (2007) concluem que apesar de seu custo, o Agar continua sendo o melhor substrato para o enraizamento *in vitro* de araçazeiro.

A alta concentração de sais, que compõem o meio básico de MS (Murashige e Skoog, 1962), mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro* (MCCOWN, 1988). Diluições deste, para ½, e até ¼ de sais, têm possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas. Meios básicos menos concentrados como WPM, White, Knop, Heller podem ser igualmente favoráveis (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PINTO e LAMEIRA, 2001; PASQUAL, 2001; ALOUFA, 2003). De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de plantas *in vitro* (PINTO E LAMEIRA, 2001; PASQUAL, 2001; ALOUFA, 2003; SOUZA et al., 2004; LIMA, 2004).

Alguns autores como Pedrotti e Voltolini (2001) obtiveram em seu trabalho bons resultados nos índices de porcentagens de enraizamento e sobrevivência das plantas *ex vitro* para o porta-enxerto de macieira M.9 aos 45 dias após o transplante em casa de vegetação. A eliminação da fase de enraizamento *in vitro* diminuindo a permanência do material no laboratório é altamente desejada, pois as mesmas são transplantadas e enraizadas em casa de vegetação. O enraizamento *ex vitro* é uma metodologia inovadora que está iniciando, sendo escasso em trabalhos com abacaxizeiros.

2.6 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS

Aclimatização compreende o processo pelo qual as plantas *in vitro* são transferidas para o substrato e levadas à casa de vegetação, antes de serem transferidas para o campo definitivamente (CID, 2001). Para que a aclimatização possa ter sucesso deve-se utilizar solo da ocorrência da espécie para que a mesma se adapte bem ao campo (SOUZA et al., 2004).

Folliot e Marchal (1991) comentam que o período de aclimatização de mudas de abacaxi obtidas *in vitro* pode ser de 5 a 12 meses, sendo difícil estabelecer um prazo de duração para esta fase, a qual pode variar conforme o genótipo, técnicas de cultura e condições climáticas. Este período pode influenciar negativamente este modo de reprodução se não se conseguir reduzi-lo.

O aumento da intensidade luminosa durante os últimos estágios da fase de enraizamento pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plantas, uma vez que estimula a fotossíntese, o aumento da cera epicuticular e a melhoria da relação hídrica. Uma das formas de facilitar o processo de aclimatização de plantas cultivadas *in vitro* seria aumentar a intensidade luminosa, promovendo a fotossíntese e melhorando as relações hídricas (SILVA et al., 2008). Ibaraki e Nozaki (2005) afirmam, ainda, que se houver necessidade de desenvolver capacidade fotossintética nos tecidos, um dos fatores mais importantes que devem ser considerados é o ambiente de luz, especialmente a intensidade.

Fauth et al. (1994) testando diversos substratos durante a fase de aclimatização de mudas de abacaxizeiro concluíram que os substratos compostos de solo/xaxim/turfa (1:1:1 v/v) e solo/xaxim/areia/húmus (1:1: 1:1 v/v) apresentaram os melhores resultados. Concluíram também que não é necessária a manutenção das plantas em aclimatização por um período maior do que 186 dias. A metodologia utilizada foi a manutenção das plantas em nebulização nos primeiros dois meses, sendo, após, transferidas para casa de vegetação por 30 dias, e, a seguir, transferidas para telado com 50% de sombreamento.

Estudos em micropropagação fotoautotrófica (cultivo ausente de sacarose) sob alta irradiância têm mostrado maior organização dos tecidos do mesófilo de plantas cultivadas nesse sistema (KHAN et al., 2004; SERRET et al., 1996) e menores perdas durante a fase de aclimatização (SERRET et al., 1997).

2.7 CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

A conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais é um tema de importância mundial. Muitas espécies correm o risco de serem extintas principalmente nas regiões temperadas (NASS, 2001).

A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto, uma questão a ser priorizada, que constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimento básico sobre a distribuição e abundância de espécies, suas interações mutualistas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (LIPOW, 2004; AMARAL, 2005).

O germoplasma conservado serve como um reservatório de genes aos quais os melhoristas podem acessar quando precisam resolver problemas específicos, tal como a resistência a uma doença, multiplicação, transferência de material entre países e estados (GUERRA, 2005).

As técnicas de conservação *in vitro* constituem-se em método alternativo importante para a conservação de recursos genéticos vegetais, que se baseia no cultivo das coleções de plantas em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos. Nestas condições, a conservação de germoplasma *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos. O objetivo é desacelerar o crescimento e aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, reduzindo-se assim a mão-de-obra e o espaço necessários para a sua conservação, além de proporcionar acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (OLORODE, 2004).

Alguns procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento que envolve a depressão do metabolismo das plantas aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plantas. A supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-

baixas, a chamada criopreservação ou sementes sintéticas (PRIMROSE, 1987), e a utilização de paclobutrazol (PBZ) como retardante de crescimento que vem sendo estudada há mais de 15 anos como alternativa aos reguladores de crescimento convencionais (BEROVA et al., 2002).

Canto et al. (2004) avaliaram o efeito do paclobutrazol (PBZ) no crescimento *in vitro* de plantas de abacaxi visando à conservação do germoplasma. Utilizaram o meio MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 8 g.L⁻¹ de Agar. Cada tratamento consistiu de duas concentrações de PBZ: a primeira aplicada no início do experimento e a segunda, noventa dias após, em combinações que envolviam a ausência, 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹. Concluíram que os melhores resultados foram obtidos na ausência do PBZ, ou com 0,5 mg.L⁻¹ aplicada apenas no início do experimento. E concluíram que é possível reduzir o número de subcultivos durante o período de conservação sem regulador de crescimento.

A baixa temperatura como alternativa para armazenamento *in vitro* de células e órgãos de plantas tem sido aplicada amplamente e com sucesso em kiwi, maçã, pêra, ameixa e cereja (EMBRAPA, 2007).

Lemos et al. (2002) concluíram após os experimentos que é possível conservar sob crescimento lento por 12 meses microplantas de cana-de-açúcar em meio de cultura MS enriquecido com 1 mg.L⁻¹ de ácido abscísico e mantidas sob temperatura de 15 °C.

A tecnologia de produção de sementes sintéticas ou criopreservação facilita a troca de germoplasma entre instituições de pesquisa e a conservação de genótipos desejáveis a baixos custos sob condições *in vitro*, além de permitir o estabelecimento de propágulos diretamente no campo (NASSAR, 2003; RECH FILHO, 2004), tendo sido reportada com sucesso para várias espécies vegetais (SONEJI et al., 2002; HASSANEIM, 2005). O uso e aprimoramento da técnica se justificam pelo baixo custo, rápida multiplicação dos propágulos, facilidade no transporte e troca de germoplasma e conservação de genótipos sob condições *in vitro* (SAIPRASAD, 2001).

Scherwinski-Pereira et al. (2008) em seus experimentos concluíram que o emprego de um endosperma sintético constituído por 75% dos sais e vitaminas de MS, acrescido de carvão ativado (3 g.L⁻¹), ou pela concentração plena do meio MS promoveram as mais altas taxas de conversão de sementes sintéticas de pimenta-

longa. A altura das plântulas não foi afetada pelas concentrações de MS e de carvão ativado na matriz de encapsulamento, após 30 dias da sementeira em meio de MS.

As pesquisas científicas tem feito grandes avanços nos estudos da caracterização, propagação e conservação *in vitro* da grande variabilidade genética útil para a agricultura brasileira e de todo o mundo, mas a ciência ainda tem muito a fazer para que se possa conservar (estocar) o material genético para aplicações futuras (CAMILLO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS E MATERIAL PROPAGATIVO UTILIZADO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular e anexos da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas brotações de abacaxizeiros (*Ananas comosus* L. Merr.), pertencente às variedades Senador Guimard (SNG-3), Rio Branco (RBR-1), Quinarí (SNG-2) e Xapuri (X), todas provenientes da Coleção de Germoplasma da Embrapa Acre.

3.2 ESTABELECIMENTO DOS MATERIAIS *IN VITRO*

Brotações do tipo filhote foram coletadas no mês de abril de 2007 do Banco de Germoplasma de abacaxizeiros da Embrapa Acre e levadas para laboratório, onde as folhas foram removidas, expondo as gemas axilares. Em seguida, os talos desprovidos das folhas foram lavados em água corrente, por cerca de 3 a 5 minutos, e as gemas axilares extraídas. As gemas axilares, de aproximadamente 0,3 a 0,5 cm³, foram então submetidas ao processo de desinfestação, em câmara de fluxo laminar, por meio da imersão em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (50% de uma solução comercial) por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada e esterilizada, de acordo com Costa et al. (2007).

Após o processo de desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaios de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio de cultura de estabelecimento de abacaxi, constituído pelos sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), 2,0 mg.L⁻¹ de N⁶-benzilaminopurina (BAP) e 0,25 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), de acordo com metodologia descrita por Costa et al. (2007).

3.3 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Avaliação da propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiros em sistemas dupla-fase

Para o estudo da multiplicação *in vitro* de abacaxizeiros em Sistemas Dupla-Fase, dois experimentos foram realizados. No primeiro experimento, avaliou-se a viabilidade do uso do Sistema Dupla-Fase em comparação ao Sistema Semi-Sólido convencional na multiplicação clonal *in vitro* e, no segundo, avaliou-se isoladamente, o Sistema Dupla-Fase na multiplicação *in vitro* de três variedades de abacaxizeiros, como segue:

3.3.1.1 Experimento 1. Análise comparativa de sistemas de multiplicação clonal *in vitro* de abacaxizeiros

Brotações de abacaxizeiros (*Ananas comosus* L. Merr.), Senador Guiomard (SG), Rio Branco (RB) e Quinarí (QN), coletadas da Coleção de Germoplasma da Embrapa Acre, já estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. As brotações foram multiplicadas em meio de cultura de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30,0 g.L⁻¹ de sacarose e 100 mg.L⁻¹ de inositol e os reguladores BAP e ANA nas concentrações de 2 mg.L⁻¹ e 0,25 mg.L⁻¹, respectivamente (Costa et al., 2007).

Os explantes foram colocados para se desenvolver em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, com 40 mL de meio de cultura e em dois sistemas de cultivo: Convencional (meio semi-sólido) e Dupla-Fase. No Sistema Dupla-Fase, a cada subcultivo foi adicionado 30 mL de meio líquido ao meio semi-sólido inicial, enquanto que no tratamento semi-sólido as avaliações e as brotações formadas foram transferidas para novos meios de cultura de consistência semi-sólida a cada subcultivo.

No total, foram realizados quatro subcultivos de 40 dias cada. No Sistema Dupla-Fase a avaliação foi realizada somente no final do período de execução do experimento (160 dias), enquanto que no sistema convencional (meio de cultura semi-sólido), as avaliações foram realizadas a cada subcultivo, ou seja, a cada 40 dias.

As avaliações consistiram na obtenção de dados referentes à taxa de multiplicação (número de brotações por explante inicial) e altura de brotações maiores e menores que 0,5 cm.

Neste experimento, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições e oito explantes por parcela.

O experimento teve o pH dos meios de cultura ajustados para $5,8 \pm 0,1$ sendo posteriormente autoclavado à 121°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão. Uma vez em meio de cultura, os explantes desenvolveram-se em sala de crescimento, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas SISVAR 4.3 (FERREIRA, 1999) e SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Dados referentes à taxa de multiplicação (x) foram transformados segundo $x+0,5^{0,5}$. Dados de altura de brotações não foram transformados.

3.3.1.2 Experimento 2. Estimativa da produção de mudas *in vitro* de abacaxizeiros em Sistema Dupla-Fase

Para estimar o número de mudas de abacaxizeiro a serem produzidas a partir do Sistema Dupla-Fase, brotações de abacaxizeiros das variedades Rio Branco (RBR-1), Quinarí (SNG-2) e Senador Guimard (SNG-3), foram estabelecidas e multiplicadas *in vitro* até se obter o número suficiente de brotos para a montagem dos experimentos, de acordo com a metodologia descrita no item 2.1.

Uma vez estabelecidos e multiplicados *in vitro*, brotações foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio de MS

semi-sólido, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA (COSTA et al., 2007). Após 30 dias, acrescentou-se sobre ao meio semi-sólido 40 mL de meio de consistência líquida. Para avaliar o efeito do BAP nas taxas de multiplicação dos materiais, quatro concentrações deste regulador de crescimento foram testadas: 0,0; 2,0; 4,0; e 6,0 mg.L⁻¹.

