

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SERGIO FEUSER**

**MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIRO (*Ananas comosus*) E  
AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENOTÍPICA POR  
MARCADORES MOLECULARES.**

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre, junto ao Curso de Biotecnologia - Área de Concentração Agrícola e Florestal, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Co-Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis

2000.

**"APLICAÇÕES DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS  
NO MELHORAMENTO DO ABACAXIZEIRO"**

**POR**

**SERGIO FEUSER**

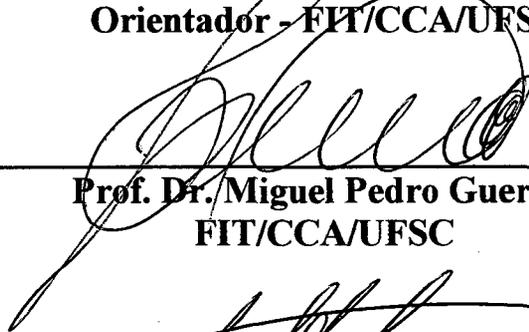
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



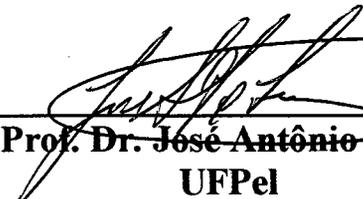
---

**Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari  
Orientador - FIT/CCA/UFSC**



---

**Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
FIT/CCA/UFSC**



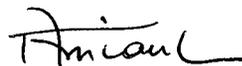
---

**Prof. Dr. José Antônio Peters  
UFPel**



---

**Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva  
FIT/CCA/UFSC**



---

**Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

**Florianópolis, março de 2000**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari e ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela orientação e por terem proporcionado todos os meios para o desenvolvimento deste trabalho, além do incentivo pessoal durante todo o curso.

À minha amiga Desirée pelo apoio e incentivo antes e durante a realização deste curso.

Aos amigos e colegas do laboratório que estiveram presentes durante todas as fases da elaboração deste trabalho e que de alguma forma contribuíram para as atividades realizadas, em especial a Luísa e a Denise que foram responsáveis por disponibilizarem de forma eficiente reagentes e vidrarias utilizadas, a Kelen que colaborou em parte das atividades laboratoriais, a Glaise que esteve presente todo o curso nas aulas e no laboratório compartilhando informações e opiniões, e a Ana Carla que dispôs do seu tempo revisando e opinando sobre este trabalho.

## ÍNDICE GERAL

ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
1. INTRODUÇÃO	1
3. OBJETIVO GERAL	3
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. ORIGEM E DESCRIÇÃO BOTÂNICA DO ABACAXIZEIRO	4
4.2. MORFOLOGIA FLORAL	5
4.3. MICROPROPAGAÇÃO	6
4.4. VARIAÇÃO SOMACLONAL	8
4.5. MARCADORES MOLECULARES	10
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1. MATERIAL	13
5.2. PROTOCOLO REGENERATIVO	13
5.3. MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL	14
5.4. IMERSÃO TEMPORÁRIA	14
5.5. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	16
5.5.1. INDUÇÃO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	16
5.5.2. MATURAÇÃO DE EMBRIÕES	17
5.6. AVALIAÇÃO DE FIDELIDADE GENOTÍPICA DAS MUDAS MICROPROPAGADAS	17
5.6.1. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	17
5.6.2. RAPDs	18
5.7-ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6.1. MICROPROPAGAÇÃO	21
6.1.1. MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL	21
6.1.2. MICROPROPAGAÇÃO POR IMERSÃO TEMPORÁRIA	22
6.1.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO	24
6.2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	26
6.2.1. INDUÇÃO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	26
6.2.2- INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AUXINAS NA INDUÇÃO A FORMAÇÃO DE CALO	29
6.2.3. INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	32
6.2.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS CALOS.	37
6.3. DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS	39

6.4. AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENOTÍPICA	40
6.4.1. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES VIA ISOENZIMAS	40
6.4.2. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES VIA RAPDs	44
7. CONCLUSÕES	48
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	50
9. BIBLIOGRAFIA	52
10. ANEXOS	58

## RESUMO

A cultura do abacaxizeiro já foi de grande importância no litoral catarinense. A principal causa do declínio desta cultura deve-se a ocorrência da moléstia fúngica causadora da fusariose. O uso da micropropagação nesta espécie possibilita a produção de mudas livres de patógenos, em grande quantidade, com rapidez e eficiência. No presente trabalho, foram avaliados dois sistemas de micropropagação: convencional e imersão temporária. No primeiro, foram testados três níveis de PBZ (0  $\mu\text{M}$ , 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ ) e, no sistema de imersão temporária, testou-se também dois níveis de AG<sub>3</sub> (0  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$ ), em meio de cultura basal MS (Murashige e Skoog, 1962). Gemas laterais da porção mediana do talo de plantas matrizes adultas do acesso 7NV (var. Amarelinho) compuseram os explantes originais. A imersão temporária resultou na maior taxa de multiplicação de brotos comparativamente ao sistema convencional. O PBZ mostrou-se eficiente em promover aumento da taxa de multiplicação de brotos no sistema de imersão temporária, porém não o foi para o sistema convencional. A presença ou ausência de AG<sub>3</sub> não influenciou na taxa de multiplicação de brotos total no sistema de micropropagação por imersão temporária, entretanto, para a classe de brotos maiores que 1 cm a presença de AG<sub>3</sub> no meio de cultura resultou em um número de brotos significativamente maior. Outra técnica de micropropagação estudada foi a embriogênese somática. Avaliou-se a indução da morfogênese a partir de folhas jovens de abacaxizeiro dos acessos 9CAS e 8NV (var. Pérola) inoculadas em meio de MS sólido. Foram testados diferentes níveis de quatro compostos com atividade auxínica (dicamba, picloram, 2,4-D e 2,4,5-T), com a presença ou ausência de cinetina. Os fitorreguladores dicamba e picloram foram significativamente mais eficientes na indução de calos do que o 2,4-D. Em outro experimento, dicamba, picloram e 2,4,5-T não diferiram entre si na percentagem média de indução de calos. Níveis de 5,0  $\mu\text{M}$  e 10,0  $\mu\text{M}$  de dicamba, picloram e 2,4,5-T resultaram em valores médios de indução de calos estatisticamente superiores aos resultados obtidos com os tratamentos isentos destes fitorreguladores. O acesso 9CAS apresentou maior percentagem média de proliferação de calos que o 8NV para todos os fitorreguladores e em todas as concentrações. Calos de abacaxizeiro obtidos nos experimentos anteriores de indução à embriogênese somática foram submetidos diferentes tratamentos para maturação (2iP 24,6  $\mu\text{M}$  + ANA 5,0  $\mu\text{M}$ ; Mioinositol 100 mg/L; ABA 30,0  $\mu\text{M}$ ; ABA 60,0  $\mu\text{M}$ ; PEG 7,5%), mas não houve resposta em nenhum dos tratamentos. A fidelidade genotípica das plantas micropropagadas nos sistemas convencional e imersão temporária foi avaliada por dois tipos de marcadores moleculares (isoenzimas e RAPD). A análise isoenzimática detectou 0,67% de plantas variantes para o ambos os sistemas de micropropagação. A avaliação da fidelidade genotípica via RAPDs detectou 7,5% de plantas variantes para o sistema convencional e 5,0% de plantas variantes para o sistema de imersão temporária, entretanto, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os sistemas de micropropagação. No sistema de micropropagação convencional, no tratamento PBZ 0  $\mu\text{M}$  foi detectada a maior ocorrência de variantes (8,5%), diferindo do tratamento PBZ 6,0  $\mu\text{M}$  (7,9% de variantes), e ambos diferindo também do tratamento PBZ 3,0  $\mu\text{M}$  (6,0% de variantes). No sistema de micropropagação por imersão temporária, no tratamento PBZ 6,0  $\mu\text{M}$  foi detectada a maior ocorrência de plantas variantes (8,9%), diferindo estatisticamente dos tratamentos PBZ 0  $\mu\text{M}$  e PBZ 3,0  $\mu\text{M}$  (4,0 e 2,8% de variantes, respectivamente).

**Palavras-chave:** Abacaxizeiro, micropropagação, imersão temporária, variação somaclonal, isoenzimas, RAPDs.

## ABSTRACT

The pineapple crop was of great importance in the coastal region of Santa Catarina up to the 80's. The incidence of a fungal disease called fusariosis drastically reduced the cultivated area. Micropropagation techniques are valuable tools providing the rapid mass clonal production of plants free of pathogens in controlled conditions. In the present work two micropropagation systems were evaluated: the conventional and the temporary immersion. Lateral buds excised from mother plants from the accession 7NV (cv. Amarelinho) were inoculated in basal MS culture medium supplemented with PBZ (0, 3.0 and 6.0  $\mu\text{M}$ ) in the two systems. The same basal medium supplemented with GA<sub>3</sub> (0 and 2  $\mu\text{M}$ ) was assayed in the temporary immersion system. It was showed that the temporary immersion system resulted in greater rate of shoot multiplication than the conventional system. The presence of PBZ (6.0  $\mu\text{M}$ ) in the culture medium increased the shoot multiplication rate in the temporary immersion system. However, when compared to the conventional system, no significant statistical difference was observed. The presence or absence of GA<sub>3</sub> did not influence the shoot multiplication rate in the temporary immersion system. However, for shoots higher than 1 cm in the presence of GA<sub>3</sub> the multiplication rate was significantly superior. As indirect morphogenesis indicator the callus induction was evaluated in young leaves from two accession, 9CAS and 8NV (cv. Pérola), inoculated in Petri dishes containing solid MS culture media. Different levels of dicamba, picloram, 2,4-D, and 2,4,5-T were tested in the presence or absence of kinetin. Dicamba and picloram were significantly more efficient than 2,4-D in the callus proliferation. In another experiment, dicamba, picloram and 2,4,5-T didn't differ in the percentage of callus proliferation. Treatments with dicamba, picloram and 2,4,5-T (5.0  $\mu\text{M}$  and 10.0  $\mu\text{M}$ ) resulted in higher values of callus proliferation as compared with the results obtained with the culture medium free of growth regulators. The accession 9CAS showed higher values for callus proliferation as compared with the accession 8NV. Cultures obtained in these experiments were subcultured to culture medium supplemented with 2iP (24.6  $\mu\text{M}$ ) plus NAA (5.0  $\mu\text{M}$ ); mioinositol (100 mg/l); ABA (30.0  $\mu\text{M}$  and 60.0  $\mu\text{M}$ ), and PEG (7.5%). No progression and maturation of embryogenic callus was observed. The genotypic fidelity of the micropropagated plantlets was evaluated by molecular markers isozymes and RAPDs. The isozyme analysis detected 0.67% of variant plants for both the micropropagation systems. The evaluation of the genotypic fidelity through RAPDs detected 7.5% of variant plants for the conventional micropropagation system and 5.0% for the temporary immersion system. It was not detected significant statistical differences among the micropropagation systems. For the conventional system, in the control treatment (PBZ, 0  $\mu\text{M}$ ) the greatest occurrence of variants was detected (8.5%), differing of the results observed in the treatment with PBZ 6.0 mM (7.9% of variants). Both treatments differed of the results observed in the treatment with PBZ (3.0  $\mu\text{M}$ ) (6.0% of variants). In the temporary immersion system, the treatment with PBZ 6.0  $\mu\text{M}$  showed the greatest occurrence of variants (8.9%). These results show statistical differences from those observed as results of the treatments PBZ 0 and 3.0  $\mu\text{M}$  (4.0 and 2.8% of variants, respectively).

**Key words:** Pineapple, micropropagation, temporary immersion, somaclonal variation, isozymes, RAPDs.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2,4,5-T (ácido 2,4,5 – triclorofenoxiacético);
- AG<sub>3</sub> (ácido giberélico);
- 2,4-D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético);
- AIB (ácido indolbutírico);
- ANA (ácido  $\alpha$ -naftaleno acético);
- BAP (6-benzilaminopurina);
- CCA (Centro de Ciências Agrárias);
- CIN (cinetina);
- cv. (cultivar);
- Dicamba (ácido 3,6 dicloro-o-anísico);
- LFDGV (Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal);
- PBZ (paclobutrazol);
- Picloram (ácido 4-amino 3,5,6-tricloro picolínico);
- SNK (teste Newman-Keuls);
- UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina);
- var. (variedade).

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto produtor mundial de abacaxi (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 1995) e este aspecto decorre mais da grande área plantada do que do rendimento por unidade de área. Estes baixos rendimentos, devem-se às técnicas inadequadas de cultivo e principalmente à incidência de pragas e doenças (Couto et al., 1984).

