

## COMUNICAÇÃO

### CULTIVO INICIAL *IN VITRO* DE GEMAS AXILARES DE *Ananas comosus* (L.) Merr., EM MEIO LÍQUIDO/SÓLIDO, NA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE LUZ

In initial *in vitro* culture of axillary buds of *Ananas comosus* (L.) Merr. in liquid/semi-solid culture medium, in the presence/absence of light

Sarah Brandão Santa Cruz Barboza<sup>1</sup>, João Batista Teixeira<sup>2</sup>,  
Tomás Aquino Portes<sup>3</sup>, Luiz Augusto Copati<sup>4</sup>, Ana da Silva Léo<sup>5</sup>

#### RESUMO

A capacidade regenerativa de gemas axilares de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* (L.) Merr.) foi avaliada em meio de cultivo líquido e gelificado, na presença e ausência de luz, com o objetivo de produzir material para subseqüentes fases da micropropagação. Os explantes foram estabelecidos, por 60 dias, em meio MS acrescido de 0,63 µM de ANA e 2,5 µM de BAP. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído com quatro tratamentos (meio líquido com e sem ponte de papel de filtro e meio gelificado com ágar a 6,0 g L<sup>-1</sup> e com Phytigel® a 3,0 g L<sup>-1</sup>), com quatro repetições e cinco explantes por repetição. Diferentes volumes de meio líquido (2,5 mL; 5,0 mL e 10,0 mL) também foram avaliados, usando-se quatro repetições por volume de meio de cultura. Maior número de brotos foi obtido na presença de luz, em meio líquido sem ponte de papel de filtro, onde 80% dos explantes se diferenciaram em brotos. Na ausência de luz, 68,8% a 87,5% dos explantes não regeneraram brotos. Explantes cultivados em volumes de 5,0 mL ou 2,5 mL de meio MS líquido, acrescido de 0,63 µM de ANA e 2,5 µM de BAP, na presença de luz, constitui um protocolo adequado para cultivo inicial de gemas axilares e regeneração de brotos de abacaxizeiro.

**Termos para indexação:** Abacaxizeiro, cultura *in vitro*, regeneração, *Ananas comosus*.

#### ABSTRACT

The regenerative capacity of buds from lateral sprouts of the pineapple cv. Pérola (*Ananas comosus* (L.) Merr.) was evaluated in liquid and semi-solid medium, under light and dark conditions, with the objective of producing materials for subsequent phase of micropropagation. The explants were established for 60 days in basal MS medium, supplemented with 0.63 µM NAA and 2.5 µM BAP. The statistical design was completely randomized with four treatments (liquid medium with and without filter paper bridge, and semi-solid medium gellified with agar and phytigel®), four repetitions and five explants per experimental unit. Different volumes of liquid medium (2.5 mL, 5.0 mL, and 10.0 mL) were also evaluated in four replications per treatment. More buds were obtained in liquid medium without filter paper bridge, where 80.0% of explants differentiated new shoots. In treatments cultivated in the dark, 68.8% to 87.5% of the explants did not regenerate new shoots. Explants cultivated in volumes of 2.5 mL and 5.0 mL of medium, in the presence of light, were more efficient in the induction and formation of shoots. The cultivation of axillary buds of lateral pineapple sprouts in 2.5 mL or 5.0 mL of MS liquid medium, supplemented with 0.63 µM NAA and 2.5 µM BAP, in the presence of light, represents an adequate protocol for establishing new pineapple shoots for use in subsequent phases of micropropagation.

**Index terms:** Pineapple, *in vitro* culture, regeneration, *Ananas comosus*.

(Recebido em 5 de junho de 2006 e aprovado em 25 de novembro de 2008)

A incorporação de novas tecnologias de produção representadas pelo uso de cultivares mais produtivas e resistentes à pragas, métodos eficientes e de baixo custo de propagação, entre outros, proporciona um ganho de produtividade e redução dos custos pelo efeito diluição, que é produzido pelo aumento da escala de produção. O custo de produção de mudas

micropropagadas de abacaxizeiro é considerado elevado, quando comparado ao de mudas convencionais (Escalona et al., 1999).

A disponibilidade de brotos ou plântulas, prontos para utilização na fase de multiplicação, é de grande importância, principalmente para empresas que trabalham com produção de mudas em larga escala.