Os explantes se desenvolveram por um período de cinco meses consecutivos, sendo que a cada 30 dias, 40 mL de meio líquido foi adicionado sobre o meio semi-sólido. As condições de cultivo foram as mesmas do experimento anterior (temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 μmolm⁻²s⁻¹).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, com três variedades (Rio Branco, Quinarí e Senador Guimard) e quatro concentrações de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹). Cada tratamento foi formado por cinco repetições, com cinco explantes por parcela.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas SISVAR 4.3 (FERREIRA, 1999) e SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Dados referentes a taxa de multiplicação (x) foram transformados segundo $x+0,5^{0,5}$. Dados de altura de brotações não foram transformados.

3.4 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE ABACAXIZEIROS MULTIPLICADOS *IN VITRO*

Para este experimento, brotações de abacaxizeiro, variedades Xapuri (X), Rio Branco (RBR-1) e Quinarí (SNG-2), provenientes da multiplicação *in vitro*, foram enraizados em diferentes composições de meios de cultura de MS e concentrações de ácido indolbutírico (AIB). Para tanto, sais do meio de MS nas concentrações plena (100% dos sais inorgânicos) e reduzida à metade (50% dos sais inorgânicos), adicionados de AIB nas concentrações de 0; 0,1; 0,5 mg.L⁻¹ foram usados como tratamentos para o enraizamento das brotações de abacaxizeiro multiplicadas *in vitro*.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 250 mL contendo 30 mL dos meios de cultura de enraizamento, acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol.

Todos os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do solidificante Agar (7 g.L⁻¹), sendo posteriormente autoclavados à 121°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão.

Os explantes permaneceram nos meios de enraizamento por um período de 30 dias, sob temperatura de 25±2 °C fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 μmolm⁻²s⁻¹, quando foram então avaliados quanto a percentagem de enraizamento e número e comprimento de raízes (cm).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, com duas concentrações de sais de MS (MS pleno e MS ½) e três concentrações de AIB (0,0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹). Cada variedade foi avaliada isoladamente, sendo cada tratamento formado por quatro repetições e cinco explantes por parcela.

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 1999), com medidas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados referentes à percentagem de enraizamento (x) foram transformados segundo arco seno $x/100^{0,5}$. Os dados de número de raízes (x) foram transformados segundo $x+0,5^{0,5}$. Os dados sobre comprimento de raízes não foram transformados.

3.5 CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIROS SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO

Brotações de abacaxizeiro das variedades Xapuri (X), Quinarí (SNG-2) e Rio Branco (RBR-1), provenientes da etapa de multiplicação *in vitro* e medindo aproximadamente 0,8 cm de altura, foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura MS, suplementados com 30 g.L⁻¹ de

sacarose, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol e 7 g.L^{-1} de Agar, sendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

Uma vez inoculados, os materiais foram mantidos sob três regimes de temperatura de conservação: $15 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em câmara de crescimento do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de $12 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Sylvânia, 20W).

Dados sobre altura de brotações (cm), número total de folhas, número de folhas vivas e número de folhas mortas foram obtidos trimestralmente por um período de seis meses.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×3 , sendo dois períodos de avaliação (3 e 6 meses) e três temperaturas de conservação ($15 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Cada tratamento foi formado por cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco tubos de ensaio com uma brotação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Dados referentes a número de folhas (x) foram transformados segundo $x+0,5^{0,5}$. Os dados sobre altura de brotações não foram transformados

3.6 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS DE ABACAXIZEIROS PRODUZIDAS *IN VITRO*

Uma vez enraizadas (Item 2.3.1.3), as brotações de abacaxizeiro produzidas *in vitro* foram retiradas dos meios de cultura e tiveram suas raízes lavadas em água corrente para a retirada do excesso de meio de cultura aderido as raízes. Em seguida, foram plantadas em tubetes plásticos de 115 cm^3 , preenchidos com substrato formado por terra de encosta, vermiculita e esterco bovino, na proporção de 3:1:1 (v/v), de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2008), e acondicionadas em condições de telado, coberto com filme de polietileno transparente ($150 \text{ } \mu\text{m}$) e sombrite (50% de interceptação luminosa), onde permaneceram por um período de até 50 dias, onde se avaliou a taxa de sobrevivência das mudas.

A irrigação das plantas foi feita por meio de aspersores, distantes a aproximadamente 1,2 m de altura de onde foram acondicionados os tubetes, com vazão nominal de 60 L/H/m², sendo controlados por um temporizador digital (*timer*). As mudas foram submetidas a períodos de irrigação a cada seis horas por 15 minutos. Os tubetes foram acondicionados em bandejas suspensas a 0,50 m do solo do viveiro e, durante crescimento das plantas, não se realizou tratamentos fitossanitários ou nutricionais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA PROPAGAÇÃO CLONAL *IN VITRO* DE ABACAXIZEIROS EM SISTEMAS DUPLA-FASE

4.1.1 Análise comparativa de sistemas de multiplicação clonal *in vitro* de abacaxizeiros

De maneira geral observou-se que o Sistema Dupla-Fase foi superior ao meio de cultura semi-sólido em relação às variáveis taxa de multiplicação e brotações maiores que 0,5 cm formadas (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com Kadota et al. (2001) que para pereira japonesa (*Pyrus pyrifolia*) o sistema de cultivo em meio dupla-fase também produziu alto número de brotações axilares comparado com o cultivo tradicional.

Quando se comparou as variedades verificou-se que a percentagem de brotações desenvolvidas nas variedades Rio Branco (RB) e Senador Guimard (SG) foram significativamente superiores àquelas observadas na cv. Quinarí (QN). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Costa et al. (2007) que trabalhando com as variedades Rio Branco e Quinarí, também observaram que a cv. Rio Branco foi a que proporcionou a formação do maior número de brotações por explante. Em relação às brotações formadas com tamanho inferior a 0,5 cm não houve diferenças estatísticas entre as variedades estudadas.

A produção total de brotações por parcela, ou seja, a partir de oito explantes iniciais no Sistema Dupla-Fase para as variedades RB, SG e QN foi de 488,2; 419,3; e 341,8, respectivamente. Estes valores foram significativamente superiores aos observados quando o cultivo ocorreu em sistema convencional, que utilizou meio de cultura semi-sólido, que foi de 299,8; 289,7 e 206,8 respectivamente (Tabela 2). Já quando se avalia o número de brotos regenerados por explante estes valores são de 61,0; 52,4 e 42,7 no Sistema Dupla-Fase e 37,5; 36,2; e 25,8 no Sistema de multiplicação em meio semi-sólido para as variedades RB, SG e QN, respectivamente.

Segundo De la Viña et al. (2001), assim como em meio líquido, o sistema dupla-fase disponibiliza maior quantidade de nutrientes prontamente utilizável pelos explantes em cultivo, pois nestes sistemas não existe barreira física no meio, o que

facilita o contato dos explantes com os nutrientes. Portanto, nos meios de consistência líquida a taxa de multiplicação tende a aumentar em comparação aos sistemas que utilizam meios de consistência semi-sólida pela maior facilidade com que nutrientes e reguladores são absorvidos pelas plantas (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003).

Outro aspecto importante em relação à utilização de meios líquidos é a redução do uso de mão-de-obra na etapa de multiplicação *in vitro*, uma vez que não há a necessidade da realização da etapa de multiplicação em cada subcultivo, podendo os explantes serem mantidos por vários meses nestas condições. Isso também sugere a diminuição de gastos com a compra de agente geleificantes para o meio de cultura e redução do uso de mão de obra para as repicagens. Scherwinski-Pereira e Fortes. (2003), afirmam que a cultura de tecidos é uma técnica importante para a propagação de diversas espécies, principalmente aquelas que apresentam dificuldades para se multiplicarem normalmente. Mas por outro lado é uma técnica que pode tornar-se onerosa em relação ao preparo de meios de cultura e uso de mão de obra se as estratégias de multiplicação não forem exploradas eficientemente. Por isso, há necessidade de se desenvolver protocolos que possam diminuir os gastos, como no caso o uso de meios que não requeiram a utilização de agentes geleificantes (um dos componentes mais caros dos meios de cultura) ou a substituição estes por técnicas ou produtos mais baratos, e que tornem a cultura de tecidos de plantas uma técnica mais eficiente e, portanto, mais lucrativa do ponto de vista econômico.

Proporcionalmente ao número de brotações formadas e, portanto, assim como era de se esperar, os sistemas de cultivo testados neste trabalho influenciaram significativamente a altura das brotações formadas, uma vez que o número de brotações maiores que 0,5 cm formadas em Sistema Dupla-fase foram significativamente superiores aos verificados em meio semi-sólido (Tabela 2). No entanto, embora não tenham sido apresentados os dados, quando estes dados são comparados proporcionalmente em percentagem, verifica-se que, de maneira geral, os valores em percentagem de brotos maiores ou menores que 0,5 cm formados em ambos os sistemas de cultivo, são bastante próximos. Para a variedade Rio Branco, os valores em percentagem de brotações maiores que 0,5 cm formadas em sistema Semi-sólido e Dupla-Fase foram de 74,7% e 75,3%, respectivamente. Já para na variedade Senador Guimard estes valores foram de 74,0% e 71,3% enquanto que

para a variedade Quinarí estes valores foram de 65,2% e 66,7%, respectivamente nos sistemas Semi-Sólido e Dupla-Fase (Tabela 2).

Os resultados referentes à altura de brotações tornam-se importantes num trabalho de multiplicação de bromeliáceas, como é o caso do abacaxizeiro, por algumas espécies desta família necessitarem geralmente de uma fase de alongamento *in vitro*, posterior à de multiplicação, para um perfeito crescimento e alongamento dos brotos, facilitando assim as etapas seguintes do processo (PASQUAL et al., 1998). Brotos pouco alongados podem apresentar problemas de enraizamento e, conseqüentemente, tornarem-se mais suscetíveis a morte na etapa de aclimatização.

TABELA 2. Taxas de multiplicação e tamanho de brotações maiores e menores que 0,5 cm por parcela⁺ (a partir de oito explantes iniciais) e por explante⁺⁺ (a partir de um único explante) das variedades de abacaxizeiro Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) e Quinarí (QN), propagadas em meios de cultura de consistência semi-sólida (S.S.) (Sistema convencional) e Dupla-fase (D.F.), após quatro subcultivos de 40 dias cada*. Embrapa Acre, 2007.

Variedades	Taxa de multiplicação (Nº de brotações formadas)**		Brotações ≥ 0,5 cm		Brotações ≤ 0,5 cm	
	Sistema de Cultivo		Sistema de Cultivo		Sistema de Cultivo	
	S.S.	D.F.	S.S.	D.F.	S.S.	D.F.
RB	299,9 aB ⁺ (37,5) ⁺⁺	488,1 aA ⁺ (61,0) ⁺⁺	224,2 aB ⁺ (28,0)	367,8 aA ⁺ (45,9)	75,7 aB ⁺ (9,5)	120,3 aA ⁺ (15,1)
SG	291,4 aB ⁺ (36,4) ⁺⁺	419,3 abA ⁺ (52,4) ⁺⁺	209,7 abB ⁺ (26,2)	299,3 abA ⁺ (37,4) ⁺⁺	81,7 aB ⁺ (10,2)	120,0 aA ⁺ (15,0) ⁺⁺
QN	206,8 bB ⁺ (25,8) ⁺⁺	341,8 bA ⁺ (42,7) ⁺⁺	134,5 bB ⁺ (16,8) ⁺⁺	228,0 bA ⁺ (28,5) ⁺⁺	72,3 aB ⁺ (9,0) ⁺⁺	113,8 aA ⁺ (14,2) ⁺⁺
Média	266,0 B	416,4 A	189,4 B	298,4 A	76,6 B	118,0 A

* Brotações em Sistema Dupla-Fase foram mantidas nos mesmos frascos de cultivo por todo o período de execução do experimento, recebendo a cada 40 dias, 30 mL de meio de consistência líquida com a mesma constituição original de macro, micronutrientes e reguladores de crescimento. Já no cultivo em meio Semi-Sólido (sistema convencional de multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro), as brotações foram trocadas de meio de cultura a cada 40 dias (subcultivo).