A cultura do abacaxizeiro já foi de grande importância no litoral catarinense. Estima-se que a área plantada chegou a 1.500 ha no início da década de 70, ocorrendo em seguida uma forte redução do cultivo desta frutífera, redução esta provocada pela ocorrência da gomose (ou fusariose), doença fúngica causada pelo fungo *Fusarium moniliforme* Shield Var. *subglutinans* WR (Koller, 1981). A principal forma de disseminação desta moléstia se dá por meio de mudas contaminadas. Nos últimos 30 anos o emprego de mudas contaminadas atingiu a maioria das plantações no sul do Estado de Santa Catarina. Como consequência, o cultivo desta espécie se tornou antieconômico, o que explica o declínio da área cultivada neste Estado (Koller, 1981). A cultura do abacaxizeiro já apresentou grande importância econômica no litoral do Estado de Santa Catarina, representando significativa fonte de renda para pequenos agricultores.

Na região litorânea do Estado de Santa Catarina, existe um grande potencial para a produção de abacaxi, como têm demonstrado os produtores que já se dedicam a esta cultura. Esta atividade se constitui numa ótima alternativa econômica para os agricultores do litoral catarinense. Na densidade de 40.000 plantas/ha é possível a obtenção de uma renda bruta de R\$ 30.000,00. A rentabilidade da cultura do abacaxizeiro é superior a rentabilidade da maioria das culturas agrícolas desenvolvidas no Estado, o que pode se converter em uma opção para a melhoria do nível de vida dos agricultores. A produção de abacaxi no estado é muito inferior ao consumo, o que significa que apenas a demanda do mercado do sul do Brasil seria suficiente para absorver a produção. Além disto, deve-se considerar as vantagens comparativas da região produtora de SC para o mercado de exportação do MERCOSUL. Para reverter esta situação há a necessidade de se usar mudas livres do agente causador desta doença. E isto pode ser obtido de duas maneiras. A primeira seria o uso da micropropagação de mudas livres da doença. A segunda seria o desenvolvimento de variedades resistentes a fusariose. Dentro deste contexto, existe a oportunidade do emprego de técnicas biotecnológicas tanto no processo regenerativo quanto no melhoramento genético visando a obtenção de mudas de alta qualidade.

O presente trabalho envolve a utilização de três tecnologias complementares no sentido da melhoria genética e da produção de mudas. A primeira delas trata da utilização do sistema de imersão temporária no protocolo de micropropagação atualmente utilizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC. Neste caso espera-se aumentar a eficiência na produção de mudas livres do patógeno pelo aumento da taxa de multiplicação *in vitro*.

Além de eficiente, um protocolo de propagação clonal massal deve manter a fidelidade genotípica do explante. Contudo, os processos que ocorrem durante a regeneração *in vitro* podem causar diferentes tipos de mutações.

No sentido de avaliar parcialmente a presença de mudas mutantes oriundas de protocolos de micropropagação, o uso de marcadores moleculares se constitui na ferramenta adequada. Os marcadores moleculares (isoenzimas e RAPDs) podem ser empregados para confirmar a natureza genética dos possíveis variantes e identificar os padrões genéticos dos diferentes acessos coletados. Os marcadores moleculares poderão ainda ser utilizados em programas de melhoramento tanto para identificar genótipos resistentes quanto para acelerar a introgressão de outros genes de importância agrícola. Além disso, a possibilidade do desenvolvimento de um processo de seleção *in vitro* de genótipos resistentes a fusariose com auxílio de marcadores ligados aos genes de resistência, poderá permitir a identificação de segregantes num curto espaço de tempo, resultando em economia de espaço e mão-de-obra num programa de melhoramento e produção de mudas.

Os resultados deste trabalho poderão trazer implicações no programas de melhoramento e produção de mudas de abacaxizeiro, que devem ter como característica principal a possibilidade de multiplicação rápida e em grande escala de plantas genotipicamente superiores com alta sanidade e fidelidade varietal.

Como beneficiários finais deste trabalho estão os agricultores, em especial os do litoral catarinense que poderão contar com o fornecimento de mudas de abacaxizeiro de alta qualidade, o que atualmente se constitui no principal obstáculo à obtenção de rentabilidade no cultivo de abacaxizeiro.

### 3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal a aplicação de técnicas biotecnológicas como ferramentas auxiliares em um programa de melhoramento genético e de propagação clonal massal de clones superiores selecionados de abacaxizeiro.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adequar a técnica de imersão temporária e de embriogênese somática, visando aumentar a eficiência do protocolo regenerativo *in vitro* do abacaxizeiro.
- Comparar a eficiência do sistema regenerativo convencional e de imersão temporária.
- Estudar a influência de substâncias com ação auxínica forte na morfogênese *in vitro* de explantes foliares.
- Avaliar a fidelidade genotípica das mudas micropropagadas *in vitro* através do uso dos marcadores moleculares isoenzimas e RAPDs.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão aborda os aspectos botânicos e a importância do abacaxizeiro, bem como aqueles relacionados às técnicas biotecnológicas utilizadas neste trabalho.

### 4.1. ORIGEM E DESCRIÇÃO BOTÂNICA DO ABACAXIZEIRO

*Ananas* é um dos 53 gêneros da família *Bromeliaceae*. Com uma única exceção, a *Pitcairnia feliciana* (Ang. Chev.) Harms e Mildbr, que é nativa da Guiné, as mais de 2000 espécies são originárias das Américas. Estas espécies ocorrem em uma diversidade de habitats, desde as regiões tropicais quentes e úmidas até as áreas subtropicais frias e secas, formando uma grande área desde o centro dos Estados Unidos até o norte da Argentina e Chile (Smith, 1934).

O abacaxizeiro pertence a subfamília *Bromelioideae*. *Ananas*, *Pseudoananas* e *Acanthostachys* são os gêneros da família cujas flores são fundidas e desenvolvem uma infrutescência. No gênero *Ananas*, somente *A. comosus* produz fruto grande e um pedúnculo de curto a grande. Frutos e pedúnculos de *A. bracteatus* e *A. fritzmuelleri* são de tamanho médio. Todas as outras espécies têm frutos pequenos e pedúnculos longos (Leal e Coppens d'Eeckenbrugge, 1996). As principais espécies e suas denominações comuns encontram-se citadas na Tabela 1

Tabela 1. Espécies do gênero *Ananas* e *Pseudananas*

Nome científico	Nome comum
<i>Pseudananas saganarius</i> (Arruda de Camara) Camargo	Gravatá de cerca, gravatá de rede, yvira
<i>Ananas ananassoides</i> (Baker) L. B. Smith	Ananas de ramosa, curibijul, maya piñón, nanaí, piñuela
<i>Ananas nanus</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	Ananaí
<i>Ananas paraguayensis</i> Camargo e L.B. Smith	<b>Gravatá, piña montañera</b>
<i>Ananas lucidus</i> Miller	Curagua, curaná, curauá, kulaiwat
<i>Ananas bracteatus</i> (Lindley) Schules f.	Ananas bravo, ananá do mato
<i>Ananas fritzmuelleri</i> Camargo	Ananas silvestre, gravatá de cerca
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill	Abacaxi, ananá, piña

Adaptado de Leal e Coppens d'Eeckenbrugge (1996)

Em termos comerciais, o gênero *Ananas* é o mais importante na família Bromeliaceae, devido a grande demanda dos seus frutos para consumo humano, tanto fresco como industrializado (Leal, 1989). Todas as espécies deste gênero já estudadas compartilham o mesmo número cromossômico ( $2n=50$ ), a mesma morfologia floral e o mesmo sistema de reprodução. A multiplicação vegetativa é dominante sobre a reprodução sexual, com a fertilidade sexual baixa, particularmente na maioria dos tipos cultivados, provavelmente em decorrência da alogamia ser controlada por um sistema de auto-incompatibilidade. Não existe nenhuma barreira ou diferença reprodutiva entre as espécies, de maneira que todos os recursos genéticos favoráveis podem ser usados para o melhoramento (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 1995). Entretanto, as relações filogenéticas do gênero *Ananas* necessita uma revisão, pois existem espécies de classificação duvidosa, como *A. monstrosus* (Leal, 1989).

Bertoni (1919), Baker e Collins (1939) e Collins (1960) propuseram o centro e sudeste do Brasil, nordeste da Argentina e Paraguai (uma área localizada entre 15 a 30° S de latitude e 40 a 60° W de longitude) como o centro de origem do gênero *Ananas*. Contudo, a domesticação do abacaxizeiro ainda não é totalmente conhecida. Segundo Bertoni (1919), teria sido feita pelos índios Tupi-Guarani a partir de *A. guaraniticus* (uma espécie sinônimo cuja descrição corresponde a um clone de *A. ananassoides*). Os tipos domesticados, então acompanharam suas migrações para as Antilhas, norte dos Andes e América Central. Entretanto, para Sauer (1993), *A. bracteatus* e *A. fritzmuelleri* são os mais prováveis progenitores selvagens de *A. comosus*, devido a seus frutos serem comestíveis. A domesticação teria resultado na seleção de genótipos partenocárpicos sem sementes.

#### 4.2.MORFOLOGIA FLORAL

A estrutura floral é constante entre as espécies do gênero *Ananas*. A variação observada é quantitativa e se refere ao tamanho da inflorescência e das partes florais (brácteas, pétalas, anteras, estilete) e ao número de óvulos. Estes parâmetros contribuem para a caracterização das diferentes variedades ou espécies (Duval e Coppens d'Eeckenbrugge, 1993) mas não permitem defini-las de forma inequívoca.

O sistema de reprodução dos *Ananas* pode ser definido pela coexistência de um sistema de reprodução sexual com alogamia funcional e de um sistema de propagação vegetativa dominante e muito eficiente, graças ao vigor e a resistência dos brotos de qualquer tipo (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 1995).

### 4.3. MICROPROPAGAÇÃO

A cultura de tecidos do abacaxizeiro tem sido objeto de estudo e aplicações em vários laboratórios em diversos países. Inicialmente, a técnica foi descrita por Aghion e Beauchesne (1960), que regeneraram plantas a partir de segmentos de coroa. Mais tarde Lakshmi Sita et al. (1974) obtiveram um broto por gema a partir das gemas apicais da coroa. Mathews e Rangan (1979) relataram a formação de gemas múltiplas a partir de gemas laterais. Posteriormente, Drew (1980) estabeleceu um protocolo regenerativo baseado em quatro estágios, possibilitando a produção de 100.000 plantas em menos de 12 meses, partindo de uma única gema lateral.

Entretanto, o primeiro protocolo de regeneração de gemas múltiplas a partir de gemas laterais foi descrito por Rangan (1984). Este autor utilizou meio MS (Murashige e Skoog, 1962), líquido e sob agitação, suplementado com ANA, AIB e CIN. Cabral et al. (1984) micropropagaram a Cv. "Smooth Cayenne" também em meio MS líquido acrescido de ANA, AIB e BAP.

Um novo método baseado no cultivo *in vitro* de brotos estiolados em meio de cultura MS sólido, adicionado de ANA foi proposto por Kiss et al. (1995). A segmentação das brotações e sua transferência para a luz em meio N6 (Chu, 1981) sólido acrescido de CIN, resultou na proliferação de brotações múltiplas. Vaz e Negueroles (1981), obtiveram mais de cinco mil plantas de abacaxizeiro a partir de um único explante, num prazo de doze meses. Segundo as estimativas de Pannetier e Lanaud (1976), dois anos apenas seriam suficientes para a produção de dois milhões de plantas de abacaxizeiro a partir de uma única gema, o que demonstra a eficiência do cultivo *in vitro* como método rápido de multiplicação massal.

A formação de gemas múltiplas e enraizamento em meio líquido, contendo macro e micronutrientes de MS (Murashige e Skoog, 1962), com variações nos níveis dos fitorreguladores ANA, AIB e BAP foi obtida por Cabral et al. (1984) com a cultivar "Smooth Cayenne". Por sua vez, Daquinta et al. (1994) utilizaram, para a formação de calos em abacaxizeiro, dicamba, em concentrações que variaram de 0,5 a 5,0 mg/l, obtendo êxito em todas as concentrações.

Melhorias no protocolo regenerativo *in vitro* desta cultura vem sendo implementadas e avaliadas pelo LFDGV, o que já foi alcançado para as cultivares Perolera e Primavera, com a adição de ANA e BAP ao meio MS líquido (Schulter et al., 1991) e otimizações do protocolo para a cv. Amarelinho por Pescador et al. (1994) e Guerra et al. (1999). Dal Vesco et al. (2000a)

obtiveram gemas múltiplas em meio de cultura MS contendo ANA (2  $\mu\text{M}$ ) e BAP (4  $\mu\text{M}$ ), a partir de 45 dias do isolamento. Aos 45 após a terceira repicagem observou-se, em média, para as cultivares Pérola, 10,2 brotos/gema; Amarelinho, 13,3 brotos/gema; Smooth Cayenne, 6,4 brotos/gema e Perolera, 9,3 brotos/gema.