<sup>1</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc, Departamento de Desenvolvimento Agropecuário-Emdagro – Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – batista@cenargen.embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc, Universidade Federal de Goiás/UFG – portes@icb.ufg.br

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, M.Sc – luizcopati@uol.com.br

<sup>5</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc, Embrapa Tabuleiros Costeiros – analedo@cpatc.embrapa.br

As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos como a fotossíntese, podem ser modificados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação do explante (Caldas et al., 1998).

Nos protocolos de estabelecimento publicados para abacaxizeiro, constata-se a predominância no uso do meio de cultivo gelificado, com ou sem adição de reguladores de crescimento. Entretanto, Mendes et al. (1999) e Almeida et al. (2002) utilizaram o meio de cultivo líquido apenas na fase de multiplicação e obtiveram, nesse meio, maior número de brotos/explante em relação ao meio gelificado. Sistemas de cultivo em meio de cultura líquido sob agitação, estacionário ou com ponte de papel de filtro, têm sido mais utilizados nessa fase da micropropagação. A utilização do meio líquido estacionário tem resultado em vitrificação das culturas, embora, alguns gelificantes também possam induzir ou ter influência na vitrificação. Essa anomalia, segundo Kevers & Gaspar (1986) é uma desordem fisiológica causada pela presença de grande quantidade de água residual nos espaços apoplásticos, deixando o tecido rígido e quebradiço.

Na fase de estabelecimento de gemas axilares de abacaxizeiro, o ANA (ácido naftaleno acético) é a auxina mais utilizada, seguida do AIA (ácido indol acético) e do IBA (ácido indol butírico). O BAP (benzilaminopurina) é a citocinina citada na maioria dos trabalhos nas fases de estabelecimento de gemas e também nos protocolos para multiplicação do abacaxizeiro (Almeida et al., 2002; Barroso et al., 2003; Barboza et al., 2004; Costa et al., 2007).

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de avaliar o cultivo inicial *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro cv. Pérola, em meio líquido e gelificado, na presença ou ausência de luz.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF. Os explantes utilizados foram gemas axilares acompanhadas de pequena porção de tecido com tamanho médio de 6 mm x 4 mm retiradas de mudas do tipo filhote de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Pérola), com peso variando de 370 a 390 gramas. A pré-limpeza das mudas consistiu da retirada de um segmento da base e também das folhas, deixando apenas a haste caulinar com as gemas expostas. As hastes foram imersas em álcool 50% durante um minuto, fora da câmara de fluxo laminar. Em condições assépticas, efetuou-se uma segunda imersão em álcool 50% por um minuto, seguindo-se a imersão em hipoclorito de sódio 1% por dez minutos. Logo após, efetuaram três lavagens em água destilada estéril, por dez minutos cada.

O potencial regenerativo dos explantes foi avaliado na presença e ausência de luz, utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (meio gelificado com ágar, meio gelificado com Phytigel®, meio líquido com ponte de papel de filtro e meio líquido sem ponte de papel de filtro), com quatro repetições e cinco explantes por repetição, para cada ambiente de cultivo. Na ausência de luz, os explantes foram cultivados em tubos de ensaio de 125 mm x 25 mm, contendo 10,0 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 0,63 µM de ANA e 2,5 µM de BAP, envoltos em papel alumínio. Para crescimento na presença de luz, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de 30 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas.

Em função dos resultados obtidos nessa primeira fase, o potencial regenerativo de gemas axilares de abacaxizeiro foi avaliado em diferentes volumes de meio MS líquido, sendo os explantes inoculados diretamente no meio de cultura e mantidos na presença de luz. Utilizaram-se três tratamentos (2,5 mL; 5,0 mL e 10,0 mL), em quatro repetições e 16 plantas por tratamento. Em todos os tratamentos, dois meses após início do cultivo, procedeu-se à avaliação e o subcultivo de todo o material para meio MS gelificado com 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, mantendo-se as mesmas concentrações de fitoreguladores.

As variáveis avaliadas foram a percentagem de contaminação, percentagem de explantes viáveis (explantes apresentando aumento de tamanho e com desenvolvimento de parte aérea), percentagem de explantes inviáveis (oxidados e/ou apenas intumescidos), altura dos brotos e número de folhas por broto. Os percentuais de explantes viáveis e inviáveis foram calculados com base no total de explantes sem contaminação.