**Médias seguidas de letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada Sistema de Cultivo (S.S. - Cultivo em meio de cultura semi-sólido; D.F. - Cultivo em meio de cultura Dupla-Fase), diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.2 Estimativa da produção de mudas *in vitro* de abacaxizeiros em Sistema de Cultivo Dupla-Fase

As curvas de regressão referentes ao número de brotações regeneradas em função das diferentes concentrações de BAP testadas nas variedades de abacaxizeiro Rio Branco, Senador Guimard e Quinarí após cinco subcultivos podem ser observadas na Figura 4. De maneira geral, verificou-se um ajuste quadrático nas equações de regressão com o aumento das concentrações de BAP testadas para as três variedades testadas. Para a variedade Rio Branco, a curva ajustada referente ao número de brotações regenerados por parcela (cada parcela formada por cinco explantes iniciais) em relação as concentrações de BAP, mostrou-se nitidamente ascendente até um ponto máximo atingido em $3,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, quando o maior número de brotações regeneradas atingiu 409,6. Já para a variedade Senador Guimard, o ponto de máxima eficiência calculado para formação de brotações foi alcançado na concentração de $4,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, onde o número máximo de brotações regeneradas atingiu 414,0. Para a variedade Quinarí a curva quadrática teve seu pico máximo estabelecido na concentração de $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP com a formação de 322,0 brotações por parcela.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a suplementação do meio de cultura Dupla-Fase com BAP foi necessária para a indução de múltiplas brotações *in vitro* das variedades de abacaxizeiro testadas, fato que está de acordo com resultados obtidos por outros autores. Estudos sobre micropropagação de espécies do gênero *Ananas* têm considerado o uso da citocinina BAP como requisito fundamental para a indução de novas brotações para melhorar a eficiência do método, principalmente para *Ananas comosus* (CRUZ, 2000; ALMEIDA et al., 2002; FIROOZABADY e GUTTERSON, 2003), *Ananas lucidus* (BORGES et al., 2001) e *Ananas bracteatus* (COSTA e ZAFFARI, 2005).

Neste trabalho pode-se verificar também que as variedades apresentaram nítidas diferenças nas concentrações de BAP requeridas para a melhoria nas taxas de multiplicação *in vitro*, sugerindo a existência de diferenças genotípicas nas respostas morfogênicas. Segundo Scherwinski-Pereira e Fortes (2003), Giatti e Lima (2007) e Mendes et al. (1996), diferentes efeitos de reguladores de crescimento

podem ocorrer para diferentes espécies, inclusive variações entre as cultivares dentro de uma mesma espécie.

O balanço entre ANA e BAP é dependente do genótipo na maximização da resposta morfogênica o que comprova Barboza et al. (2004) quando compara a taxa de multiplicação de híbrido PExSC-52 com a variedade Smooth Cayene. Santos, (2008) em seu trabalho conclui que a concentração de $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em meio nutritivo líquido possibilitou a melhor resposta para a multiplicação *in vitro* de brotos de abacaxizeiro ornamental aos 120 dias de cultivo. Oliveira (2007), em seu trabalho com germinação dos embriões de *Etilingera elatior* constatou que a adição de BAP até a concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ favoreceu a germinação dos embriões de *Etilingera elatior* em relação a testemunha sem BAP.

Almeida et al., (2002) em *Ananas comosus* cv Pérola obtiveram 2.013,7 brotações com o emprego de meio líquido suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, Já em meio semi-sólido, Silva et al. (2002) obtiveram um máximo de 7,5 brotos com a concentração de $2,52 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em 120 dias de cultivo para a cv primavera . Essa discrepância de resultados pode ser explicada pela utilização de meio sólido ou líquido e pelas doses de BAP. Dentre as vantagens do uso da formulação líquida no preparo do meio MS incluem a maior homogeneidade que permite a maior velocidade de difusão, absorção mais eficiente de nutrientes para os tecidos e um menor custo no seu preparo (ESCALONA et al., 1999; SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003; COSTA e ZAFFARI, 2005), o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que possivelmente o meio líquido adicionado aos frascos a cada 30 dias possibilitou o um constante fornecimento de nutrientes aos explantes, o que pode ter favorecido a multiplicação dos brotos. Apesar de até o momento não existir relatos na literatura sobre o uso de Sistemas Dupla-Fase em abacaxizeiro, resultados positivos da utilização deste Sistema foram também citados por Machado et al. (2004), para a proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira Marubakaido. O uso da metodologia Dupla-Fase também aumentou significativamente o número de brotos e o comprimento das brotações de *Pyrus calleryana* D-6 (MORAES et al., 2004). Segundo estes autores a técnica aumentou a quantidade e a qualidade das brotações *in vitro* de pereira, além de ter permitido manter a cultura constantemente em proliferação por maior período de tempo, com adição de uma quantidade de meio líquido apropriado.

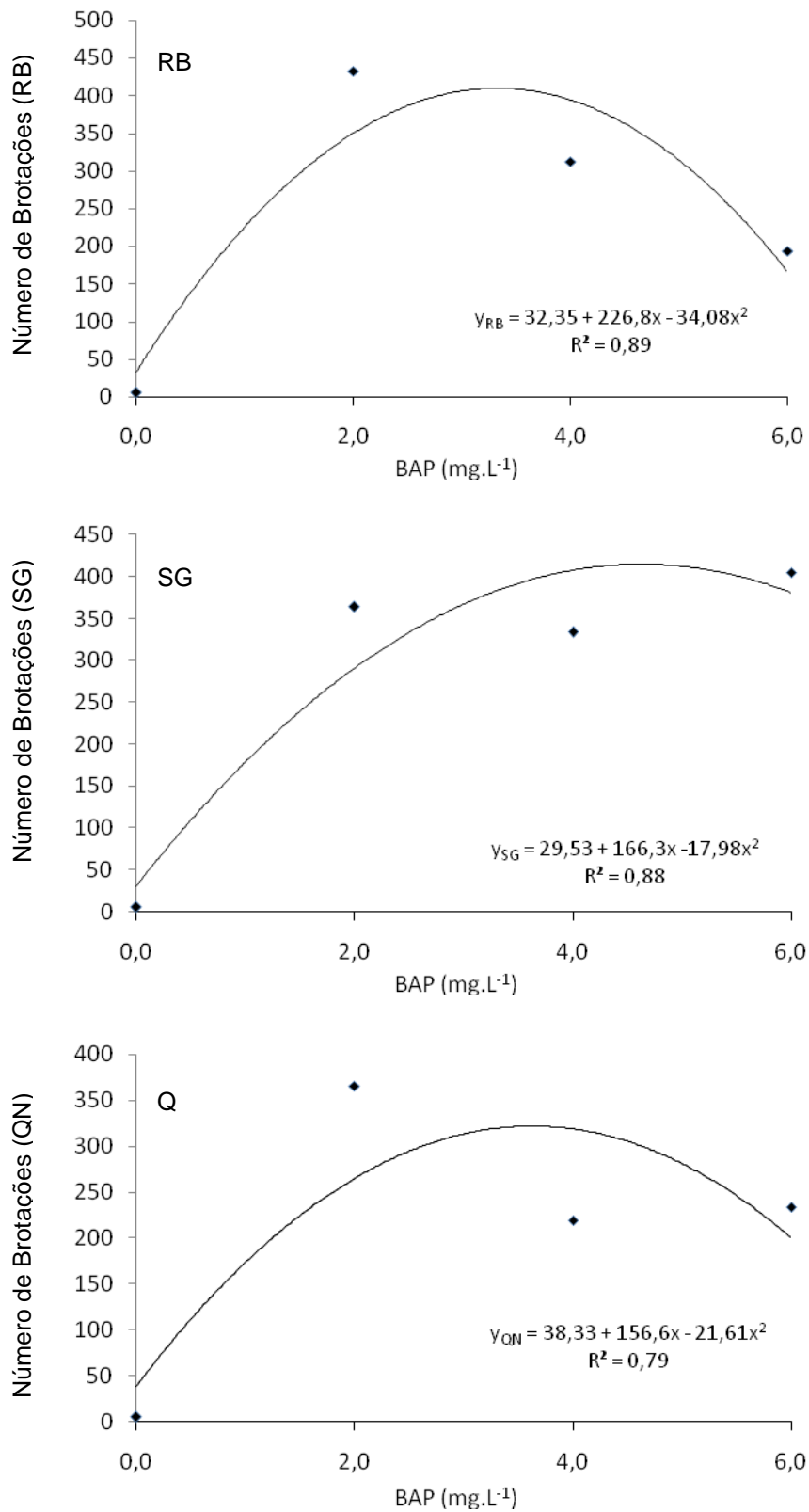


FIGURA 4. Efeito de concentrações de N^6 -Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 $mg.L^{-1}$) sobre as taxas de multiplicação total por parcela (número total de brotações formadas a partir de cinco explantes iniciais) nas variedades de abacaxizeiros Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) e Quinari (QN) em Sistema Dupla-Fase. Embrapa Acre, 2007.

O efeito comparativo do número de brotações formadas por parcela no Sistema Dupla-Fase entre as variedades em cada concentração de BAP testada pode ser observado na Figura 4. No tratamento testemunha, ou seja, no meio de cultura que não recebeu nenhuma concentração de BAP não foram observadas diferenças entre as variedades. Neste tratamento, não houve indução a multiplicação de novas brotações, independentemente da variedade testada, sendo observado apenas crescimento em altura das brotações inoculadas inicialmente. Galvanese et al. (2007), obtiveram resultados semelhantes na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana*, uma bromélia, onde a ausência de BAP ao meio líquido não proporcionou a multiplicação de brotos.

Em meio de cultura suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, verificou-se um efeito genotípico pronunciado da variedade Rio Branco em relação as demais variedades quanto ao número de brotações formadas. Nesta concentração, o número de brotações formadas na variedade Rio Branco foi de 431,7, número significativamente superior ao observado para as variedades Senador Guiomard e Quinarí que não diferiram significativamente entre si e que apresentaram formação de 363,9 e 362,2 novas brotações, respectivamente, a partir de cinco brotações inicialmente inoculadas e após 150 dias de cultivo. Já em meio de cultura com $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, as variedades Rio Branco e Senador Guiomard não diferiram significativamente quanto ao número de brotações formadas (312,2 e 333,6 por parcela, respectivamente), sendo, no entanto, estatisticamente superiores à variedade Quinarí que, nesta concentração de BAP, proporcionou o acúmulo de 219,1 brotos por parcela.

Se na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP a variedade Rio Branco apresentou a formação de 431,7 novas brotações por parcela, na concentração de 6 mg.L^{-1} de BAP esta variedade acumulou 193,5 brotos por parcela, ou seja, uma diminuição no número de brotações superior a 120%. Nesta concentração de BAP testada, os melhores resultados foram verificados na variedade Senador Guiomard, a qual apresentou a formação de 404,8 novas brotações por parcela, ao final de 150 dias de cultivo em meio Dupla-Fase. Com 233,5 brotações formadas, variedade Quinarí foi significativamente superior à variedade Rio Branco e inferior à variedade Senador Guiomard no número de brotações acumuladas nesta concentração de BAP (Figura 5).

De acordo com Roca et al. (1991), o BAP é uma das citocininas mais utilizadas na indução de brotações *in vitro*. Entretanto, a concentração recomendada varia consideravelmente entre os diferentes autores que estudaram a micropropagação de abacaxizeiro. Liu et al. (1988), trabalhando com o cultivar Red Spanish, revelaram que a maior proliferação de brotos ocorreu em meio MS líquido suplementado com 0,3 mg.L⁻¹ de BAP, enquanto Marciani-Bendezú et al. (1990) e Kiss et al. (1995) obtiveram as maiores taxas de multiplicação quando utilizaram respectivamente 4,5 e 5 mg.L⁻¹ do referido regulador de crescimento. Por outro lado, Calixto e Siqueira (1996) verificaram que não houve diferença significativa entre os níveis de BAP, que variaram de 0 a 14 mg.L⁻¹, na proliferação de brotos de abacaxizeiro.

As discrepâncias entre os resultados obtidos pelos diversos autores e os obtidos neste trabalho devem-se provavelmente a diferenças varietais, bem como a diferentes protocolos utilizados, incluindo as formulações do meio de cultura.