A formação de calos de abacaxizeiro a partir de folhas jovens em concentrações que variaram de 0,5 a 5,0 mg/L de dicamba também já foi verificada experimentalmente (Daquinta, 1997), sendo que para este experimento, a dosagem de 5,0 mg/L de picloram mostrou-se mais eficiente. Escalona et al. (1997) relataram o estabelecimento da embriogênese somática como via de regeneração de abacaxizeiro na var. Cayena Lisa Serrana. Neste caso, a melhor combinação hormonal foi 2,2  $\mu\text{M}$  de dicamba e 2,2  $\mu\text{M}$  de cinetina e o cultivo em imersão temporária foi a melhor resposta quanto a capacidade morfogenética dos calos.

O coeficiente de multiplicação de mudas de abacaxizeiro aumentou com a utilização de biorreatores baseados na técnica de imersão temporária, em comparação com a micropropagação convencional (Escalona et al., 1997), sendo que a percentagem de plantas competentes para a adaptação foi de 78,9 e a sobrevivência de 63,6. O sistema de imersão temporária descrito por Alvard et al. (1993), promoveu uma redução considerável nos custos de produção em comparação com a micropropagação convencional (entende-se por sistema de micropropagação convencional o cultivo *in vitro* sem o uso de imersão temporária).

O sistema de imersão temporária é um aparato no qual os explantes são imersos no meio de cultura em intervalos regulares. Nesta técnica há a circulação de meio de cultura e ar no ambiente onde estão os explantes, proporcionando todas as vantagens de um meio de cultura líquido sem alguns de seus problemas, como asfixia e vitrificação. Este sistema promove ainda a nutrição adequada e troca de gases. A eficiência do sistema de imersão temporária tem sido comprovada também para embriogênese somática (banana, seringueira, café, citrus) e microestacas Além disso, a morfogênese pode ser controlada pela modificação das condições de imersão (Teisson e Alvard, 1994).

No sentido de melhorar a eficiência da multiplicação de brotos nos protocolos de micropropagação um novo produto começou a ser utilizado a partir da década de 80 no cultivo *in vitro*, o paclobutrazol. Este produto era usado comumente como inibidor do crescimento de brotos e promotor de iniciação de botões florais em plantas ornamentais e frutíferas (Ehlenfeldt, 1998). O paclobutrazol é um inibidor da síntese de giberelinas e seu efeito no cultivo *in vitro* é a redução no alongamento dos brotos e a promoção da taxa de multiplicação (Lorenzo et al., 1998).

A indução de brotação *in vitro* nas variedades de abacaxizeiro Cayena Lisa Serrana e Española Roxa foi também obtida com o uso de paclobutrazol no meio de cultura, em vez de auxinas e citocininas. Independente da variedade, o uso de paclobutrazol promoveu uma redução no tamanho das folhas e um aumento no número de brotos emitidos, o que demonstra o efeito favorável deste produto na diminuição do crescimento e da dominância apical em abacaxizeiro, facilitando a quebra da superação da dormência das gemas (Daquinta e Benega, 1997).

O sucesso na multiplicação rápida pela cultura *in vitro* em outras espécies hortícolas, comprova que esta técnica apresenta uma grande vantagem na obtenção de um grande número de plantas de alta qualidade. A micropropagação possibilita uma rápida multiplicação e a conseqüente utilização de variedades recém melhoradas (Vaz e Nogueroles, 1981), independente da limitação imposta pelos fatores climáticos.

A produção massal de mudas de alta qualidade genética e com sanidade comprovada e o controle de todos os fatores associados com a otimização do processo produtivo, permitiu a instalação de biofábricas em vários países. Em alguns países da América Central e Caribe os novos plantios de bananeiras e abacaxizeiros são feitos majoritariamente com mudas micropropagadas.

No LFDGV os trabalhos com micropropagação do abacaxizeiro vem sendo conduzidos desde 1988. Foram desenvolvidos os protocolos regenerativos para as cultivares Perolera, Primavera, sendo que a mais eficiente combinação de fitoreguladores utilizada foi ANA 2,7  $\mu\text{M}$  e BAP 4,4  $\mu\text{M}$ , com a taxa de multiplicação de 19,7 (Guerra et al., 1999). Para as cultivares Smooth Cayenne, Amarelinho e Pérola foram coletadas plantas (35 acessos) matrizes isentas de fusariose em produtores tradicionais domiciliados em municípios do litoral de SC. Protocolos regenerativos foram estabelecidos e otimizados para os dos ecotipos citados. A taxa média de regeneração foi de 10 brotos/gema em ciclos de subcultivos de 45 dias. Estes dados indicam um potencial regenerativo de mais de 930.000 mudas em um ano a partir de uma única planta matriz (Dal Vesco et al., 2000a).

#### 4.4. VARIAÇÃO SOMACLONAL

Quando protocolos de micropropagação são empregados para a clonagem de mudas, é esperado que todas as mudas tenham o mesmo genótipo do explante. Entretanto, ocasionalmente variantes genéticas podem ocorrer a partir de qualquer forma de cultura de tecidos (Larkin e Scowcroft, 1981). Algumas mudanças são epigenéticas enquanto outras são

hereditárias e então denominadas de variação somaclonal (Larkin e Scowcroft, 1981; Ahuja, 1987; Peschke e Phillips, 1992). A variação somaclonal se origina basicamente de alterações no número de cromossomos, quebras de cromossomos, alteração de metilação, ativação de transposons, deleções, rearranjos do genoma e substituição de nucleotídeos (Larkin e Scowcroft, 1981; Deverno et al., 1994; Kawata et al., 1995). Variação preexistente no explante (Evans et al., 1984a) como amplificação gênica, danos acumulados por radiação e endopoliploidia podem também causar variabilidade entre o clone fonte de explante e as mudas obtidas pela micropropagação.

Segundo Larkin e Scowcroft (1981), a variação somaclonal está presente na maioria das espécies estudadas e tem gerado efeito sobre inúmeras características, sendo as principais alterações do padrão morfológico, pigmentação, razão de crescimento, produção de alcalóides e mudanças na produção e habituação à auxinas e citocininas.

Se de um lado a ocorrência de mutantes seria desejável no sentido de aumentar a variabilidade para ser utilizada no melhoramento de plantas, de outro lado a estabilidade das culturas e a uniformidade da progênie regenerada é essencial na propagação de clones já selecionados. A principal dificuldade da avaliação da variação *in vitro* tem como base a variação originada de forma dita “espontânea”. A importância do conhecimento da causas da variação somaclonal implicará no ajuste de protocolos exatamente para controlar ou reduzir ao máximo tais mutações.

A frequência de mutantes não pode ser prevista e aparentemente depende de vários fatores. A composição do meio, as condições da cultura de tecidos (estresse de temperatura e luz) e o tempo entre as repicagens afetam drasticamente a quantidade de variantes (Vasil e Vasil, 1980; Vasil et al., 1979; Ahuja, 1987). Contudo, o nível de variação não é afetado somente pelo protocolo de micropropagação, mas também é dependente do tipo do explante, do genótipo doador do explante e da espécie. Sabe-se, que células meristemáticas ou embriônicas proporcionam um material mais estável. Em tomate, tem sido registrado elevados índices (4%) de ocorrência de mutações simples (Evans et al., 1984b). Se é difícil impedir, seria desejável controlar e quantificar a geração de variantes.

A forma mais convincente de confirmar a natureza genética da variação é através do teste de progênie. A natureza da herança de vários mutantes observados fenotipicamente *in vitro* tem sido demonstrada em várias espécies de reprodução sexual. Entretanto, o teste de progênie é difícil de ser utilizado em espécies de propagação vegetativa, cujo produto comercial é um fruto. Neste caso, as progênies exibiam segregação genética em todos os

locos heterozigotos, impedindo a discriminação sobre a origem da variação genética: se anterior ou decorrente do processo de micropropagação.

#### 4.5. MARCADORES MOLECULARES

Variações podem ser detectadas em culturas *in vitro* por características morfológicas, como produção de pigmentos, características bioquímicas, como síntese de nicotina, e no número e estrutura dos cromossomos (Evans et al., 1984a). A análise fenotípica, embora simples, barata e capaz de identificar alguns tipos de variação somaclonal (Wakasa, 1989), não permite identificar a grande maioria dos variantes. Já os marcadores moleculares, por serem em maior número, podem acessar a uma maior quantidade do genoma e desta forma, identificar um maior número de variantes somaclonais que aquele detectado por características morfológicas. As principais vantagens do uso de marcadores moleculares em relação aos morfológicos são: o menor tempo necessário para as análises, a quantidade de locos que podem ser analisados e a precisão dos resultados.

Os principais marcadores moleculares são: (i) fragmentos polimórficos (RFLP; Botstein et al., 1980), (ii) minissatélites ou número variável de seqüências repetidas (VNTR; Jeffrey et al., 1985), (iii) microssatélites ou 'single sequence repeat' (SSR; Tautz e Renz, 1984), (iv) polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLPs; Zabeau, 1993), (v) amplificação ao acaso de seqüências polimórficas de DNA (RAPDs; Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990), (vi) isoenzimas (Hunter e Market, 1957). A partir de pequenas amostras não destrutivas, qualquer um destes métodos pode ser utilizado na fase inicial da regeneração de um determinado genótipo. Entretanto, os dois primeiros processos além dos altos custos, requerem um laboratório bem equipado e a utilização de isótopos radioativos. Os microssatélites dependem de um investimento inicial elevado, para a identificação de regiões genômicas portadoras de repetições de seqüências curtas, bem como do sequenciamento das regiões flaqueadoras às mesmas. As isoenzimas e os RAPDs apresentam vantagens sobre os demais métodos em termos de custos, simplicidade e praticidade, ou seja, centenas de análises podem ser feitas num só dia.

A racionalidade do uso de isoenzimas para detectar variantes reside no fato de que se houver uma modificação genética e esta afetar a carga ou o tamanho da enzima, uma nova forma molecular desta é produzida, o que pode ser resolvido pela eletroforese em gel de amido ou poliácridamida, que exibirá distintos padrões de bandas. As principais características da eletroforese são: a visualização direta dos produtos gênicos, a especificidade, a

simplicidade e a herança Mendeliana simples dos respectivos genes (Brewer, 1970). Marcadores isoenzimáticos tem sido usados também para a classificação taxonômica e análise de diversidade genética da espécie (DeWald et al., 1992).

O emprego de isoenzimas tem sido utilizado com sucesso na identificação de variantes somaclonais. O desaparecimento de bandas de duas enzimas catodais (peroxidase e malato desidrogenase) foi observado em calos de *Solanum phureja* (Pehu et al. 1986). Em batata-doce (*Ipomoea batatas*) quatro sistemas enzimáticos foram eficientes para discriminar tipos de calos embriogenéticos compactos dos friáveis não embriogenéticos (Cavalcante et al., 1994). Entretanto, a micropropagação *in vitro* de três clones de ‘raspberry’ (*Rubus idacus*) não apresentou nenhum efeito no fenótipo de cinco isoenzimas (Cousineau e Dounelly, 1989). Contudo, o número reduzido de sistemas enzimáticos atualmente disponíveis que podem ser avaliados através da eletroforese, permitem amostrar apenas uma reduzida parte do genoma em uso.

Em um ensaio realizado no LFDGV, o uso de quatro sistemas isoenzimáticos (PRX, PGI, PGM e PGD) perfazendo um total de oito locos foram identificadas duas plantas de abacaxizeiro em 230 (das variedades Pérola e Amarelinho) com padrão eletroforético diferente do padrão varietal. Nenhuma das duas apresentou diferença morfológica em relação as demais. Uma terceira muda exibiu variação epigenética, já que a variegação desapareceu com o tempo e os brotos oriundas da multiplicação dela, apresentaram fenótipos normais (Dal Vesco et al., 2000b). Em outro ensaio utilizando 233 mudas em fase de aclimatização, 40 plantas em fase de multiplicação *in vitro*, 20 plantas acompanhadas durante seis repicagens e as plantas separadas anteriormente por apresentarem variação morfológica, detectou-se uma taxa de mudas variantes abaixo de 2,0% (Dal Vesco et al., 2000b). Estes resultados indicaram concordância com a literatura de que uma certa quantidade de modificações morfológicas são transientes (Taylor et al., 1995), e portanto, epigenéticas e que parte das modificações herdáveis podem não apresentar fenótipo diferenciado.