A análise estatística foi realizada usando o procedimento ANOVA do programa SAS (SAS Institute, 1989), usando o teste de Duncan, a 0,5% de probabilidade. Os dados expressos em percentagem foram transformados por meio da equação do arc seno  $\sqrt{\%100}$ , de acordo com Snedecor & Cochran (1989).

As gemas axilares de mudas de abacaxizeiro, cv Pérola, apresentaram variação quanto ao potencial de diferenciação em brotos, quando cultivadas *in vitro*, tanto em relação à natureza física do meio, quanto em relação à presença e ausência de luz (Tabelas 1 e 2). Os tratamentos conduzidos em ausência de luz exibiam baixo percentual de brotos regenerados, menor altura e menor número de folhas por broto, quando comparados àqueles conduzidos na presença de luz (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos do meio MS líquido e gelificado, no estabelecimento inicial *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro, aos 60 dias de cultivo, na presença e ausência de luz. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 2007.

Presença de luz				
Tratamentos	EB (%)	AB (cm)	NF	Ei (%)
Meio líquido s/ ponte de papel de filtro	80,0 a	1,26 a	5,0 a	20,0 c
Meio líquido c/ ponte de papel de filtro	55,0 b	1,26 a	4,6 a	45,0 b
Meio gelificado c/ Ágar	55,0 b	0,66 b	3,5 ab	45,0 b
Meio gelificado c/ Phytigel®	33,7 c	0,57 b	1,7 b	66,3 a
CV (%)	34,9	35,6	32,0	29,0
Ausência de luz				
Meio líquido s/ ponte de papel de filtro	31,3 A	0,67 AB	2,0 A	68,8 B
Meio líquido c/ ponte de papel de filtro	30,0 A	0,70 AB	1,7 A	70,0 B
Meio gelificado c/ Ágar	12,5 B	0,55 B	1,5 A	87,5 A
Meio gelificado c/ Phytigel®	25,0 AB	0,97 A	2,0 A	75,0 B
CV (%)	30,7	37,0	21,9	34,5

Em cada ambiente de cultivo, médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). EB = explantes que formaram brotos; AB = altura do broto; NF = número de folhas; Ei = explantes inviáveis

Comparando-se o número de brotos formados em condições de claro e escuro (Tabela 2), verificou-se que, na fase inicial de cultivo, a luz teve influência significativa no potencial de diferenciação dos explantes, independente do fato de, ainda nas mudas, as gemas axilares não estarem expostas à luz. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) explantes obtidos de plantas matrizes que não estão expostas à luz, quando submetidos a um período no escuro, no início da cultura *in vitro*, podem ter o estresse dos explantes evitado nessa fase de cultivo. Além disso, a ausência total de luz ou intensidades de luz reduzidas é favorável nos primeiros dias de cultivo, após o isolamento dos explantes, para reduzir a oxidação fenólica (Franclet & Boulay, 1982).

O meio de cultura líquido proporcionou melhores resultados para regeneração de brotos e a redução do volume de meio de 10,0 mL para 5,0 mL e 2,5 mL mostrou efeitos positivos como rápida diferenciação e crescimento vigoroso dos brotos (Tabela 3), mantendo esta característica no cultivo subsequente em meio gelificado. Os brotos regenerados em 2,5 mL de meio MS apresentavam altura duas vezes maiores em relação àqueles de explantes cultivados em meio contendo gelificantes (Tabelas 3 e 2, respectivamente).

Ao avaliar o potencial regenerativo de gemas axilares de abacaxizeiro, cultivares Perolera e Primavera, Guerra et al. (1999) observaram a existência de diferenças genotípicas na resposta à indução morfogenética *in vitro*. A interação genótipos versus natureza física dos meios

foi demonstrada para a cultivar Perolera, que, em meio líquido, apresentou taxa de regeneração 37% superior àquela em meio de cultivo gelificado (Mendes et al., 1999). Para a cultivar Primavera a taxa regenerativa em meio líquido foi 17,1% superior em relação ao meio gelificado. Esses autores usaram concentrações de 2,7  $\mu\text{M}$  e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA, combinadas com diferentes concentrações de BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ; 8,9  $\mu\text{M}$  e 13,3  $\mu\text{M}$ ), em meio líquido e gelificado. A taxa de regeneração para meio líquido foi 30,5% superior em relação à observada em meio gelificado.