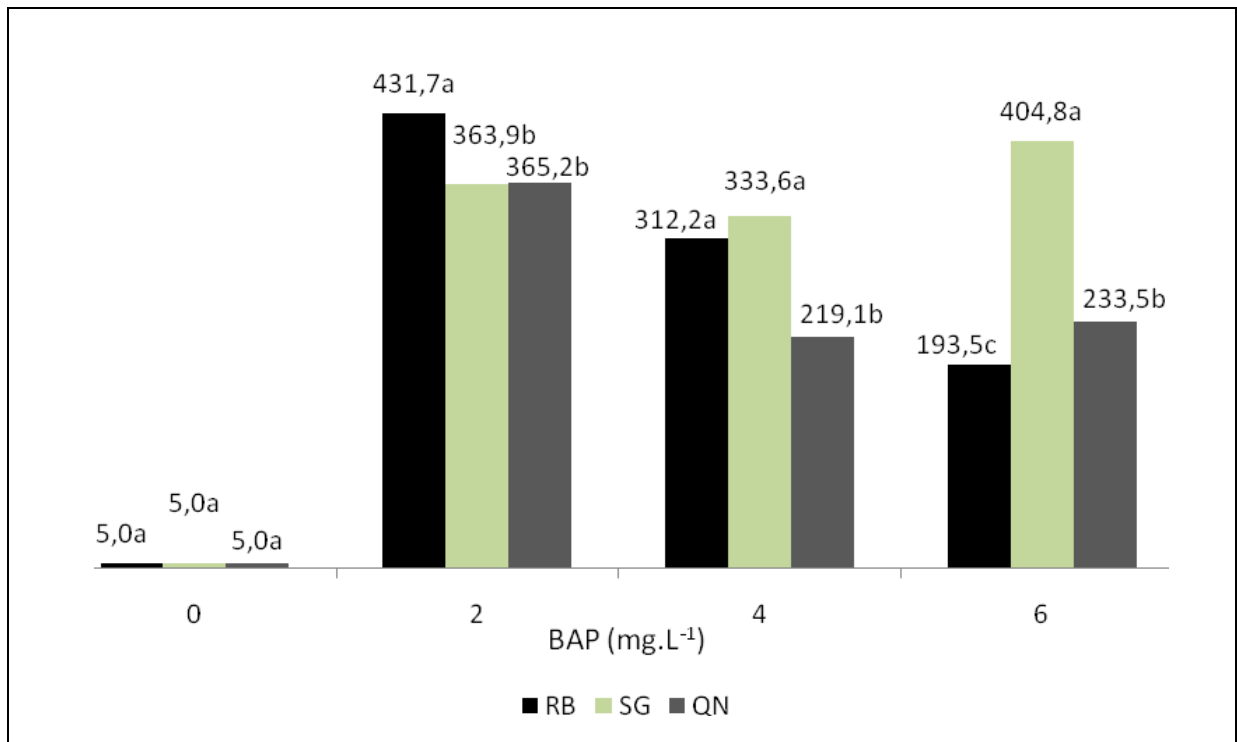


FIGURA 5. Efeito de concentrações de N⁶-Benzilaminopurina (BAP) (0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹) sobre o número de brotações formadas por parcela (número total de brotações formadas a partir de cinco explantes iniciais) entre as variedades de abacaxizeiros Rio Branco (RB), Senador Guimard (SG) e Quinari (QN) em Sistema Dupla-Fase. Embrapa Acre, 2007. *Médias seguidas por letras distintas entre as variedades, dentro de cada concentração de BAP testada, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V. = 3,3%.

Em razão da aplicabilidade e, fundamentalmente, dos experimentos de multiplicação em Sistema Dupla-Fase terem apresentado resultados significativamente superiores quanto ao número de brotações formadas comparativamente ao sistema convencional, ou seja, meio semi-sólido (item 4.1.1) o potencial de produção de mudas a partir deste Sistema e em razão das concentrações de BAP testadas foi estimado para um segundo subcultivo, partindo-se das taxas de multiplicação obtidas no primeiro subcultivo (Subcultivo 1) que pode ser observado na Figura 7 A e 7B.

Assim, destacadamente a variedade Rio Branco apresentou o maior potencial de multiplicação *in vitro* de novas brotações na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP com estimativa de produção 7.465 novas matrizes por explante, após 300 dias de cultivo, ou seja, após um segundo subcultivo de 150 dias. Isto ficou evidenciado pelos resultados obtidos no teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 6), ao se compararem as taxas médias de multiplicação das variedades, mas expressando-as em número de brotações por explantes, após 150 dias de cultivo. Desta forma, nesta concentração e para esta variedade existe necessidade de introdução de um número menor de brotações iniciais para se atingir um número desejado de plantas, uma vez que nesta mesma concentração, as variedades Senador Guimard e Quinari apresentam potencial de produção de brotações de 5.329 e 5.055 brotações por explante, após um segundo subcultivo de 150 dias em Sistema Dupla-Fase, respectivamente. Para a variedade Quinari esta também seria a melhor concentração de BAP a ser usada (Figura 6). Neste sentido, baseando-se na produção de novos brotos nas diferentes concentrações de BAP testadas (Figura 8), para a variedade Senador Guimard este potencial estimado de novas brotações, num segundo subcultivo de 150 dias, atingiria seu máximo na concentração $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP com estimativa de produção de 6.544 novas matrizes de abacaxizeiro por explante, após 300 dias de cultivo em Sistema Dupla-Fase(Figura 6).

Apesar de já ser bastante utilizado para inúmeras espécies de plantas e para diversos fins, o uso comercial da micropropagação e de seus produtos é ainda limitado, no Brasil se comparado a países como Estados Unidos e os da Europa Ocidental, especialmente pelo elevado custo dos reagentes e equipamentos utilizados e pela relativa baixa eficiência no desenvolvimento e multiplicação de algumas espécies (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003; BRAHM e OLIVEIRA, 2004). Por isso, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de

aperfeiçoar e desonerar os custos da técnica (SCHERWINSKI-PEREIRA e FORTES, 2003; PINHO, 2003). Na literatura existem referências sobre vários ensaios e muitos meios de cultura têm sido testados visando melhorar essas etapas. Contudo, os resultados são muitas vezes divergentes e nem sempre é possível a reprodução dos mesmos. Isto se deve, principalmente, ao fato de que a cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, necessita ser adaptada às necessidades das espécies e cultivares, pois estas diferem geneticamente entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo (FORTES e SCHERWINSKI- PEREIRA, 2001).

Outro fator a ser considerado é o estado físico dos meios de cultura. A maioria dos trabalhos com abacaxizeiro *in vitro* baseia-se no uso de meios de cultura semi-sólidos e nos múltiplos subcultivos, geralmente realizados a cada 30 ou 40 dias, para se obter um elevado número de mudas micropropagadas ao final do processo (MACEDO et al., 2003; PEDROSO et al., 2000; MANDAL et al., 2002; BARBOZA et al., 2004). Segundo Zepeda e Sagawa (1981), a formação de gemas múltiplas a partir de gemas axilares de uma coroa, cultivadas *in vitro*, possibilitou a formação de 5.000 plantas, num período de 12 meses. Barboza et al. (2004) verificaram a formação de até 6.578,25 novas brotações a partir de um único explante de abacaxizeiro inoculado em meio de cultura semi-sólido inicial, após cinco subcultivos de 45 dias cada.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos em nosso trabalho, onde as taxas de multiplicação obtidas foram superiores a 5.000 brotações formadas por explante inicial nas variedades testadas. Ressalte-se, entretanto, que o uso do Sistema Dupla-Fase permitiu a obtenção de múltiplas brotações a partir de uma significativa diminuição do número de subcultivos (apenas dois de 150 dias cada), uma vez que apenas meio de cultura de consistência líquida foi adicionada ao mesmo frasco de cultura inicial, portanto, com considerável redução do uso de mão-de-obra envolvida no processo de manipulação dos explantes. Este fato, somado ao uso de meio de consistência líquida, sugerem uma redução significativa nos custos de produção *in vitro* de plantas matrizes desta espécie, tornando a técnica de micropropagação do abacaxizeiro mais eficiente. Ressalte-se que até o momento, não há relatos na literatura sobre o uso de Sistemas Dupla-Fase para a micropropagação de abacaxizeiros.

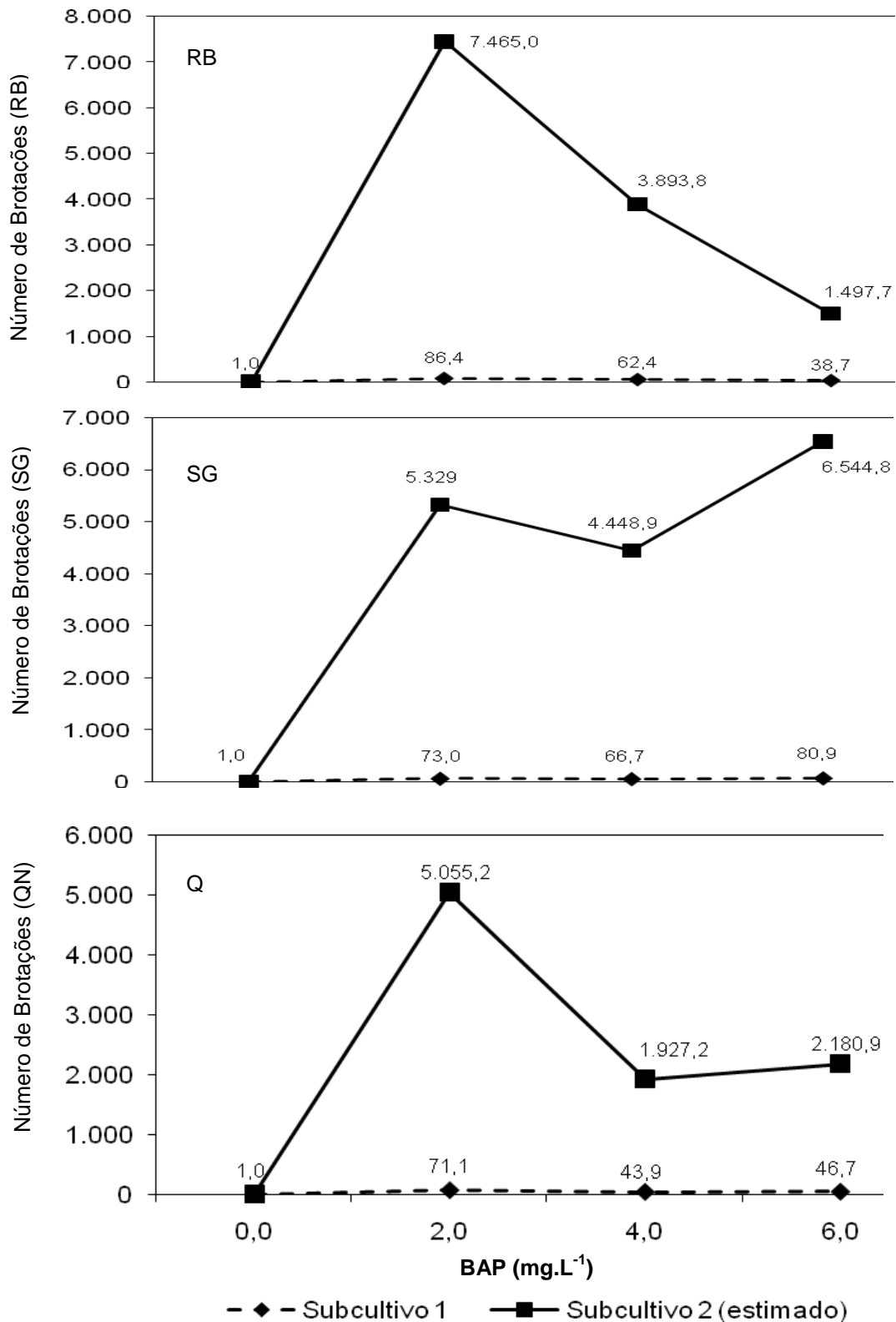


FIGURA 6. Influência de concentrações de BAP (0, 2, 4 e 6 mg.L⁻¹) sobre o número de brotações produzidas *in vitro* por explante em três variedades de Abacaxizeiro: SG - Senador Guimard; RB – Rio Branco e QN – Quinari (Subcultivo 1) e potencial estimado de brotações a serem produzidas (Subcultivo 2), após novo subcultivo de 150 dias em Sistema de Cultivo Dupla-Fase. Embrapa Acre, 2007.