Uma segunda estratégia para detectar variantes somaclonais é a utilização dos RAPDs, que se baseia na Reação da Polimerização em Cadeia (PCR). Esta reação consiste na amplificação de uma seqüência de DNA. Cada ciclo de polimerização se constitui numa duplicação de um segmento do DNA, o que equivale dizer que o número de cópias desta parte do DNA aumenta exponencialmente com sucessivos ciclos de polimerização. Em geral, a maioria dos fragmentos de DNA amplificados são menores que 2000 pares de bases, delimitados pelos iniciadores que se ligam aos sítios específicos posicionados inversamente nas duas fitas. Os produtos resultantes da amplificação podem ser visualizados como bandas

em gel de agarose ou poliacrilamida. A utilização de iniciadores arbitrários na reação de polimerização em cadeia resultou na denominação de RAPDs ou AP-PCR (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990). O método RAPDs tem sido objeto de numerosas modificações o que tem lhe proporcionado simplicidade, redução de custos, praticidade e adaptação a diversas situações. Devido as suas inúmeras aplicações, não existe um conjunto de instruções que funcione em todas as situações. Consequentemente, cada nova aplicação provavelmente irá requerer otimização (Innis et al., 1990).

A racionalidade do método se baseia no fato de que, havendo amplificação do DNA do explante a partir de um iniciador, uma modificação genética na região de anelamento do iniciador com o DNA da muda micropropagada, impedirá a amplificação com o mesmo iniciador, caracterizando um variante. O inverso também poderá ocorrer. Além disso, qualquer rearranjo que altere o tamanho do fragmento amplificado proporcionará um padrão de bandas diferente daquele mostrado pelo clone original. Então, o critério de decisão se mutante ou não será baseado na ausência ou presença de produto amplificado, relativamente ao explante. Em cana-de-açúcar, os RAPDs foram eficientes em detectar modificações maiores que simples substituições de bases (Taylor et al., 1995).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas laboratoriais foram desenvolvidas no LFDGV do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

### 5.1. MATERIAL

O material vegetal utilizado nos experimentos foi coletado do acesso 7NV (Amarelinho) para os experimentos de micropropagação convencional e de imersão temporária e dos acessos 9CAS e 8NV (Pérola) para os experimentos de indução da embriogênese somática, dentre os 35 acessos oriundos de coletas efetuadas no litoral de Santa Catarina, presentes no LFDGV. Foram utilizados materiais propagados *in vitro* e também novos explantes extraídos das plantas matrizes da coleção de germoplasma de abacaxizeiro do LFDGV.

### 5.2. PROTOCOLO REGENERATIVO

O protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) utilizado neste trabalho foi estabelecido por Guerra et al. (1999), cujas principais etapas são:

**Retirada dos explantes e inoculação** - Explantes de gemas axilares da porção mediana do talo foram submetidos a um processo de assepsia constituído por: 1) imersão em álcool 70% (1 min), 2) imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio 2% (15 min), 3) três passagens por água destilada e esterilizada. Em seguida as gemas foram inoculadas em meio de cultura líquido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de ANA (2  $\mu$ M) e BAP (4  $\mu$ M) e 3% de sacarose, no sistema de ponte de papel filtro. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. A autoclavagem foi de 15 min. Aos 45 dias, as gemas em proliferação foram transferidas para frascos de cultura contendo 30 ml de meio líquido, com a mesma composição do meio de indução. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27°C, umidade relativa de 60  $\pm$ 5% e luz branca, de intensidade de 37 E/m<sup>2</sup> /s.

**Repicagens** - As repicagens sucessivas para frascos de cultura contendo 30 ml de meio líquido com a mesma composição do meio de indução foram feitas a cada 30 dias, para proporcionar rapidez na multiplicação e alongamento.

**Aclimatização das mudas** - Plantas que apresentaram altura mínima de 3 cm, foram retiradas do meio de multiplicação e transferidas para bandejas de isopor, com células de volume 120 cm<sup>3</sup>.

### 5.3. MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL

Convencionou-se chamar neste trabalho de sistema de micropropagação convencional o sistema de cultivo *in vitro* sem o uso de imersão temporária.

Este experimento foi desenvolvido em meio de cultura líquido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, ANA (2 µM) e BAP (4 µM) e três tratamentos de PBZ nas concentrações de 0 µM, 3,0 µM e 6,0 µM. Para o experimento de micropropagação convencional foram utilizadas 10 repetições. Cada repetição era constituída de um frasco de vidro contendo 4 explantes. Considerou-se um explante, um conjunto de 3 a 4 brotos não separados (cluster), de tamanho aproximado de 2 cm. O experimento foi avaliado 42 dias após a repicagem. Foi avaliada neste experimento a taxa de multiplicação de brotos, especificada por classes de tamanho.

### 5.4. IMERSÃO TEMPORÁRIA

Cada unidade experimental do sistema de imersão temporária (Figura 1) constituiu-se de dois recipientes de vidro com capacidade para dois litros, sendo que em um deles foi armazenado o meio de cultura e no outro os explantes para multiplicação. Estes dois recipientes foram interligados por uma mangueira, na qual passava o meio de cultura. O sistema estava dotado de um compressor de ar, que, quando acionado fazia com que o meio de cultura passasse para o recipiente contendo os explantes de abacaxizeiro e depois voltasse novamente para o recipiente de depósito. O controle do funcionamento do compressor foi feito com um aparelho temporizador, que controla o tempo de imersão dos explantes e o intervalo de tempo entre as imersões. O intervalo entre imersões foi de três horas e o tempo de imersão de três minutos. O ar injetado no sistema passa por uma membrana de filtroesterilização de 0,22 µm.

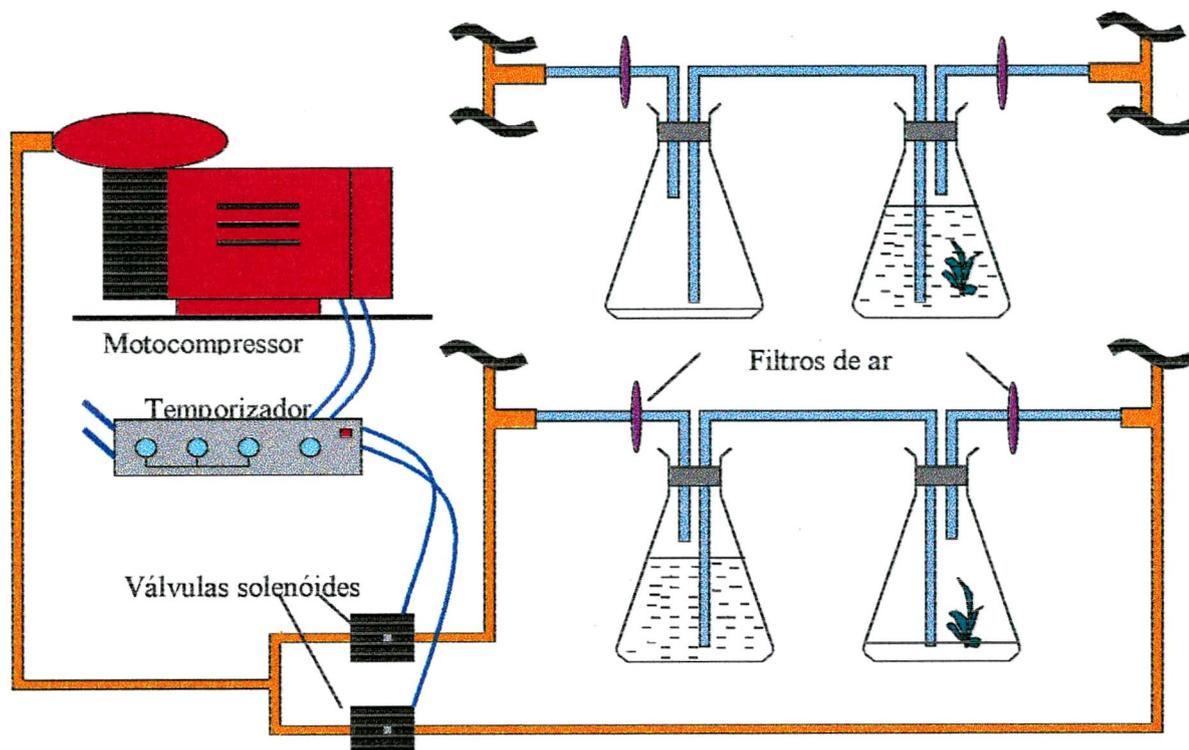


Figura 1. Esquema do sistema de imersão temporária, mostrando em cima a unidade de imersão temporária no momento de imersão e em baixo o momento de intervalo.

Os explantes utilizados foram retirados e inoculados da mesma maneira que no sistema de micropropagação convencional, sendo que a transferência para o sistema de imersão temporária foi feita após a segunda repicagem. O meio de cultura utilizado no sistema de imersão temporária foi o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de sacarose 3%. Neste experimento fatorial, foram testados três níveis ( $0 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$  e  $6 \mu\text{M}$ ) para o fator PBZ e dois níveis ( $0 \mu\text{M}$  e  $2 \mu\text{M}$ ) para o fator giberelina. A utilização de fitorreguladores foi diferenciada para cada uma das três fases do processo de multiplicação dos brotos. Na primeira fase, que teve duração de quatro semanas, foram utilizados três tratamentos de PBZ, nas concentrações  $0 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$  e  $6 \mu\text{M}$ . Em cada tratamento foram adicionados ao meio de cultura  $2 \mu\text{M}$  de ANA e  $4 \mu\text{M}$  de BAP. Na segunda fase, com duração de duas semanas, o meio de cultura isento de PBZ teve como fitorreguladores somente ANA e BAP, nas mesmas concentrações empregadas na primeira fase. Na terceira fase, de uma semana de duração, foi testada a necessidade da adição de giberelinas ao meio de cultura anterior, sendo utilizados dois tratamentos: meio isento de  $\text{AG}_3$  e meio com  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ . Para o experimento de imersão temporária foram utilizadas duas repetições. Cada repetição constituiu-se de uma unidade experimental, onde foram utilizados um total de oito explantes. Considerou-se um

explante, um conjunto de 3 a 4 brotos não separados (cluster), de tamanho aproximado de 2 cm. Foi avaliada neste experimento a taxa de multiplicação de brotos, especificada por classes de tamanho, nos diferentes tratamentos, e comparadas com àquelas obtidas através da micropropagação convencional.

## 5.5. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Para a obtenção da embriogênese somática foram realizados dois grupos de experimentos, um relacionado a indução e o outro a maturação.

### 5.5.1. INDUÇÃO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A indução de embriogênese somática foi testada a partir de folhas jovens do acesso 9CAS, pertencente ao grupo Pérola, oriundas de plantas cultivadas *in vitro* através do protocolo de organogênese descrito no tópico 5.2. O meio de cultura utilizado para a indução baseou-se na formulação MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose e agar (7 g/L). Os fitorreguladores utilizados neste ensaio foram dicamba, picloram e 2,4-D, combinados com CIN. Os tratamentos com cada fitorregulador foram utilizados separadamente, nas concentrações 0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ , cada uma combinada com CIN, 0  $\mu\text{M}$  e 2,0  $\mu\text{M}$ .

A combinação de três níveis de auxina com dois níveis de CIN constituiu-se em um experimento fatorial, no qual foram utilizadas quatro repetições por tratamento, cada uma delas representada por uma placa de Petri, com aproximadamente 20 ml de meio de cultura, onde foram inoculados os explantes. Os cinco explantes utilizados por placa foram folhas jovens de abacaxizeiro, dispostas horizontalmente dentro das placas de Petri. Nestes três experimentos foram avaliadas a percentagem de formação de calos durante um período de oito semanas, e aspectos morfológicos dos calos formados, como cor, friabilidade e quantidade relativa de células.

O segundo experimento diferiu do primeiro pela substituição do 2,4-D pelo 2,4,5-T cujas concentrações utilizadas foram 0  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$  e 10,0  $\mu\text{M}$ .

No terceiro experimento, sob as mesmas condições do segundo, foram utilizados explantes do acesso 8NV além do 9CAS.

### 5.5.2. MATURAÇÃO DE EMBRIÕES

Utilizou-se as calos de abacaxizeiro oriundos do experimento anterior (nº 5) para a indução à maturação das células com potencial embriogenético. O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose e agar (7,0 g/L). Foram testados os seguintes tratamentos: 1) MS isento de fitorreguladores; 2) MS + 2iP (24,6 µM) + ANA 5,0 µM; 3) MS + Mioinositol (100mg/L); 4) MS + ABA (30,0 µM); 5) MS + ABA (60,0 µM); 6) MS + PEG (7,5%). Cada um destes tratamentos foi combinado com calos induzidos em três tratamentos com diferentes fitorreguladores a saber: 2,4,5-T, Dicamba e Picloram (experimento 5). Obteve-se 18 combinações de tratamentos, sendo cada tubo de ensaio uma unidade experimental, o qual continha meio de cultura semi sólido, onde foi inoculado um explante. Cada unidade experimental foi repetida 10 vezes. Neste caso o explante, uma porção de calo, apresentava um diâmetro aproximado de 7 mm.