O uso do meio líquido durante a fase de multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro cv. Pérola aumentou a produção de gemas adventícias em relação ao meio gelificado com ágar (Almeida et al., 2002). Esses autores obtiveram, no período de 150 dias de cultivo, 554,2 e 128,7 brotos por explante em meio líquido e gelificado, respectivamente.

Rangan (1984) sugeriu a utilização de um protocolo regenerativo geral para cultivo *in vitro* de abacaxizeiro, baseado na formação de brotações a partir de gemas axilares laterais, em meio de cultura MS líquido acrescido de 9,7  $\mu\text{M}$  de ANA; 9,8  $\mu\text{M}$  de AIB e 9,8  $\mu\text{M}$  de cinetina. Observa-se que as concentrações de fitoreguladores utilizadas por esse autor são bem mais altas que as utilizadas no presente trabalho (0,63  $\mu\text{M}$  de ANA e 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP) onde o objetivo não é a obtenção de um protocolo único para as fases de estabelecimento de gemas e multiplicação de brotos, envolvendo várias repicagens.

Tabela 2 – Efeito da presença e ausência de luz no estabelecimento inicial *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro cv. Pérola, após 60 dias de cultivo. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 2007.

Condições de luz	EB (%)	AB (cm)	NF	Ei (%)
Presença	55,9 a	0,94 a	3,7 a	44,1 b
Ausência	24,7 b	0,71 a	2,0 b	75,3 a
CV (%)	34,5	25,2	24,9	21,9

Para cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

EB = explantes que formaram brotos; AB = altura do broto; NF = número de folhas; Ei = explantes inviáveis

Tabela 3 – Efeitos de diferentes volumes de meio líquido no estabelecimento de gemas axilares de abacaxizeiro, cv. Pérola, após 60 dias de cultivo na presença de luz. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, 2007.

Tratamentos	EB (%)	AB (cm)	NF	Ei (%)
10,0 mL	80,00 a	1,26 a	5,04 b	20,00 a
5,0 mL	90,00 a	1,41 a	5,70 ab	10,00 b
2,5 mL	85,00 a	1,52 a	6,98 a	15,00 ab
CV (%)	22,0	25,3	24,9	36,5

Para cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

EB = explantes que formaram brotos; AB = altura do broto; NF = número de folhas; Ei = explantes inviáveis

Conclui-se que gemas axilares de abacaxizeiro cv. Pérola expressam maior potencial regenerativo *in vitro* quando estabelecidas em meio MS líquido, na presença de luz e que o seu cultivo inicial em volumes de 2,5 mL ou 5,0 mL de meio MS líquido, acrescido de 0,63  $\mu$ M ANA e 2,5  $\mu$ M de BAP, na presença de luz, constitui um protocolo eficiente para estabelecimento dessas gemas e regeneração de brotos e plantas para utilização em fases subsequentes de um sistema de micropropagação.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W.A.B. de; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.A.P. de C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.296-300, ago. 2002.

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

BARROSO, P.A.V.; MOURA, G.E.D.D.; BRITTO, L.K.; MARTINS, C.P.; MACEDO, C.E.C.; LOPES, D.B.; ALLOUFA, M.A.I. Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.7, n.3, p.473-477, 2003.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.38-70.

COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. de; PEREIRA, J. E. S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 41-46, jan./fev., 2007.

ESCALONA, M.; LORENZO, J.C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZALEZ, J.L.; DESJARDINS, Y. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, Berlin, n.18, p.743-748, 1999.

FLANCLET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant *Eucalyptus* clones. **Australian Forest Research**, Queen Victoria, v.13, p.83-89, 1982.

GUERRA, M.P.; DALVESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.183-260.
- KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume and ions levels. **Physiologie Vegetale**, Paris, v.6, n.24, p.647-653, 1986.
- 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, 1999.
- 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.
- RANGAN, T.S. Pineapple. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. v.3, p.373-382.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT<sup>®</sup> user's guide**. 4.ed. North Carolina, 1989. v.2, 846p.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Iowa: Iowa State, 1989. 125p.