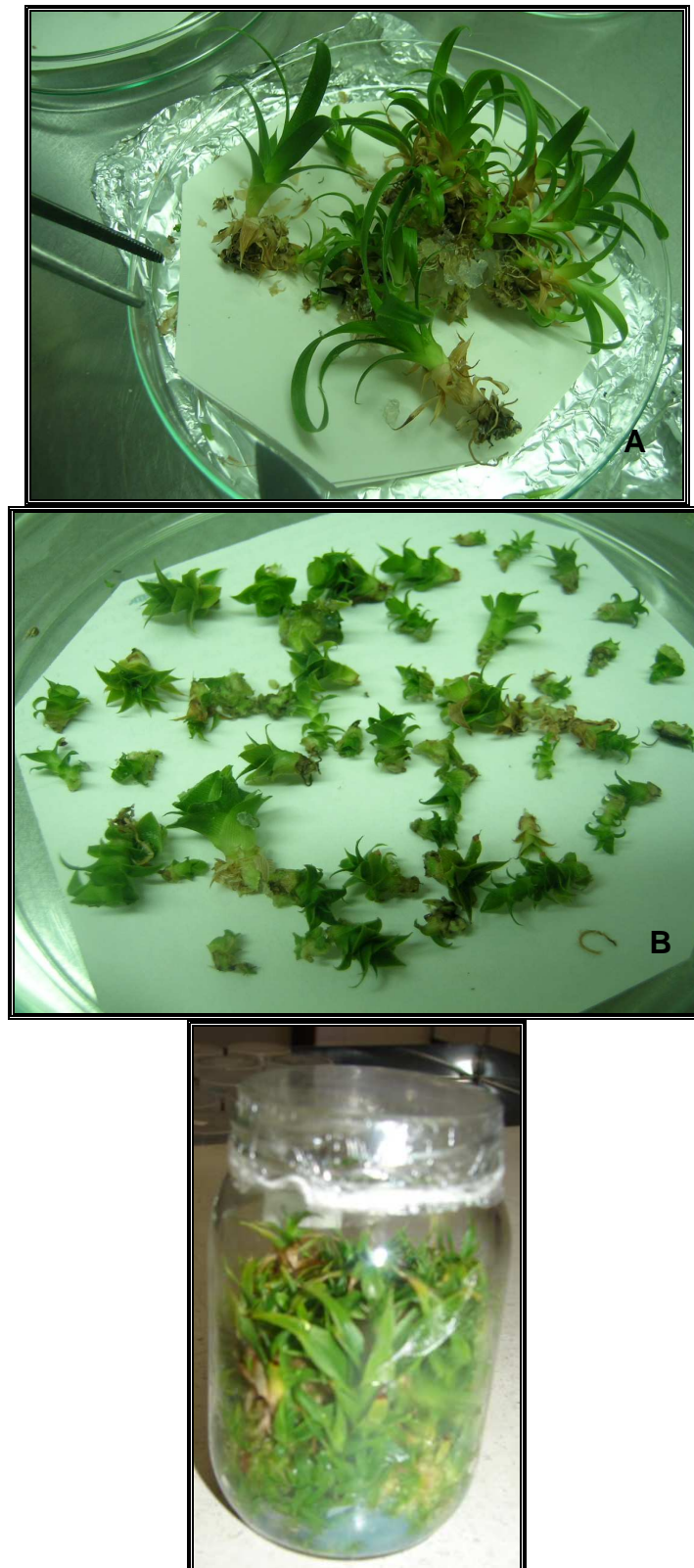


FIGURA 7. (A) Brotos de abacaxizeiro produzidos *in vitro* (B) Brotos de abacaxizeiros selecionados para experimento Dupla-fase (C) Experimento Dupla-fase. Embrapa 2007.

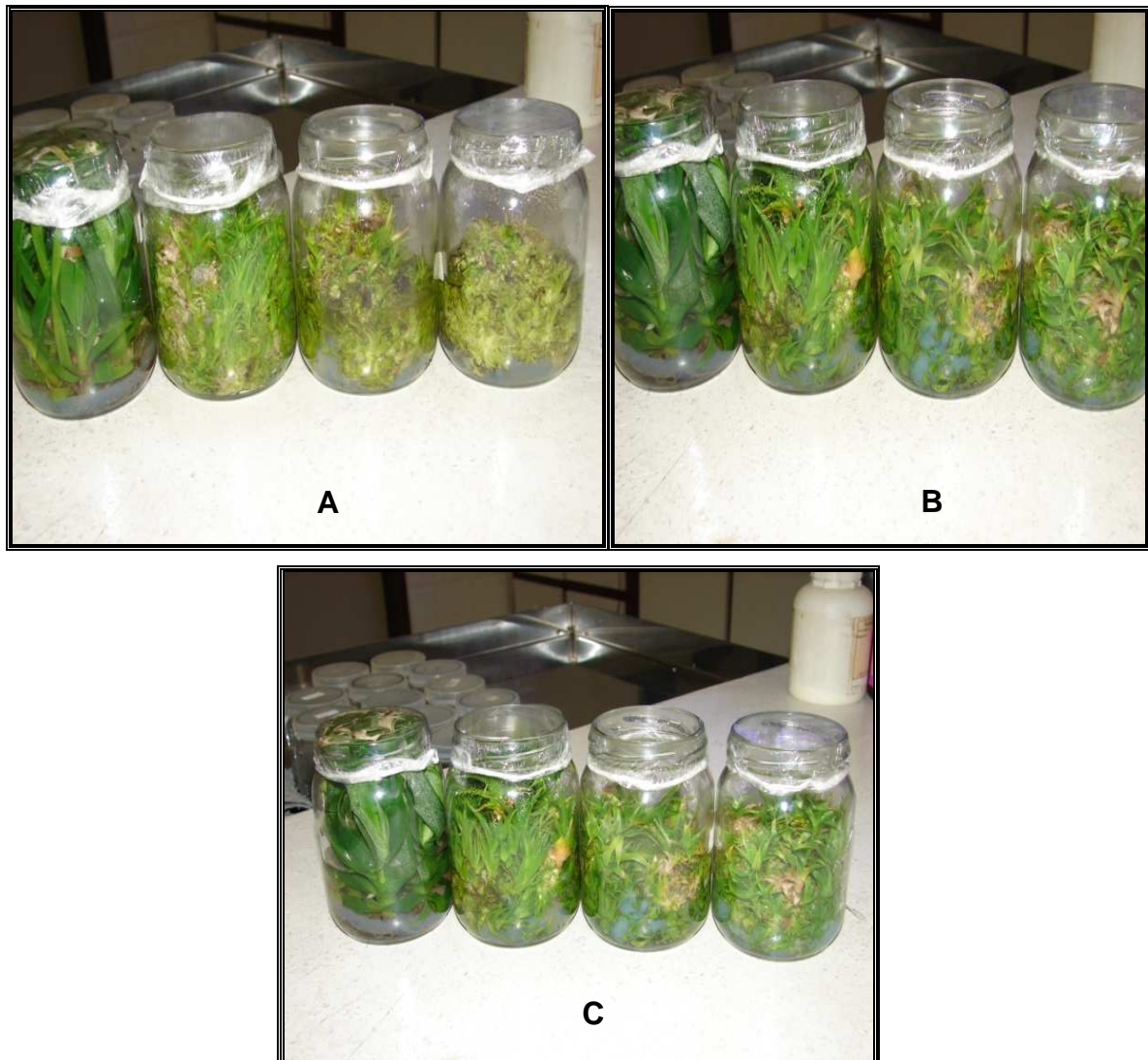


FIGURA 8. Propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiro, em sistema dupla-fase nas concentrações de 0; 2; 4 e 6 mg. L⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA, respectivamente. Brotos de abacaxizeiro estabelecido: cv Senador Guimard (SNG-3) (A), cv Rio Branco (RBR-1) (B), e cv Quinari (SNG-2) (C). Embrapa, 2007.

4.2 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE ABACAXIZEIROS MULTIPLICADOS *IN VITRO*

Os resultados referentes ao enraizamento *in vitro* de brotações formadas durante a etapa de multiplicação das variedades de abacaxizeiro Rio Branco, Senador Guimard e Quinari em razão de diferentes concentrações de AIB e sais do

meio de MS testadas podem ser observadas na Tabela 3. Com exceção da variável comprimento de raízes para as variedades Senador Guimard e Quinari, para as demais variáveis estudadas não foram observadas interações significativa entre os fatores testados (AIB x concentração de sais de MS). Assim, verificou-se que as brotações multiplicadas *in vitro* apresentaram valores próximos a 100% de enraizamento, independentemente da concentração de AIB e da concentração de sais do meio de MS testadas, especialmente quando estas foram mantidas em meio de cultura de MS (Figura-9) com as concentrações de sais reduzidas à metade da formulação normal (MS1/2).

Os níveis e a qualidade da auxina, em geral, são os fatores com maior influência no enraizamento quando se trabalha com espécies de plantas *in vitro*, embora outros componentes do meio de cultura sejam freqüentemente alterados visando melhor promoção do enraizamento, como a redução dos sais de cultivo (Khan et al., 2004). Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam facilmente *in vitro* sob baixos níveis de auxina ou, simplesmente, em meio básico sem reguladores de crescimento (ANDERSON, 1984). Os resultados obtidos por Barboza et al. (2004), cujos tratamentos sem reguladores de crescimento promoveram a rizogênese *in vitro* em 100% dos brotos de abacaxizeiro do híbrido PExSC-52 produzidos em meio com BAP ou com BAP + ANA, corroboram tais informações.

Neste trabalho, alguns fatores podem ter contribuído para o bom enraizamento *in vitro* das brotações, entre eles o tamanho das partes aéreas e a produção endógena de auxina pela planta. Barboza et al (2004) concluem em seu trabalho que brotos de abacaxizeiros multiplicados em presença de BAP a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram melhor desempenho na rizogênese *in vitro*, independentemente da presença ou ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo, o que confirma resultados obtidos no presente trabalho, pois os brotos utilizados no enraizamento foram provenientes do experimento de multiplicação com esta mesma concentração de BAP (COSTA et al., 2007). Além disso, a qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), uma vez que são as partes aéreas as responsáveis pelas fontes de produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimula a rizogênese (BARCELO COLL et al., 1988).

George (1996) relata que para formação de raízes *in vitro* há necessidade de uma fonte de energia para os cultivos, geralmente oriundos de uma fonte exógena de açúcar (em sistemas heterotróficos ou mixotróficos). O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando a fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos. Além disso, para a maioria das espécies, a formação de raízes ocorre pela adição de 20 a 30 g.L⁻¹ de sacarose (George, 1996; Leite et al., 2000), fato que pode ter auxiliado as respostas obtidas, uma vez que os efeitos da adição de AIB não foram significativos para a variável enraizamento (Sriskandarajah e Mullins, 1981; George e Sherrington, 1984; Grattapaglia e Machado, 1998).

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para comprimento de raízes na variedade Rio Branco. Para a variedade Quinari diferenças foram observadas somente quanto as concentrações de sais de MS no meio de cultura, onde resultados superiores foram observados quando as brotações foram mantidas em meio de MS ½ (Tabela 3). Já para a variedade Senador Guiomard, o meio de cultura de MS em sua concentração plena foi o que, de maneira geral, proporcionou o maior comprimento de raízes em meio com 0,0 e 0,1 mg.L⁻¹ de AIB, enquanto que na concentração 0,5 mg.L⁻¹ de AIB não foram verificadas diferenças significativas para esta variável em razão da concentração de sais do meio de MS testadas.