### 5.6. AVALIAÇÃO DE FIDELIDADE GENOTÍPICA DAS MUDAS MICROPROPAGADAS

Foram utilizadas para análise da fidelidade genotípica, plantas oriundas de multiplicação *in vitro*, pelo sistema de micropropagação convencional (experimento 1) e pelo sistema de imersão temporária (experimento 2). Foram analisados, através de marcadores isoenzimáticos, 100 clones de cada tratamento para os dois sistemas de micropropagação. Os mesmos clones foram analisados também com os marcadores RAPDs, porém o número de clones avaliados por tratamento foi variável, devido a mortalidade de plantas na casa de vegetação (Anexo 8, item 7).

#### 5.6.1. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

Inicialmente as plantas multiplicadas *in vitro* foram avaliadas quanto a fidelidade genotípica através de eletroforese de isoenzimas. O material vegetal utilizado foi oriundo de dois sistemas de micropropagação: o sistema de imersão temporária e o sistema de micropropagação convencional. Avaliaram-se plantas dos seguintes tratamentos no sistema de imersão temporária: PBZ nas concentrações de 0 µM, 3,0 µM e 6,0 µM, combinados com AG<sub>3</sub>, nas concentrações de 0 µM e 2,0 µM. No sistema de micropropagação convencional

avaliaram-se plantas oriundas dos tratamentos com PBZ nas concentrações de 0  $\mu\text{M}$ , 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ . As plantas multiplicadas *in vitro* foram individualizadas e aclimatizadas em casa de vegetação.

As proteínas foram extraídas do tecido foliar das plantas, o qual foi triturado em placas de acrílico com solução de extração N.º 01 (Alfenas et al., 1991) e uma pequena pitada de PVPP (polivinilpirrolidone). As amostras foram aplicadas no gel, através de tiras de papel cromatográfico (Whatman 3 MM - 12 x 2 mm), com um espaço entre amostras de 2 mm. As tiras de papel cromatográfico foram retiradas depois de 10 minutos de corrida.

As eletroforeses foram realizadas em gel de amido (13% de Penetrose 30 - Refinações de Milho Brasil Ltda., Mogi Guaçu - SP). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi citrato/morfolina, pH 6,1 (Alfenas et al., 1991). Como ligação entre gel e tampão de eletrodo foi utilizado pano tipo Perfex duplo. Sobre o gel aplicou-se uma diferença de potencial de 340 V e intensidade de corrente de 40 mA durante aproximadamente 5 horas.

Após a corrida o gel foi fatiado com fio de nylon. A primeira fatia foi descartada, as demais foram colocadas em bandejas de louça, onde se procedeu as reações de coloração. Após a adição das soluções de coloração nas bandejas, elas foram incubadas a 37°C, no escuro, até o aparecimento das bandas.

Os sistemas utilizados foram PGI (fosfoglucoase isomerase), PGM (fosfoglucomutase), PRX (peroxidase) e MDH (malato desidrogenase) descritos por Alfenas et al. (1991). Foram avaliadas 100 plantas de cada tratamento para ambos os sistemas de micropropagação, totalizando 900 plantas.

Os zimogramas obtidos com as mudas micropropagadas foram avaliados comparando-se com os obtidos com o clone multiplicado vegetativamente pelo método tradicional. A ausência, adição ou alteração de posição de uma banda qualquer foi inferido como sendo devido ao processo de multiplicação, e portanto, indicativo de um variante somaclonal.

### 5.6.2. RAPDs

**Extração de DNA:** O DNA foi extraído de tecidos foliares de mudas micropropagadas e de uma planta controle, propagada convencionalmente. Os tecidos foliares foram moídos em nitrogênio líquido e suspensos numa solução de sal contendo 'cetyltrimethylammonium bromide' (CTAB). A solução CTAB forma um complexo com o DNA. Subseqüentemente, os polissacarídeos, proteínas desnaturadas e restos celulares foram removidos pela ação do clorofórmio. Após a precipitação e ressuspensão em um tampão (buffer) de Tris-EDTA, o

DNA foi quantificado e utilizado para as análises de PCR. Após a purificação, o DNA das mudas micropropagadas foi amplificado com 7 diferentes iniciadores.

**Protocolo de amplificação:** Sequências de DNA das diferentes mudas foram amplificadas em termociclador, com os seguintes iniciadores: OPA 9 (5'-GCGTAACGCC-3'), OPA 10 (5'-GTGATCGCAT-3'), OPA 11 (5'-CAATCGCCGT-3') e OPA 13 (5'-CAGCAGCCAC-3') compostos por 10 bases arranjadas ao acaso (OPERON, Alameda, CA) e GAG (5'-GAGGAGGAGGAGGAG-3') CTG (5'-CTGCTGCTGCTGCTG-3') e GATA (5'-GATAGATAGATAGATA-3') compostos por 15 ou 16 bases arranjadas ao acaso (GIBCO). Para o termociclador Perkin Elmer – Gene Amp PCR System 2400 (24 amostras) - cada um dos três ciclos iniciais de amplificação era composto de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto à 37°C para anelamento do iniciador com o DNA do abacaxizeiro e 2 minutos a 72°C para a extensão do fragmento. Os parâmetros dos demais 35 ciclos foram: 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Um ciclo de 5 minutos à 72°C foi realizado para completar a reação (Innis et al., 1990). Depois a temperatura foi estabilizada em 4°C por tempo indefinido. Para o termociclador M. J. Research, Inc. – PTC - 100 (96 amostras) - cada um dos três ciclos iniciais de amplificação era composto de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto à 37°C para anelamento do iniciador com o DNA do abacaxizeiro e 2 minutos a 72°C para a extensão do fragmento. Os parâmetros dos demais 37 ciclos foram: 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Um ciclo de 5 minutos à 72°C foi realizado para completar a reação (Innis et al., 1990). Depois a temperatura foi estabilizada em 4°C por tempo indefinido.

**Resolução:** Os produtos da amplificação foram resolvidos num gel de agarose (1,5%) em tampão TBE (40 mM Tris-borato pH 7,4; 1 mM EDTA). A migração dos fragmentos de DNA amplificados ocorreu com a aplicação de uma corrente elétrica de 2 a 3 Volts por cm de distância entre os eletrodos. Os géis foram fotografados para permitir o registro dos dados.

**Análise dos dados:** A ausência ou adição de uma ou mais bandas comparativamente ao padrão do explante foi considerado variação somaclonal.

## 5.7-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos de micropropagação foram submetidos à Análise da Variância e as médias ao teste de separação de médias SNK (Steel e Torrie, 1980). Quando

necessário, os dados primários foram transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$ . Todas as análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SAS.

Estatisticamente, o número de somaclones foi comparado entre os diferentes tratamentos e sistemas de micropropagação utilizados, pelo método de comparação de eventos raros descrito por De Bragança Pereira (1991).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão, os resultados serão apresentados separadamente, acompanhados pelas discussões, em função das diferentes biotecnologias empregadas.

### 6.1. MICROPROPAGAÇÃO

Nesta seção são apresentados os resultados dos ensaios relacionados com o sistema de imersão temporária bem como de sua eficiência comparativamente ao sistema convencional utilizado até então para a propagação massal clonal do abacaxizeiro.

#### 6.1.1. MICROPROPAGAÇÃO CONVENCIONAL

No experimento de micropropagação convencional foram avaliadas as taxas de multiplicação médias dos explantes de abacaxizeiro em tratamentos com três concentrações de PBZ (0  $\mu\text{M}$ , 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ ). A Tabela 2 mostra que ao nível de significância de 5%, pelo teste de separação de médias SNK, não houveram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. As taxas médias de multiplicação para o experimento ficaram entre 5,2 e 6,4 brotos por explantes.

Tabela 2. Taxa média de multiplicação (brotos por explante) de abacaxizeiro (var. amarelinho, acesso 7NV) no sistema convencional em meio de cultura líquido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, ANA (2  $\mu\text{M}$ ) e BAP (4  $\mu\text{M}$ ) e três níveis de PBZ.

PBZ ( $\mu\text{M}$ )	Taxa de multiplicação	
0	6,4	a
3	5,2	a
6	6,1	a

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

As taxas de multiplicação obtidas neste trabalho são um pouco inferiores aquelas relatadas por Dal Vesco et al. (2000a), que obtiveram 13,5 brotos por explante, utilizando meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose, 2  $\mu\text{M}$  de ANA e 4  $\mu\text{M}$  de BAP.

Entretanto, estas taxas foram superiores aquelas registradas para a cultivar ‘Smooth Cayenne’, 4,2 brotos por explante, em meio basal MS suplementado com ANA e BAP (De Wald et al., 1988).

### 6.1.2. MICROPROPAGAÇÃO POR IMERSÃO TEMPORÁRIA

O experimento de micropropagação pelo sistema de imersão temporária revelou que o tratamento com a concentração de 6,0  $\mu\text{M}$  de PBZ apresentou maior taxa média de multiplicação (172,3 brotos por explante) em relação aos tratamentos com 0  $\mu\text{M}$  e 3,0  $\mu\text{M}$  de PBZ, que produziram 97,9 e 123,6 brotos por explante, respectivamente. Estes, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, pelo teste SNK a um nível de significância de 5% (Tabela 3).

Lorenzo et al. (1998) obtiveram, em cana-de-açúcar, a taxa de multiplicação de  $23,93 \pm 0,46$  com o sistema de imersão temporária em 50 ml de meio de cultura isento de PBZ e como melhor tratamento  $57,86 \pm 1,97$  com a concentração de 1,0 mg/l de PBZ (3,4  $\mu\text{M}$ ).

Tabela 3. Taxa média de multiplicação (brotos por explante) de abacaxizeiro (var. amarelinho, acesso 7NV) no sistema de imersão temporária em meio de cultura líquido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, ANA (2  $\mu\text{M}$ ) e BAP (4  $\mu\text{M}$ ) e três níveis de PBZ.

PBZ ( $\mu\text{M}$ )	Taxa de multiplicação		Médias	
	AG <sub>3</sub> ( $\mu\text{M}$ )			
	0	2		
0	77,6	118,1	97,9	a
3	145,6	101,5	123,6	a
6	148,0	196,5	172,3	b
Médias	123,7 A	138,7 A	131,2	

\* Médias na horizontal ou na vertical seguidas com a mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

Os tratamentos com e sem a presença de AG<sub>3</sub> não apresentaram diferenças estatísticas entre si a um nível de significância de 5% pelo teste SNK, para taxa de multiplicação (Tabela 3). Entretanto, quanto ao tamanho dos brotos, o tratamento com 2,0  $\mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub> apresentou um número significativamente maior de brotos maiores que 1 cm de altura (49,7 brotos por explante), enquanto o tratamento isento de AG<sub>3</sub> apresentou uma taxa de multiplicação de 10,8 brotos por explante maiores que 1 cm de altura (Tabela 4).



Figura 2. Sistema de imersão temporária: a) Aspecto geral dos frascos contendo os explantes de abacaxizeiro no primeiro plano e frascos contendo meio de cultura no segundo plano; b) Unidade do sistema de imersão temporária (explantes em multiplicação em meio contendo  $3,0 \mu\text{M}$  de PBZ); c) Detalhe de brotos multiplicados em meio de cultura isento de PBZ; d) Aspecto dos brotos com sintomas de fitotoxidez causada pelos canos de cobre.

Tabela 4. Taxa média de multiplicação (brotos por explante) de abacaxizeiro (var. amarelinho, acesso 7NV) com altura superior a 1 cm, no sistema de imersão temporária, em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, ANA (2  $\mu$ M) e BAP (4  $\mu$ M), sob duas concentrações de AG<sub>3</sub>.

AG <sub>3</sub> ( $\mu$ M)	Taxa de multiplicação
0	10,8 a
2	49,7 b

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

O tamanho de brotos com altura superior a 1 cm é uma característica muito importante para a aclimatização das plantas, pois os brotos com menores que 1 cm de altura não alcançam desenvolvimento suficiente durante a fase de crescimento para serem aclimatizados. A adição AG<sub>3</sub> ao meio possibilitou, portanto, a obtenção de um maior número de brotos com altura maior que 1 cm, que podem ser submetidos a uma fase de crescimento *in vitro* e sua posterior aclimatização. Os brotos menores que 1 cm de altura não são adequados para a aclimatização, mas podem ser utilizados como explantes e repicados para uma nova fase de multiplicação no sistema de imersão temporária.