TABELA 3. Efeito de diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹) e da concentração de sais do meio de MS (MS ½ e MS Pleno) sobre a percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes (cm) nas variedades de abacaxizeiro Rio Branco, Senador Guiomard e Quinari. Embrapa Acre, 2007

Cv. Rio Branco									
AIB (mg.L ⁻¹)	Enraizamento (%)			Nº raízes			Comp. raízes (cm)		
	Meio			Meio			Meio		
	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média
0,0	100	95,0	96,7 a	3,5	3,2	3,3 a	8,8	7,6	8,0 a
0,1	100	100	100 a	4,1	3,1	3,4 a	6,0	8,3	7,5 a
0,5	100	100	100 a	5,1	2,5	3,8 a	5,0	5,1	5,1 b
Média	100 A	98 A		4,2 A	3,0 B		6,6 A	7,4 A	

Cv. Senador Guiomard									
AIB (mg.L ⁻¹)	Enraizamento (%)			Nº raízes			Comp. raízes (cm)		
	Meio			Meio			Meio		
	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média
0,0	100	100	100 a	3,5	3,8	3,6 a	7,5 bB	9,6 aA	8,4 a
0,1	100	100	100 a	3,3	3,5	3,4 a	8,4 abB	9,4 abA	8,9 a
0,5	100	100	100 a	3,4	3,3	3,3 a	9,3 aA	8,2 bA	8,6 a
Média	100 A	100 A		3,4 A	3,5 A		8,2 B	9,0 A	

Cv. Quinari									
AIB (mg.L ⁻¹)	Enraizamento (%)			Nº raízes			Comp. raízes (cm)		
	Meio			Meio			Meio		
	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média	MS ^{1/2}	MS ^{Pleno}	Média
0,0	100	60,0	86,7 a	2,7	2,1	2,5 a	6,7 aA	8,7 aA	7,4 a
0,1	100	100	100 a	5,0	3,0	4,0 a	8,5 aA	6,3 aB	7,4 a
0,5	100	100	100 a	3,4	3,0	3,3 a	8,4 aA	6,9 aA	7,9 a
Média	100 A	86,7 A		3,4 A	2,7 A		7,8 A	7,3 A	

*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

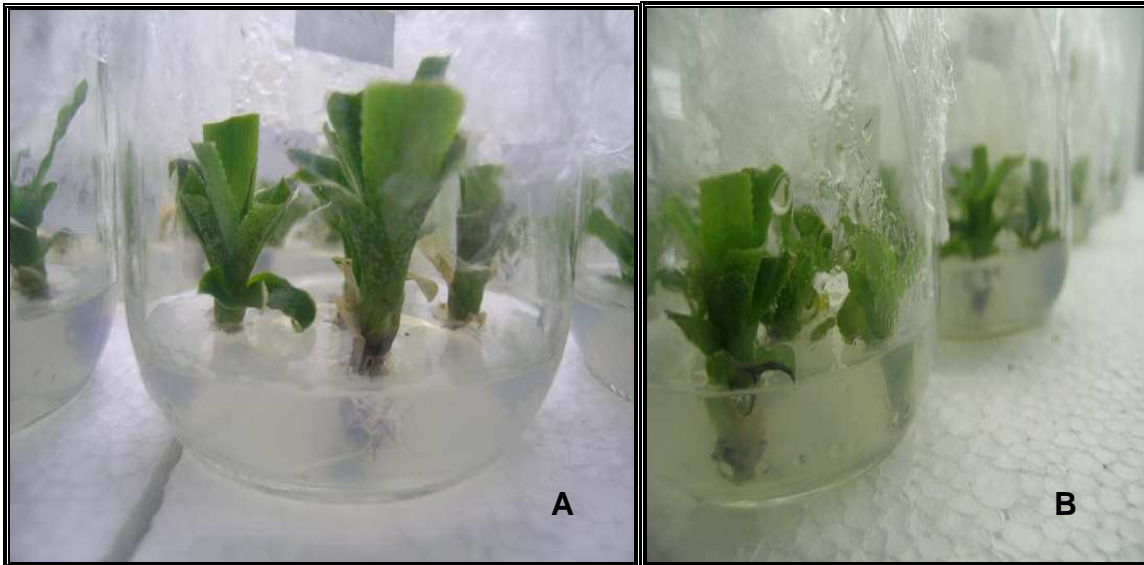


Figura 9 – Aspecto de brotações de abacaxizeiro em meio de cultura de enraizamento. Embrapa, 2007.

4.3. CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIROS SOB REGIME DE CRESCIMENTO MÍNIMO

Como era de se esperar, verificou-se que na média, a altura, número total de folhas, folhas vivas e número de folhas mortas, apresentaram os maiores valores quando o material foram mantidos sob temperatura de 25 °C, independentemente do genótipo avaliado (Tabela 4). Isso sugere que nesta temperatura as plantas mantiveram alta atividade metabólica. Fato que se repetiu na temperatura de 20 °C (Figuras 10-B, E) sendo uma característica negativa para a conservação *in vitro*, pela necessidade de subcultivos constantes (Figuras 10 -C, F, G, H).

Resultados semelhantes ao ocorrido na temperatura de 25 °C foram observados quanto aos períodos de avaliação, uma vez que de maneira geral na média das variedades e, independentemente da temperatura de conservação testada, as plantas avaliadas aos 6 meses apresentaram valores de altura, número total de folhas, número de folhas vivas e número de folhas mortas maiores que aos 3 meses, com algumas poucas exceções(Tabela-4).

No período de seis meses as variedades responderam de forma homogênea para a temperatura de 15 °C (Figura 10-A,D), onde apresentaram menor

crescimento dos explantes, sugerindo que esta temperatura poderia ser utilizada para a conservação do abacaxizeiro, por não ter sido verificado morte de plantas nestas condições. Segundo Withers (1991) a redução da temperatura entre 15 e 25 °C para culturas de clima tropical é ideal quando o objetivo é diminuir o crescimento dos explantes cultivados *in vitro*. Ainda segundo este autor, o uso de temperaturas mais baixas no cultivo *in vitro* reduz a ação de enzimas e do metabolismo geral das plantas, sugerindo que a redução da temperatura de crescimento deve estar como primeiro fator limitante a ser testado na conservação *in vitro*. Sandoval e Müller (1989) relataram que a temperatura de 5 °C causou morte nos ápices de banana conservadas *in vitro*. No entanto, quando a temperatura foi aumentada para 15 °C, foi possível conservar os explantes durante 13 a 17 meses.

TABELA 4. Influência da temperatura de conservação (15 °C, 20 °C e 25 °C) sobre a altura (cm), número total de folhas, número de folhas vivas e número de folhas mortas em três variedades de abacaxizeiro: Rio Branco, Quinari e Xapuri, após 3 e 6 meses de manutenção *in vitro*. Embrapa, 2007

Temp. Cons.	Altura (cm)								
	Cv. Rio Branco			Cv. Quinari			Cv. Xapuri		
	Meses			Meses			Meses		
	3	6	Média	3	6	Média	3	6	Média
15 °C	2,7 cB	5,0 cA	3,9 c	2,8 bC	5,2 cA	4,0 c	3,4 bB	6,4 cA	4,9 c
20 °C	4,0 bB	8,0 bA	6,0 b	4,4 bB	8,0 bA	6,2 b	4,6 abB	9,7 bA	7,2 b
25 °C	6,8 aB	13,1 aA	9,9 a	6,4 aB	12,8 aA	9,6 a	6,2 aB	14,8 aA	10,5 a
Média	4,5 B	8,7 A		4,5 B	8,6 A		4,7 B	10,3 A	

Temp. Cons.	Nº de folhas								
	Cv. Rio Branco			Cv. Quinari			Cv. Xapuri		
	Meses			Meses			Meses		
	3	6	Média	3	6	Média	3	6	Média
15 °C	5,1	5,4	5,2 b	6,2 bA	6,0 bA	6,1 b	6,6	6,8	6,7 b
20 °C	5,5	6,3	5,9 ab	6,6 bA	7,0 bA	6,8 b	6,2	7,6	6,9 b
25 °C	6,6	7,8	7,2 a	8,6 aB	12,0 aA	10,3 a	8,1	10,6	9,3 a
Média	5,7 A	6,5 A		7,1 A	8,3 B		6,9 B	8,3 A	

Temp. Cons.	Nº de folhas vivas								
	Cv. Rio Branco			Cv. Quinari			Cv. Xapuri		
	Meses			Meses			Meses		
	3	6	Média	3	6	Média	3	6	Média
15 °C	4,2	5,4	4,8 b	4,4 bA	4,8 bA	4,6 c	5,8	5,6	5,7 b
20 °C	4,8	5,2	5,0 b	6,2 bA	5,8 bA	6,0 b	5,6	6,4	6,0 b
25 °C	5,2	6,8	6,0 a	8,6 aB	9,0 aA	8,0 a	6,6	8,1	7,3 a
Média	4,7 B	5,8 A		7,1 A	6,5 A		6,0 A	6,7 A	

Temp. Cons.	Nº de folhas mortas								
	Cv. Rio Branco			Cv. Quinari			Cv. Xapuri		
	Meses			Meses			Meses		
	3	6	Média	3	6	Média	3	6	Média
15 °C	0,8 abA	0,6 aA	0,7 b	1,8	1,2	1,5 ab	0,8	1,2	1,0 b
20 °C	0,6 bA	1,2 aA	0,9 b	0,4	1,2	0,8 b	0,6	1,2	0,9 b
25 °C	1,6 aB	3,2 bA	2,4 a	1,6	3,1	2,3 a	1,4	2,6	2,0 a
Média	1,1 B	1,7 A		1,3 A	1,8 A		0,9 B	1,7 A	

*Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada variável e variedade avaliada, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

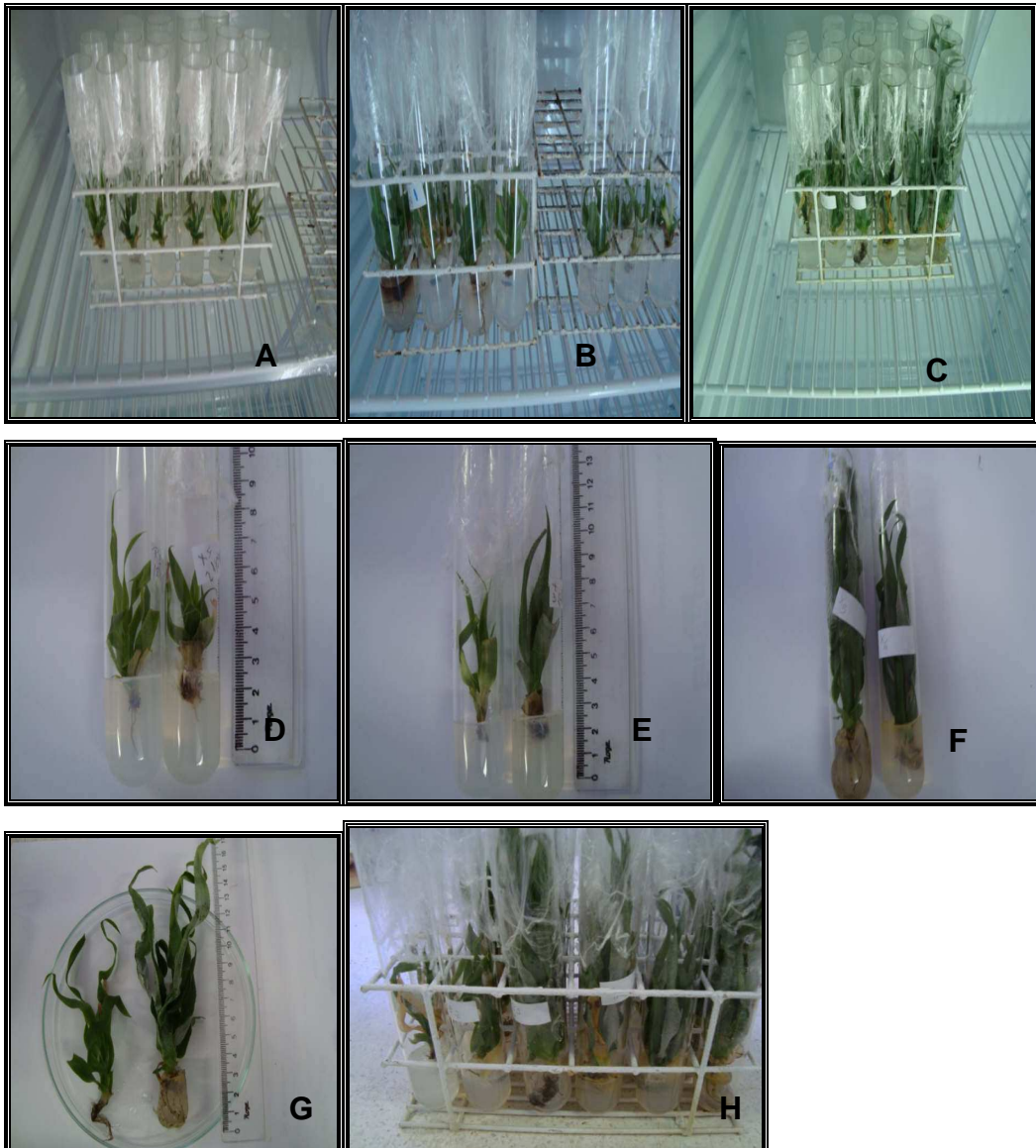


FIGURA 10. Aspecto de brotações de abacaxizeiros conservados em BOD na temperatura de 15 °C, 20 °C e 25 °C após de 6 meses. 15 °C figuras:(A e D) 20 °C figuras(B e E) e 25 °C figuras(C, F, G e H) Embrapa, 2007.

4.4 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS DE ABACAXIZEIROS PRODUZIDAS *IN VITRO*

As plantas de abacaxizeiro obtidas *in vitro* quando aclimatizadas apresentaram 100% de sobrevivência, após 50 dias de permanência em viveiro (Figura 11), independente da cv testada. Moreira (2001) e Moreira et al. (2006), analisando o efeito do substrato, em mudas micropropagadas, em fase de aclimatização, observaram que a adição de matéria orgânica ao substrato tem

importância significativa no desenvolvimento das mudas. Este fato reforça o resultado encontrado no presente trabalho, pois o substrato utilizado foi formado por terra de encosta, vermiculita e esterco bovino, na proporção de 3:1:1 (v/v), de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2008). O uso do esterco proporciona efeitos benéficos no crescimento vegetativo de mudas (ALMEIDA, et al 1999; MATOS e CABRAL 2002). Moreira et al. (2006) trabalhando com mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola também confirmam resultados positivos da composição de substratos com esterco bovino, o que confirma o resultado alcançado na presente pesquisa.

Segundo Giacomelli e Sobrinho (1982), quando as condições climáticas são favoráveis, o abacaxizeiro emite, em média, uma folha por semana. No presente trabalho as mudas que foram acondicionadas em condições de telado, coberto com filme de polietileno transparente (150 μm) e sombrite (50% de interceptação luminosa), permaneceram pelo período de 50 dias, o que proporcionou condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento das mudas.

Cabe salientar que independente da variedade, as folhas se encontravam expandidas e verdes (Figura 11), um indicativo de que as plantas apresentavam-se resistentes para serem plantadas em campo. As folhas são as principais responsáveis pela captação de energia solar para a fotossíntese, que por sua vez, é responsável pela formação de carboidratos, por fim, a constituição da matéria seca vegetal. Outro fator de grande importância econômica na presente pesquisa foi a utilização de tubetes de 115 cm^3 (Figura 11), que por serem os menores, constituem-se uma boa alternativa para o emprego de aclimatização de mudas de abacaxizeiros por períodos curtos, possibilitando a economia de material, de espaço físico e conseqüentemente, menor custo na produção (OLIVEIRA et al 2008).



FIGURA 11. (A) Planta de abacaxi em tubete plástico de 115 cm^3 , preenchido com substrato (terra de encosta, vermiculita e esterco bovino); (B) Plantas de abacaxizeiros em condições de viveiro, coberto com filme de polietileno transparente ($150 \mu\text{m}$) e sombrite (50% de interceptação luminosa), após 50 dias. Embrapa, 2007.

5 CONCLUSÃO

- ✓ O Sistema Dupla-Fase é superior ao meio de cultura semi-sólido na taxa de multiplicação *in vitro* e na formação de brotações maiores que 0,5 cm de abacaxizeiros;
- ✓ A suplementação do meio de cultura Dupla-Fase com BAP é necessária para a indução de múltiplas brotações *in vitro* de variedades de abacaxizeiro;
- ✓ Com o uso do Sistema Dupla-Fase é possível estimar a taxa potencial de multiplicação de 7.465 novas brotações por explante para a variedade Rio Branco, 5.329 para a Senador Guimard e 5.055 para a Quinari ao final de dois subcultivos de 150 dias cada;
- ✓ A redução de sais de MS para 50% beneficiam o enraizamento de brotações de abacaxizeiro micropropagadas, não sendo necessária a adição de AIB no meio de cultura para acelerar ou aumentar o número de raízes;
- ✓ A conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxizeiro pode ser feito em temperatura de 15 °C sem problema de morte de materiais;
- ✓ Plantas de abacaxizeiros podem ser aclimatizados em tubetes plásticos de 115 cm³, preenchidos com substrato formado por terra de encosta, vermiculita e esterco bovino, na proporção de 3:1:1 (v/v), com sobrevivência de 100% das plantas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhoramento no mundo globalizado enfrenta novos desafios, tendo a sua disposição novas tecnologias. Acredita-se que ele deva continuar evoluindo em direção a progressos genéticos mais previsíveis de forma gradativa, com o uso da biotecnologia. A parceria estabelecida entre melhoristas e biotecnologistas resultará em benefícios para a sociedade. Atualmente, variedades desenvolvidas. Alguns possíveis impactos negativos da biotecnologia têm sido considerados, a exemplo da vulnerabilidade biotecnológica interespecífica, passível de ocorrer quando, por exemplo, um gene da resistência a uma praga fosse introduzido em várias espécies simultaneamente, resultando na possibilidade de uma suscetibilidade endêmica na eventualidade de quebra desta resistência. A corrida da biotecnologia certamente criará novas perspectivas para os melhorista mas, eventualmente, poderá estabelecer platôs de rendimentos com as restrições impostas.

A utilização de mudas de abacaxizeiros com qualidade, preferencialmente certificadas, é uma medida essencial para a melhoria do sistema de produção de frutas no Brasil, consistindo no alicerce para a transformação das potencialidades agroclimáticas do país em pomares produtivos.

Por meio do sistema de multiplicação *in vitro* apresentado e os bons resultados obtidos na micropropagação, é possível sugerir o uso desta técnica para a produção de mudas ou matrizes de abacaxizeiros em larga escala, com custos reduzidos e durante todo o ano, isentas de patógenos, em pequeno espaço físico e curto período de tempo, de forma economicamente viável e atendendo às exigências e necessidades dos produtores por mudas de qualidade. Outra significativa vantagem do sistema proposto refere-se à sua versatilidade, já que é aplicável a todas as variedades de abacaxizeiros recomendadas pela Embrapa Acre, não tendo sido detectados problemas típicos da cultura de tecidos, relativos ao surgimento de variantes somaclonais, oxidação e vitrificação de plantas.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, C. C. **Estudo de cultivares de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr.) propagadas *in vitro* quanto a resistência a fusariose.** 1998. 85p. Dissertação (mestrado em botânica)-Universidade Rural de Pernambuco, Recife, 1998.
- ALMEIDA, O.A. de; REINHARDT, D.H.R.C. Irrigação. In: CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. **O abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia.** Brasília: Embrapa, 1999. p. 203-227. (Comunicação para Transferência de Tecnologia).
- ALMEIDA, W.A.B. de; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.A.P. de C. Optimization of protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.24, n.2, p. 296-300, ago. 2002.
- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p.3-5.
- ALVES, A. de A.; REINHARDT, D.H.; CALDAS, R.C. Manejo e avaliação da soca do abacaxi 'Pérola' nas cond árido de Itaberaba, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v 3, p. 323-331, 1998.
- AMARAL, L. **Conservação *in vitro* de explantes de três cultivares híbridas de Amarílis.** Dissertação apresentada ao Instituto agrônômico (IAC), na área de Melhoramento Genético Vegetal, como requisito parcial à obtenção do título de mestre. Campinas, 2005.
- ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, p. 343-347, 1984.
- ANTONIALI, S.; SANCHES, J. **Abacaxi: importância econômica e nutricional.** 2008. Disponível em: <[HTTP://www.infobinbos.com/Artigos/2008_4/abacaxi/index.htm](http://www.infobinbos.com/Artigos/2008_4/abacaxi/index.htm)> Acesso em: 18 dez. 2008.
- ARAÚJO, K. G. L. et al., Utilização de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne para a produção de vinhos - estudo da composição química e aceitabilidade **Ciência Tecnologia de Alimentos**. vol.29 no.1 Campinas jan. 2009.
- BALZON, T. A.; CARDOSO, L.D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi (*Ananas sp.*) sob regime de crescimento mínimo. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2008, Vitória. Anais. Vitória : Incaper, 2008. v. 1. p. 1-5.

BARBOZA, S.B.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.725-733, 2004.

BEROVA, M.; ZLATEV, Z.; STOEVA, N. Effect of Paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.75-84, 2002.

BORGES, N.S.S.; CORREIA, D.; LIMA, R.N. **Multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxi ornamental *Ananas porteanus Hort Veirch ex c. Koch***. Brasília: Embrapa, 2001. 5p. (Recomendação técnica, 25).

BOSA, N. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, 510-3, 2003.

BRAHM, R.U.; OLIVEIRA, R.P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.507-510, 2004
Brasileira de Fruticultura, v. 29, p. 128-132, 2007.

CABRAL, J.R.S.; CUNHA, G.A.P. da; RODRIGUES, E.M. Micropropagação do abacaxizeiro. VIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Vol I, Florianópolis, SC. **ANAIS**. SBF/EMPASC, p.124-127, 1984.

CALIXTO, M. C.; SIQUEIRA, D. L. Efeitos do BAP e ferimentos na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Smooth Cayenne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14, 1996, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1996. 561p.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J.R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 184-189, 2009.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 717-720, jul. 2004

CAVALCANTE, M. J. B.; SHARMA, R. D.; GONDIM, T. M. S. Ocorrência de Nematóides na Rizosfera de Banana (*Musa spp.*) e Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) em Rio Branco, AC. **Comunicado Técnico 104**. Embrapa. Acre, dezembro. 2001.

CID, L. P. B. A. Propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.19, p.16-21, 2001.

COELHO, R. I.; CARVALHO, A. J. C.; LOPES, J. C.; TEIXEIRA, S. L.; MARINHO, C. S. Coroa do abacaxi smooth cayenne na produção de mudas do tipo rebentão. **Ciências. Agrotecnológicas.**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1867-1871, nov./dez., 2007
concentrações de sacarose no meio de cultura e da

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, J.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 41-46, 2007.

COSTA, T. da; ZAFFARI, G.R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Schultz) var. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.109-113, 2005.

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

CUNHA, G. A. P. **Nova tecnologia para o controle da fusariose do abacaxizeiro** . Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, DEZ 2003.

CUNHA, G. A.P. Informativo Mensal. 2005. . Embrapa Mandioca e Fruticultura. Disponível em:<<http://www.cnpmf.embrapa.br>>. Acesso em 12 de janeiro de 2008.

DE LA VIÑA, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229-237, 2001.

Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999, 480p.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 61.

EMBRAPA. Sistemas de Produção. Dez./2005. Disponível:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/CultivodoAbacaxiRO/mudas.htm>>. Acesso em: 24 set. 2007.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária . Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 15 Nov. 2007.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e ADAMS, utilizadas como porta enxerto para pereira. **Scientia Agraria**, v.5, n.1-2, p.61-68, 2004.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLEZ, J.L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, New York, v.18, p. 743-748, 1999.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FONTES, G. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFEPEL, 1995, 178p.

FAEP. Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Boletim informativo**. 2006. Disponível em:<http://www.faep.com.br/comissoes/frutas/reuniao06.asp>. Acesso em: 20 fev. 2009.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Roma: FAOSTAT Database Gateway – FAO.2008. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/> > Acesso em: 10 jan. 2008.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *In vitro cellular & developmental biology-plant*, Columbia, v. 33, n. 3, p. 209-212, 1997.

FAUTH, A.; TOFOL, M.; SILVA, A.L.; MARASCHIN, M. Aclimação de mudas de abacaxi (*Ananas comusus* (L.) Merrill) resistentes à fusariose, cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.2, p.7-12, set. 1994.

FAZOLIN, M.; LEDO, A. S.; AZEVEDO, F. F. Níveis de Infestação de *Thlastocoris laetus* Mayr (Hemiptera: Coreidae) em Quatro Cultivares de Abacaxi em Rio Branco, AC., Rio Branco, AC, EMBRAPA, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1999. p.220.

FIGUEIREDO, G. S. F.; NUNES, A. C. G.; MENDES, R. A.; CARDOSO, L. D. FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2003.

FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 9, p. 844-850, 2003.

FITCHET, M. Organogenesis in callus cultures of pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merrill). **Acta Horticulturae**, v. 275, p. 267-274, 1990b.

FOLLIOT, M.; MARCHAL, J. Croissance des plants d'ananas issus de culture "*in vitro*", pedant la phase d'aclimatation. **Fruits, Numéro spécial Ananas**, p.343-349, 1991.

FORD, Y.Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, Nedherlands, v.36, n.2, p.149-159, 2002. Disponível em <<http://www.springerlink.com.w10050.dotlib.com.br/content/ddg65wkrv1xa59qk/?p=de2f551da68545c0a1a69b2b66760b46&pi=13>>. Acesso em 12 fev. 2008.