Os brotos obtidos a partir de tratamentos contendo PBZ apresentaram menor alongação e aspecto de roseta (Figura 2b), enquanto no tratamentos isentos de PBZ as plantas apresentaram maior desenvolvimento (Figura 2c).

Os resultados aqui apresentados representam a média de duas repetições. Os dados de uma das repetições não foram incluídos na análise em função do vizez introduzido pelo uso de cano de cobre em substituição as mangueiras de plástico utilizadas para a passagem da solução entre os vasos, provocando sintomas de toxidez e menor desenvolvimento nas culturas (Figura 2d).

### 6.1.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO

Os experimentos de multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro nos sistemas de micropropagação convencional e no sistema de imersão temporária apresentaram médias de multiplicação de 5,9 e 122,5 brotos por explante, respectivamente (Tabela 5). Estes resultados demonstraram que o sistema de micropropagação por imersão temporária foi muito superior ao sistema de micropropagação convencional, produzindo 22,2 vezes mais brotos por explante. Os experimentos de micropropagação convencional e imersão temporária foram avaliados em tempos diferentes, 42 e 56 dias respectivamente, entretanto, esta diferença de

tempo não influenciou no resultado das taxas de multiplicação, visto que a maior parte multiplicação em ambos os sistemas de micropropagação ocorreu nos primeiros trinta dias.

A eficiência do sistema de imersão temporária para o abacaxizeiro em aumentar a taxa de multiplicação foi muito maior comparativamente a outras espécies. Em cana-de-açúcar, Lorenzo et al. (1998) obtiveram taxas de multiplicação de  $8,13 \pm 0,66$  para o sistema de imersão temporária e  $4,00 \pm 0,76$  para o sistema convencional com meio líquido, desta vez usando 5 ml de meio de cultura isento de fitorreguladores. Teisson et al. (1996) compararam a taxa de multiplicação em meio sólido e no sistema de imersão temporária, e obtiveram, respectivamente, 3,8 e 6,8 para *Coffea arabica*; 8,9 e 10,1 para *Solanum tuberosum*; 2,2 e 5,2 para *Musa spp.*

Tabela 5. Taxa média de multiplicação (brotos por explante) para abacaxizeiro (var. amarelinho, acesso 7NV) no sistema convencional e no sistema de imersão temporária em meio de cultura líquido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, ANA (2  $\mu\text{M}$ ) e BAP (4  $\mu\text{M}$ ).

Sistema de micropropagação	Taxa de multiplicação
Imersão temporária	131,2 a
Sistema convencional	5,9 b

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

Pelo nosso conhecimento este trabalho é pioneiro no Brasil e representa uma contribuição relevante no sentido de aumento da eficiência do sistema de micropropagação massal clonal de abacaxizeiro bem como da redução de custos das mudas micropropagadas. Assim, este sistema se torna disponível para pronta utilização em programas de produção massal de mudas isentas de fusariose.

Para um programa de produção de mudas de abacaxizeiro em grande escala o uso do sistema de imersão temporária poderia diminuir consideravelmente o tempo necessário para a produção de mudas, devido ao aumento da eficiência na taxa de multiplicação.

## 6.2. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Nos três experimentos de indução a embriogênese somática foram avaliadas as percentagens de explantes com formação de calos, e anotadas características morfológicas destes calos, como coloração, friabilidade e quantidade relativa de massa celular.

As características de coloração e friabilidade podem estar relacionadas com um maior ou menor potencial embriogenético. Em modelos indiretos, inicialmente há a diferenciação de calo e o surgimento neste de setores friáveis, normalmente brancos e translúcidos, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogenéticos, os quais dividem-se para formar pró-embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

Embora todas as análises estatísticas dos experimentos de indução a embriogênese somática foram feitas com base em dados transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$  e com auxílio do programa SAS, os valores apresentadas nas Tabelas 6 a 8 e nas Figuras 4, 6 e 8 são médias de dados primários.

### 6.2.1. INDUÇÃO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Neste experimento foi avaliada a percentagem de explantes submetidos aos diferentes tratamentos, que formaram calos após o período de 82 dias em temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ , no escuro. Foram avaliadas também as características embriogenéticas dos calos como coloração, friabilidade e quantidade de massa, porém qualitativamente.

De acordo com o teste de separação de médias SNK, os tratamentos com dicamba e com picloram, que apresentaram as médias de percentagem de proliferação de calos de 22,5 e 15,8%, respectivamente, foram estatisticamente superiores aos tratamentos com 2,4-D, com a média de 4,2% (Tabela 6).

Os tratamentos contendo dicamba apresentaram a formação de calos com coloração escura e estrutura compacta. A presença de picloram induziu a formação de massas celulares de coloração branca ou amarelada e de aspecto mais friável, e em quantidade maior que no tratamento com dicamba. O 2,4-D não foi eficiente na formação de calos, tanto em percentagem de indução como em quantidade de células, em relação aos outros tratamentos (Tabela 6). As culturas deste tratamento apresentavam calos com coloração muito escura e pouco friável.

Tabela 6. Percentagem média de explantes de abacaxizeiro (var. Pérola, acesso 9CAS) com proliferação de calos em meio de cultura semi sólido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, em resposta ao dicamba, picloram e 2,4-D.

Auxina	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Cinetina		Média			
		0	2				
Dicamba	0	0	5,0	2,5	a		
	2,5	5,0	35,0	20,0	a	22,5	A
	5	45,0	45,0	45,0	b		
	Média	16,7	$\alpha$ 28,3	$\alpha$			
Picloram	0	0	15,0	7,5	a		
	2,5	20,0	0	10,0	a	15,8	A
	5	20,0	40,0	30,0	b		
	Média	13,3	$\alpha$ 18,3	$\alpha$			
2,4-D	0	0	0	0	a		
	2,5	0	0	0	a	4,2	B
	5	5,0	20,0	12,5	a		
	Média	1,7	$\alpha$ 6,7	$\alpha$			

\* Médias na mesma linha seguidas com a mesma letra (grega) ou na mesma coluna (minúsculas ou maiúsculas) não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

Pode-se observar de uma maneira geral que os tratamentos com a presença de picloram apresentaram um aspecto de maior friabilidade e coloração branca (características geralmente associadas ao potencial embriogénico) em relação aos tratamentos com dicamba ou 2,4-D. Os tratamentos com dicamba apresentaram calos com o aspecto mais compacto em relação aos outros fitorreguladores.

O tratamento contendo 5,0  $\mu\text{M}$  de dicamba apresentou a maior média de proliferação de calos (45,0%), o que diferiu estatisticamente dos tratamentos com 0  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$ , que induziram calos em 2,5 e 20,0% dos explantes, respectivamente (Tabela 6). O tratamento sem dicamba apresentou formação de raízes nas bases foliares.

Dentre os tratamentos contendo picloram, aquele com 5,0  $\mu\text{M}$  apresentou a maior média de proliferação de calos (30,0%), o que diferiu estatisticamente dos tratamentos com 0  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$  que induziram a formação de calos em 7,5 e 10,0% dos casos, respectivamente (Tabela 6).

Pode-se observar ainda na Tabela 6, que foi necessário 5,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D para provocar a indução da proliferação de calos. Entretanto, esta percentagem de indução (12,5%) não diferiu estatisticamente dos tratamentos com 0  $\mu\text{M}$  2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, que não apresentaram a formação de calos. A ausência de significância estatística pode ser decorrente

principalmente de dois fatores: insuficiência do número de repetições (o que teria provocado um erro experimental alto; 132,3%) e ou um efeito muito reduzido do 2,4-D. Os tratamentos com 0  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D apresentaram a formação de raízes a partir da base das folhas.

A presença de cinetina (2,0  $\mu\text{M}$ ) não apresentou diferença estatística significativa em relação ao tratamento sem cinetina (0  $\mu\text{M}$ ), para qualquer combinação desta com uma das auxinas avaliadas (dicamba, picloram ou 2,4-D), como demonstram os resultados apresentados na Tabela 6.

Deste experimento, dois aspectos merecem ser destacados (Figura 3). Um deles é de que, com o aumento da concentração de auxinas no meio, houve uma maior proliferação de calos. O segundo, é de que a maior eficiência deste processo foi dada pela presença de dicamba ou picloram em relação a 2,4-D. Tais resultados são muito similares aqueles relatados por Daquinta (1997) que obteve resposta positiva para formação de calos de abacaxizeiro a partir de folhas jovens em concentrações de dicamba que variaram de 0,5 a 5,0 mg/L. Entretanto, quando foi utilizado picloram, o nível de 5,0 mg/L mostrou-se mais eficiente que as demais concentrações menores testadas.

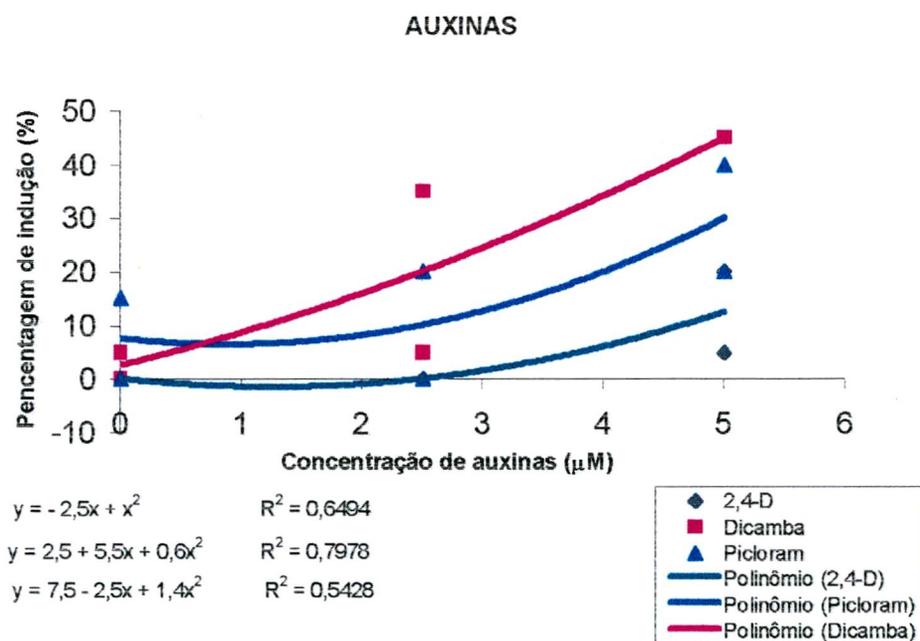


Figura 3. Percentagem média de explantes de abacaxizeiro (var. Pérola, acesso 9CAS) com proliferação de calos e análise de regressão para tratamentos com diferentes níveis de dicamba, picloram e 2,4-D em meio de cultura semi sólido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose.

### 6.2.2- INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE AUXINAS NA INDUÇÃO A FORMAÇÃO DE CALO

Um segundo experimento foi estabelecido para avaliar a percentagem de explantes submetidos a diferentes tratamentos, com concentrações maiores de auxinas e com a substituição do 2,4-D por 2,4,5-T. Estas modificações introduzidas neste novo experimento foi decorrente (i) de que no experimento anterior não havia sido atingida a concentração de máxima resposta e (ii) a baixa eficiência do 2,4-D.

Neste caso, houve formação calos após o período de 55 dias em culturas mantidas no escuro. A exemplo do primeiro experimento, foram avaliadas também qualitativamente características embriogênicas dos calos como coloração, friabilidade e quantidade de massa.

A Tabela 7 mostra que os tratamentos com a presença do fitorregulador dicamba apresentaram uma média de explantes com taxa de proliferação de calos de 47,5%, significativamente maior que as taxas apresentadas pelos fitorreguladores picloram e 2,4,5-T (37,5% e 23,3%, respectivamente).

Os calos formados a partir dos tratamentos com a presença de dicamba apresentavam coloração branca ou marrom e aspecto compacto. Os calos formados a partir de picloram apresentaram coloração branca e relativamente mais friável, entretanto com pequena quantidade de massa. Os calos formados a partir do fitorregulador 2,4,5-T apresentaram coloração branca, com a formação de estruturas de aspecto arredondado, pouco friáveis e também com pequena quantidade de massa. Pode-se notar ainda, a formação de raízes a partir dos calos originados de 2,4,5-T, o que caracteriza a ação rizogênica do mesmo.

As concentrações 5,0  $\mu\text{M}$  e 10,0  $\mu\text{M}$  de dicamba não apresentaram médias de proliferação de calos significativamente diferentes entre si (75,0% e 67,5%, respectivamente), mas ambos os tratamentos diferiram do tratamento isento de dicamba, que não apresentou proliferação de calos (Tabela 7). Quanto ao aspecto dos calos nas duas concentrações de dicamba, não se observou diferenças morfológicas visíveis, pois apresentavam calos de coloração coloração branca ou marrom e aspecto compacto.

Tabela 7. Percentagem média de explantes de abacaxizeiro (var. Pérola, acesso 9CAS) com proliferação de calos em meio de cultura semi sólido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, em resposta ao dicamba, picloram e 2,4,5-T.

Auxina	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Cinetina		Média			
		0	2				
Dicamba	0	0	0	0 a			
	5	90,0	60,0	75,0	b	47,5	A
	10	75,0	60,0	67,5	b		
	Média	55,0 $\alpha$	40,0 $\alpha$				
Picloram	0	0	0	0 a			
	5	60,0	50,0	55,0	b	37,5	A
	10	55,0	60,0	57,5	b		
	Média	38,3 $\alpha$	36,7 $\alpha$				
2,4,5-T	0	0	0	0 a			
	5	33,3	50,0	41,7	b	23,3	A
	10	26,7	30,0	28,3	b		
	Média	20,0 $\alpha$	26,7 $\alpha$				

\* Médias na mesma linha seguidas com a mesma letra (grega) ou na mesma coluna (minúsculas ou maiúsculas) não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

As concentrações 5,0  $\mu\text{M}$  e 10,0  $\mu\text{M}$  de picloram também não apresentaram médias de proliferação de calos significativamente diferentes entre si (55,0% e 57,5%, respectivamente), mas ambos os tratamentos diferiram do tratamento isento de picloram, que, igualmente a dicamba, não apresentou proliferação de calos (Tabela 7). Quanto ao aspecto dos calos nas duas concentrações de picloram, não se observaram diferenças morfológicas visíveis, pois os mesmos apresentavam coloração branca e menor proliferação celular, mas de aspecto mais friável do que o observado no tratamento com dicamba.

As concentrações 5,0  $\mu\text{M}$  e 10,0  $\mu\text{M}$  de 2,4,5-T não apresentaram diferenças significativas entre si (médias de proliferação de calos de 41,67% e 28,34%, respectivamente), mas ambos os tratamentos diferiram do tratamento isento de 2,4,5-T, que não apresentou proliferação de calos (Tabela 7). Quanto ao aspecto dos calos nas duas concentrações de 2,4,5-T, observou-se que ambos apresentavam calos de coloração branca, com a formação de estruturas de aspecto arredondado, pouco friáveis e com pequena proliferação celular. Entretanto, a concentração de 5  $\mu\text{M}$  resultou na formação de muitas raízes.

A presença de cinetina (2,0  $\mu\text{M}$ ) não resultou em diferenças estatísticas significativas na proliferação de calos entre os tratamentos isentos deste fitorregulador, em qualquer

combinação com uma das auxinas avaliadas (dicamba, picloram ou 2,4,5-T), como se pode observar na Tabela 7.

Pode-se observar de uma maneira geral que os tratamentos com a presença de picloram apresentaram um aspecto de maior friabilidade e coloração branca (características geralmente associadas ao potencial embriogénico) em relação aos tratamentos com dicamba ou 2,4,5-T, enquanto os tratamentos com dicamba apresentaram calos com o aspecto mais compacto em relação aos outros fitorreguladores.

Cisneros et al. (1996) obtiveram os melhores resultados na indução a proliferação de calos em abacaxizeiro (var. Española Roja e Cayena Lisa Serrana) com 2,5 e 5,0 mg/l de dicamba e picloram, respectivamente, comparativamente a outras combinações destes reguladores. Em trabalho realizado anteriormente por Daquinta et al. (1994) com explantes da variedade Cayena Lisa Serrana foi obtido mais de 50% de formação de calos em meio de cultura MS e adicionado de uma dose similar de dicamba.

Embora não foi constatada a existência de diferenças significativas na formação de calos provocadas pela presença de 5  $\mu\text{M}$  ou 10  $\mu\text{M}$  de qualquer um dos fitorreguladores testados, o fato de que a média de proliferação de calos ser menor na maior concentração usada indicou que o ponto de máxima resposta de proliferação de calos deve estar entre estas duas concentrações de fitorreguladores (Figura 4). Com base nas equações estimadas a partir das médias, este ponto seria de 7,0  $\mu\text{M}$  para dicamba, 7,7  $\mu\text{M}$  para picloram e 6,3  $\mu\text{M}$  para 2,4,5-T. Contudo, estudos com níveis maiores destes reguladores devem ser realizados para validar os resultados aqui obtidos.

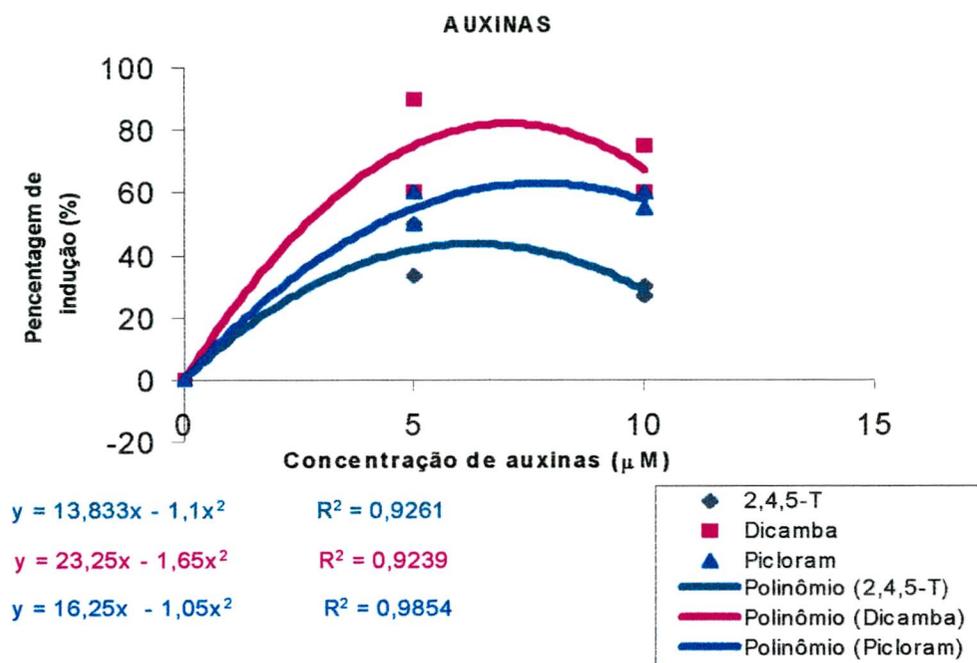


Figura 4. Percentagem média de explantes de abacaxizeiro (var. Pérola, acesso 9CAS) com proliferação de calos e análise de regressão para tratamentos com diferentes níveis de dicamba, picloram e 2,4,5-T em meio de cultura semi sólido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose.

### 6.2.3. INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO NA INDUÇÃO A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Para testar a existência de possível dependência genotípica na indução de calo, neste terceiro experimento desta série, foi avaliada a porcentagem de explantes extraídos de dois acessos da variedade Pérola, submetidos aos diferentes tratamentos, que formaram calos após o período de 61 dias em temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ , no escuro. A exemplo dos dois experimentos anteriores, foram observadas qualitativamente as características embriogenéticas dos calos como coloração, friabilidade e quantidade de massa.

Este experimento revelou a existência de diferenças entre dois diferentes genótipos de abacaxizeiro, ambos da variedade Pérola, quanto a sua resposta a diferentes tratamentos (Tabela 8). O acesso 9CAS foi significativamente mais responsivo (23, 9%) na proliferação

de calos que o acesso 8NV (9,3%). Contudo, não foram detectadas diferenças significativas entre os tipos de auxinas avaliadas para nenhum dos acessos.

Para o acesso 9CAS (Tabela 8), o uso de 10,0  $\mu\text{M}$  de dicamba resultou na maior média de proliferação de calos (47,5%), mas não diferiu estatisticamente do tratamento 5,0  $\mu\text{M}$  (45,0%). Entretanto, ambos foram significativamente superiores ao tratamento isento de dicamba, pois neste caso não houve formação de calo. Este resultado é semelhante ao relatado por Daquinta e Benega (1997), que obtiveram mais de 50% de formação de calos na variedade Cayena Lisa, cultivando as folhas jovens de vitroplantas em meio MS sólido suplementado com 2,5 mg/l de dicamba e 0,5 mg/l de BAP. Os calos formados a partir dos explantes tratados com dicamba apresentavam coloração branca-amarelada e aspecto compacto.

Tabela 8. Percentagem média de explantes de abacaxizeiro com proliferação de calos de abacaxizeiro em meio de cultura semi sólido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, em resposta ao dicamba, picloram e 2,4,5-T, sob duas concentrações de cinetina, para os acessos 9CAS e 8NV.

Auxina	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	9CAS			8NV			
		Cinetina		Médias	Cinetina		Médias	
		0	2		0	2		
Dicamba	0	0	0	0 a	0	0	0 b	
	5	45,0	45,0	45,0 b	30,8 A	30,0	6,7	18,3 a
	10	45,0	50,0	47,5 b		20,0	0	10,0 b
	Médias	30,0 $\alpha$	31,7 $\alpha$			16,7 $\alpha$	2,2 b	9,4 A
Picloram	0	0	0	0 a	15,0 A	0	0	0 a
	5	45,0	15,0	30,0 b		0	25,0	12,5 a
	10	5,0	25,0	15,0 b	-	30,0	15,0 a	
	Médias	16,7 $\alpha$	13,3 $\alpha$			0,0 b	18,3 $\alpha$	9,2 A
2,4,5-T	0	0	0	0 c	25,8 A	0	0	0 a
	5	40,0	55,0	47,5 a		0	15,0	7,5 a
	10	40,0	20,0	30,0 b	35,0	5,0	20,0 b	
	Médias	26,7 $\alpha$	25,0 $\alpha$			11,7 $\alpha$	6,7 $\alpha$	9,17 A
Médias Acessos		23,9 a			9,3 b			

\* Médias na mesma linha seguidas com a mesma letra (grega) ou na mesma coluna (minúsculas ou maiúsculas) não diferem entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

O tratamento com 5,0  $\mu\text{M}$  de picloram apresentou 30,0% de proliferação de calos, mas não diferiu estatisticamente do tratamento da dose de 10,0  $\mu\text{M}$  (15,0%). Entretanto ambos foram significativamente superiores ao tratamento isento de picloram (0%). Os calos

formadas a partir do tratamento com picloram apresentavam coloração amarelada, com uma maior formação de células nas nervuras foliares, e o aspecto das células foi mais friável que o tratamento com dicamba.

Diferentes concentrações da auxina 2,4,5-T proporcionaram respostas diferenciais em termos de formação de calos. A concentração 5,0  $\mu\text{M}$  induziu a formação de calos em 45%, média significativamente superior aos outros dois tratamentos. Com a dose de 2,4,5-T 10,0  $\mu\text{M}$  foi obtida uma percentagem média de proliferação de calos de 30,0%, diferindo estatisticamente do tratamento isento de 2,4,5-T, no qual não houve proliferação. Os calos oriundos do tratamento com 2,4,5-T apresentavam baixa proliferação celular, com coloração amarelada e aspecto compacto. Observou-se a formação de raízes a partir dos explantes.

Em termos médios, a resposta do acesso 8NV a diferentes fontes de auxinas não diferiu significativamente (Tabela 8). No caso de dicamba, o tratamento com maior percentagem média de explantes com proliferação de calos foi 5  $\mu\text{M}$  (18,3%), diferindo significativamente dos tratamentos 0 e 5  $\mu\text{M}$ , nos quais a proliferação alcançou 10,0% e zero, respectivamente. Os calos formados a partir de dicamba apresentavam coloração branco-amarelada ou amarelada, com pouca quantidade de células e aspecto muito compacto.

Quando os explantes de 8NV foram incubados com 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  de picloram, houve proliferação de calos em 12,5 e 15,0% dos mesmos, respectivamente (Tabela 8). Mesmo não havendo proliferação de calos na ausência de picloram, as médias dos três tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. Os calos formados a partir de picloram apresentavam coloração amarelada e aspecto compacto.

Com 10  $\mu\text{M}$  de 2,4,5-T se obteve a maior média de explantes com proliferação de calos, diferindo estatisticamente das médias de explantes com calos nos tratamentos 0 e 5  $\mu\text{M}$  (Tabela 8). Nestes dois tratamentos, ocorreu a formação de calos em 7,5% dos explantes quando foi usado 5  $\mu\text{M}$  e ausência de calos no meio sem esta auxina. Os calos formados a partir de 2,4,5-T apresentavam poucas células, com características compactas e escuras.