FORTES, G. R. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n.1, p. 183-185, 2001.

GALVANESE, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de ana, 6-ba e Agar na propagação *in vitro* de aechmea Blanchetiana (baker) l.b. smith, bromélia nativa da mata Atlântica. **Revista, Ceres**, 63-67. 2007.

GIACOMELLI, E.J. e TEÓFILO SOBRINHO, J. Seleção preliminar de alguns cultivares de abacaxizeiro resistentes à fusariose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

FRUTICULTURA, 7., Florianópolis, 1983. **Anais**. Florianópolis, Sociedade Brasileira de Fruticultura/Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1982, v. 1, p. 145-161.

GIATTI L.; GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA, G. P. P. Ação do bap na regeneração *in vitro* de *blc* owen holmes ponkan x *brassavola* digbiana nº 2. **Revista Ciências. Agrotecnologia**. vol.31, n.5 Lavras, Sept./Oct. 2007.

GOTTARDI, M. V. C. et al., Avaliação De Plantas Matrizes De Abacaxizeiro Cultivar Smooth Cayenne Utilizando Marcadores Rapd E Padrões Isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol. 23 n.3 Jaboticabal Dec. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452001000300002>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.

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

GUERRA, M. P.; DAL-VE스코, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 2005.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HASSANEIN, A.M.; IBRAHIEM, I.A.; GALAL, A.A.; SALEM, J.M.M. Micro-propagation factors essential for massal production of synthetic seeds in banana. **Journal of Plant Biotechnology**, v.7, n.3, p.1-7, 2005.

HOVÁRTH, G. Triacontanol-siported micropropagation of woody plans. **Plant Cell Reports**, v.20, p.16-21, 2001.

Ibaraki Y, Nozaki Y Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. 2005. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 80: 111-113.

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática – Sidra 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 28 mai 2008.

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática. 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 28 mai 2008.

IBRAF- Instituto Brasileiro de Frutas. Estatísticas. 2008. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em 02 março 2009. intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.89, p. 207-215, 2001.

KHAN, S.; NASIB, A.; SAEED, B.A. Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). **Pakistan Journal of Botany**, v.36, n.3, p.611-615, 2004.

KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **Hort Science**, Alexandria, v.30, p.127-129, 1995.

KOTSIAS, D.; ROUSSOS, P.A. Investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. **Scientia Horticulturae**, v.89, p.115-28, 2001.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, 2000.

LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de NETO, C. E. R. e ALBUQUERQUE, M. M. de, Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 37, n.10, p. 1359-1364, out. 2002.

LEÓN, J. **Botânica de los cultivos tropicales**. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica, 445p. 1984.

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.447, p. 659-663, 1997.

LIMA, E.C. **Indução e enraizamento *in vitro* de brotações em segmentos nodais de sangra d'água**. 2004. 71p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIPOW, S. R. Gap analysis of conserved genetic resources of Forest trees. **Conservation Biology, Malden**, v. 18, n. 2, p. 412-423, 2004.

LIU, L.J.; ROSA-MARQUEZ, E.; LIZARDI, E. *In vitro* propagation of spineless red Spanish pineapple. **Phytopathology**, St. Paul, v.12, n.77, p.17-21, 1988.

MACÊDO, C.E.C. de; SILVA, M.G. da; NÓBREGA, F.S. da; MARTINS, C.P.; BARROSO, P.A.V.; ALLOUFA, M.A.I. 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.

Macedo, C.E.C.; Silva, M.G.; Nobrega, F.S.; Martins, C.P.; Barroso, P.A.V. & Alloufa, M.A.I. 2003. 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 25**: 501-504.

MACHADO, M. P.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, v.5, n.1-2, p.69-72, 2004.

MANDAL, A. B.; APARNA M.; ELANCHEZHIAN, R. *in vitro* micropropagation of *Ananas comosus* L. (Merr.) var. Queen. **Journal of Applied Horticulture**, v. 4, n.2, p.107-112, 2002.

MANICKAM, V.S.; MATHAVAN, R.E.; ANTONISAMY, R. Regeneration of Indian ginseng plantlets from stem callus. **Plant Cell and Organ Culture**, v.26, p.181-5, 2000.

MARCIANI-BENDEZÚ, J.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.12, n.1, p.35-39, 1990.

MATOS, A.P. de; CABRAL, J.R.S. **Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro**.2002.Disponível em:<http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/abacaxi_32.pdf>. Acesso em:10 de abr. 2007.

MENDES, B. M. J.; MENDES, F. J.; TULMANN NETO, A.; DEMÉTRIO, C. G. B.; PUSKE, O. R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 12, p. 863 - 867, 1996.

MONTEIRO, M. J. C. previsões otimistas para a produção. **Agroanalysis**. V., n., p.32-34, fevereiro de 1997.

MORAES, L.K.A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; SILVA, A.L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura 'dupla-fase'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.403-405, 2004.

MOREIRA MA; ANJOS SOBRINHO A; PASQUAL M. 1999. Indução ao estiolamento *in vitro* de brotos de abacaxi cv. Pérola. **Revista da Universidade de Alfenas** 5: 193-197.

MOREIRA MA; PASQUAL M; CARVALHO JG; FRÁGUAS CB. 2003. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia** 27: 1002-1006.

MORGADO, I. F.; AQUINO, C. N. P.; TERRA, D. C. T. Aspectos econômicos da cultura do abacaxi: sazonalidade de preços no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.26, no.1, p.44-47, abril 2004.

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.

NASCENTE, A. S. Cultivo do Abacaxi em Rondônia. Embrapa. Rondônia.dezembro. 2005.

NASCENTE, A.S.; da COSTA, R.S.C.; COSTA, J.N.M. **Cultivo do Abacaxi em Rondônia. Sistema de Produção, 3**. Versão Eletrônica. Dez/2005: disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> acesso em: 29-05-2008.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.30-55.

- NASSAR AH. 2003. Slow growth storage of encapsulated germplasm of *Coffea arabica* L. **International Journal of Agriculture & Biology**. n.5: 517-520.
- NEGASH, A. In vitro regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.62, p.153-8, 2000.
- NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do Ginseng Brasileiro. *Pfaffia glomerada* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.
- NODOYE, M.; DIALLO, I.; GASSAMA, Y.K. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.
- NODOYE, M.; DIALLO, I.; GASSAMA, Y.K. *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. Africam. **Journal of Biotechnology**, v.2, n.11, p.421-4, 2003.
- OLIVEIRA, J. F. **Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etilingela elatior* (Jack) R. M. Smith**. 2007. 72 f. Dissertação (mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2007.
- OLIVEIRA, J.P.; COSTA, F.H.S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira aclimatizadas nas condições da Amazônia Sul Ocidental sob a influência de diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 459-465, 2008.
- OLORODE, O. Conservation of plant genetic resources. African Journal **Traditional Complementary and Alternative medicines**, Ile-Ife, v. 1, p. 4-14, 2004
- PASQUAL, M.; MOREIRA, M.A.; ANJOS SOBRINHO, A. dos. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, v.19, p.20-23, 1998.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.
- PEDROSO, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell and Organ Culture**, v.60, p.47-53, 2000.
- PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.23, no.2, Jaboticabal, Agosto, 2001.
- PESCADOR, R.; KOLLER, O.C. Propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comusus* (L.) Merrill) cv. Pérola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.2, p.1-4, 1992.
- PINHO, R. S. **Comparação entre Agar e amido como agentes geleificantes na micropropagação de batata doce *Ipomoea batatas* (L.) Lam**. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

PINTO, J.E.B.; LAMEIRA, O.A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, jan./mar. 2001.

PRIMROSE, S.B. **Modern biotechnology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. P.176.
RECH-FILHO A. 2004. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. Florianópolis: UFSC. 74 p. (Dissertação).

REINHARDT, D. H. R. C. Propagação do abacaxi. **Informe Agropecuário**. Ano 11, n. 130, p. 18-21, 1985.

REINHARDT, D.H; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S.; SANCHES, N.F.; MATOS, A.P. de M. Pérola and Smoth Cayenne cultivars growth, flowering, pests, diseases, yield and fruit quality aspects. **Fruits**, Paris, v.57, n.1, p. 43-53, 2002.

RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz e de solidificante no enraizamento *in vitro* de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) CULTIVAR IRAPUÃ. XVI CIC - XVI Congresso de Iniciação Científica UFPel 2007

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 66p.

ROCHA DA, M. A. C.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S. ; LUCIMÁRIO PEREIRA BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2008, vol.30, n.3, p. 769-774.

ROGALSKI, M. Enraizamento *in vitro* de portaenxerto de Prunus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.293-6, 2003.

RUGGIERO, C.; MARTINEZ Jr., M; GOTTARDI, M. V. C. e FILHO, G. C. N. Diferenciação floral. p. 55-65, 1994a. IN: RUGGIERO, C. et al. **Controle Integrado da Fusariose do abacaxizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 81p, 1994.

SANCHES, N.F.; et al., **O abacaxizeiro – cultivo, agroindústria e economia**. – Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999, p.105– 138.

SANDOVAL, J.; MÜLLER, L. Consideraciones sobre la conservación *in vitro* de musaceas: posibilidades y limitaciones. **Asbana**, Turrialba, v.13, n. 31, p. 21-24, 1989.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SANTOS, B. A.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. e VALE, F. X.; Sveridade de Isolados de *Fusarium Subglutinans* f SP. Sensíveis e Resistentes ao Benoyl, em Abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, vol.27 , nº 01 , Brasília, 2002.

SANTOS, M. D. M.; RIBEIRO, D. G.; TORRES, A. C.; Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.9, p. 1115-1120, 2008.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.9, p. 1035-1043, 2003.

SERRET M.D.; TRILLAS, M.I.; MATAS J.; ARAUS J.L. Development of photoautotrophic and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.45, p.1-16, 1996.

SERRET M.D.; TRILLAS M.I.; MATAS, J.; ARAUS, J.L. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimatization ex vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.47, p.217-230, 1997.

SHARMA, A.R. *In vitro* adventitious rooting of *Cornus florida* micro shoots. Short communication. **Scientia Horticulturae**, v.103, p.381-5, 2005.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1257-1260, 2008.

PORTELA, I. P.; COSTA, L. C. ; NASCIMENTO, D. C. ; VELEDA, F. B.; MOREIRA, R. M.; TONEL, F. R. **Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina (bap) na multiplicação *in vitro* de morangueiro (*fragaria x ananassa Duch*) cv. Oso grande**. XVII Congresso de Iniciação Científica UFPEL 2008

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; MOREIRA, M.A.; DUTRA, L.F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.6, p.1190-1196, nov./dez., 2002.

SONEJI, J.R.; RAO, P.S.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) **Plant Cell Reports**, v.20, p.891-894, 2002.

SOUZA, A.V. et al. Enraizamento *in vitro* de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.86- 91, 2004.

SOUZA, A.V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) MART**. 2003. 127p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. **Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 26f. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documento, 70).

TIBOLA, C. S.; FACHINELLO, J. C. Tendências e Estratégias de Mercado para a fruticultura. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.2, p.145-150, Abr.-Jun., 2004. Disponível em: < <http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v10n2/artigo01.pdf>>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2009.

VENGADESAN, G. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. **Plant Cell and Organ Culture**, v.61, p.23-8, 2000.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Propagação por biotecnologia: Micropropagação “*in vitro*” do abacaxizeiro. P. 43 - 50. IN: RUGGIERO, C. et al. **Controle Integrado da Fusariose do abacaxizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 81p, 1994

VIEIRA, R.L.; LEITE, G.B.; WAMSER, A.F. Efeito de Substratos Porosos no Enraizamento *in vitro* do Porta-Enxerto de Macieira M-9 (*Malus pumila*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 128-132, 2007.

WHITE, P.R. Vitamin B1 in the nutrition of excised tomato roots. **Plant Physiology**, v.12, p.803-811, 1937.

WITHERS, L. A. *In vitro* conservation. In: HAWKES, J. G. (Ed.). **Genetic conservation of world crop plants**. San Diego: Academic, 1991. p. 31-42.

ZEPEDA, C. e SEGAWA, Y. *in vitro* propagation of pineapple. **HortScience**, v. 16, n. 4, p. 495, 1981.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de Análise Estatísticas para Microcomputadores**. Pelotas: UFPel, 1984. 75 p.