De uma maneira geral, os tratamentos com a presença de picloram apresentaram um aspecto de maior friabilidade e coloração branca (características geralmente associadas ao potencial embriogénico) em relação aos tratamentos com dicamba ou 2,4,5-T, enquanto os tratamentos com dicamba apresentaram calos com o aspecto mais compacto em relação aos outros fitorreguladores.

O ponto de máxima resposta para o acesso 9CAS está entre as duas maiores concentrações de fitorreguladores utilizadas no experimento (Figura 5). Com base nas

equações estimadas a partir das médias, este ponto é 7,8  $\mu\text{M}$  para dicamba, 5,8  $\mu\text{M}$  para picloram e 6,2  $\mu\text{M}$  para 2,4,5-T. Para o acesso 8NV, somente dicamba atingiu o ponto de máxima resposta ao fitorregulador, que foi estimado ser de 6  $\mu\text{M}$ . Contudo, estudos com concentrações maiores com estes reguladores devem ser realizados para validar os resultados aqui obtidos, bem como estimar as concentrações de máxima resposta para cada genótipo, uma vez que existe resposta diferencial dos mesmo às diferentes concentrações e tipos de fitorreguladores.

Pode-se observar pelos dados apresentados na Tabela 8 e pela Figura 5 que a resposta na proliferação de calos foi mais efetiva no acesso 9CAS em relação ao acesso 8 NV, o que sugere a existência de uma pré-disposição genética ou fisiológica diferente entre os dois genótipos utilizados como explantes.

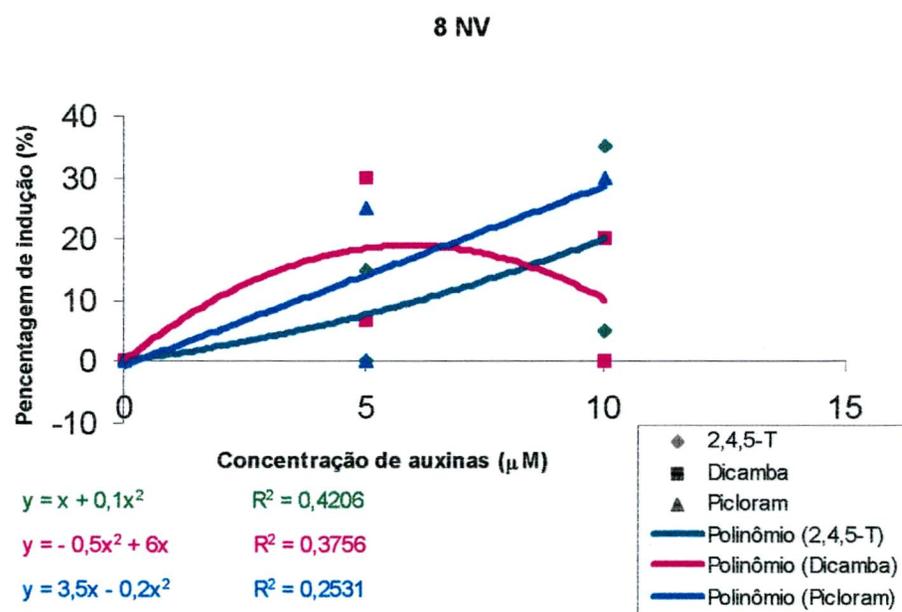
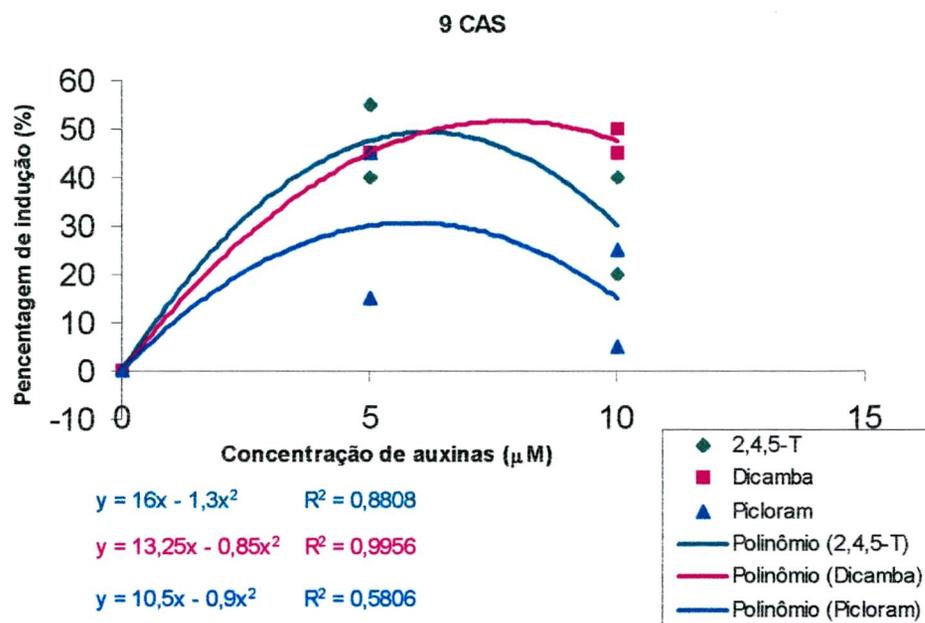


Figura 5. Percentagem média de explantes de abacaxizeiro com proliferação de calos e análises de regressão para tratamentos com diferentes níveis de dicamba, picloram e 2,4,5-T em meio de cultura semi sólido constituído da formulação salina e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado de 3% de sacarose, sob duas concentrações de cinetina, para os acessos 9CAS e 8NV.

#### 6.2.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS CALOS.

De uma maneira geral os calos obtidos nos três experimentos anteriores apresentaram características morfológicas semelhantes. Os calos oriundos de tratamentos contendo dicamba apresentaram coloração escura (amarelada ou marron) e um aspecto compacto (Figura 6a). Picloram promoveu a proliferação de calos em maior quantidade em relação ao dicamba, e apresentou calos de coloração branca amarelada ou translúcida de aspecto bastante friável (Figura 6b). O fitorregulador 2,4-D, utilizado no primeiro experimento, produziu calos em quantidade bastante reduzida, de coloração amarelada ou escura, de aspecto compacto, e com a formação de raízes (Figura 6c). Os calos produzidos por 2,4,5-T apresentavam proliferação de calos em pequena quantidade, de coloração branca, pouco friáveis e com formação de raízes (Figura 6d).

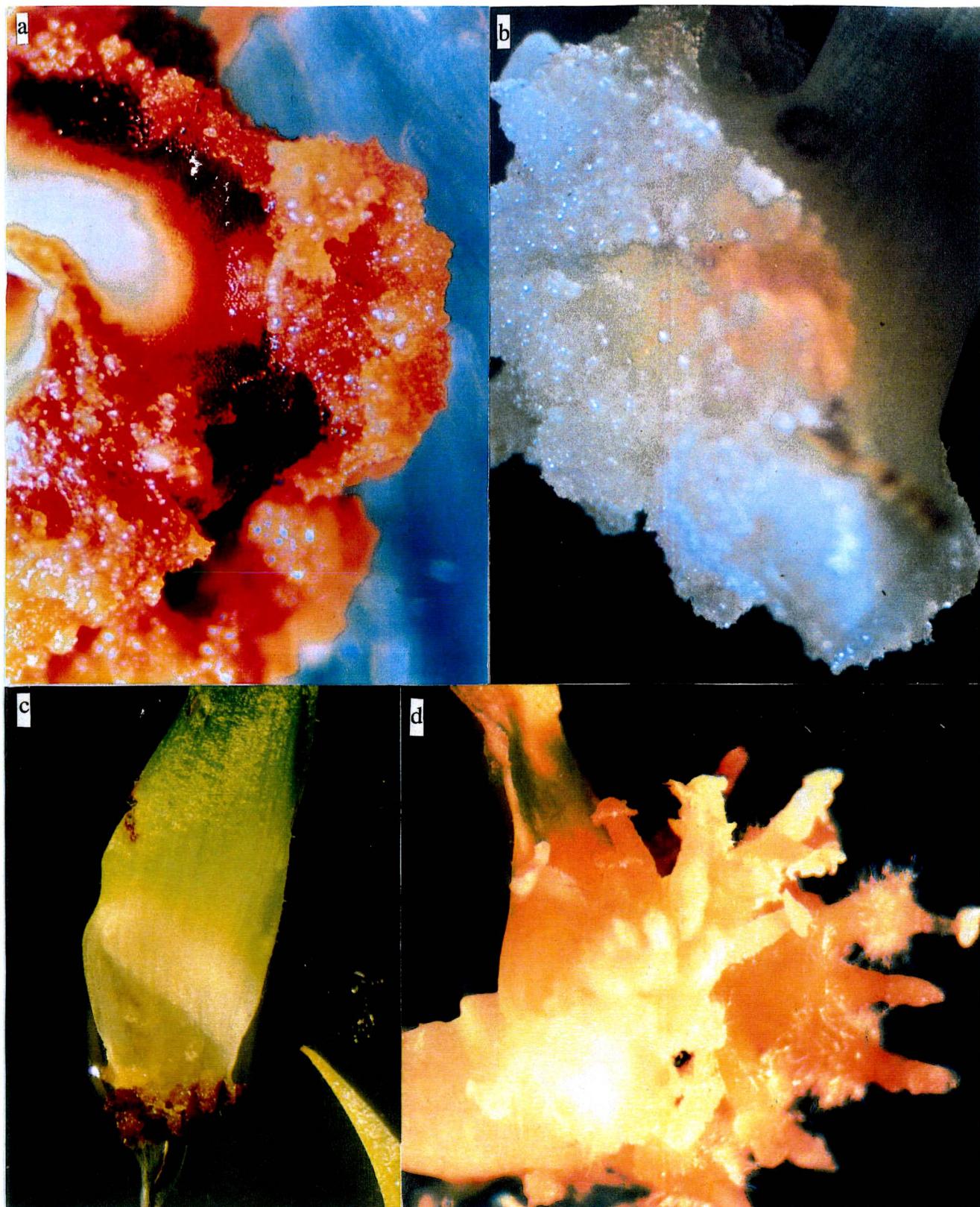


Figura 6. Proliferação de calos em folhas jovens de abacaxizeiro: a) Calos formados em dicamba (coloração escura e compactos); b) Calos formados em picloram (coloração branca e aspecto friável); c) Calos formados em 2,4-D (pequena quantidade, compactos e de coloração escura); d) Calos formados em 2,4,5-T (coloração branca e pouco friáveis).

### 6.3. DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

Nos experimentos de indução a embriogênese, obteve-se a formação de calos, entretanto, estes calos, não regeneraram plantas em resposta aos tratamentos de maturação empregados. A regeneração de plantas a partir de calos nem sempre é alcançada. Fichet (1990) obteve calos a partir da região da coroa apical de abacaxizeiro da variedade Queen em meio de cultura Murashige e Tucker com caseína hidrolisada (400 mg/l), água de coco (15%) e ANA (40 mg/l); contudo, estes calos também não resultaram em embriogênese somática. De outro lado, o protocolo utilizado por Cisneros et al. (1996) proporcionou a regeneração de plantas oriundos de calos proliferados a partir de folhas jovens das variedades Española Roja e Cayena Lisa Serrana) em meio de cultura MS livre de fitorreguladores. Também, Escalona et al. (1997) afirmaram ter estabelecido a regeneração de plantas via embriogênese somática na var. Cayena Lisa Serrana, sendo a combinação hormonal dicamba 2,2  $\mu\text{M}$  e cinetina 2,2  $\mu\text{M}$  e o cultivo em imersão temporária a melhor resposta morfogênica dos calos.

Estes fatos sugerem que a resposta a indução embriogenética pode também estar associada relacionada ao genótipo. A influência do genótipo também foi observada no terceiro experimento de indução a embriogênese somática do presente trabalho, em que foram utilizados explantes dos acessos 9CAS e 8NV. Embora pertencentes a variedade Pérola, tais acessos são ecotipos diferentes e exibiram diferenças significativas na indução a proliferação de calos (23,9% e 9,3%, respectivamente). Entretanto, para testar esta hipótese de dependência genotípica, um maior grupo de genótipos devem ser testados.

## 6.4. AVALIAÇÃO DA FIDELIDADE GENOTÍPICA

A avaliação da fidelidade genotípica foi feita com o uso de marcadores isoenzimáticos e RAPDs. Foram avaliadas plantas oriundas do cultivo *in vitro* nos sistemas de micropropagação convencional e do sistema de imersão temporária dos experimentos de micropropagação (Experimentos 1 e 2). Para a avaliação isoenzimática utilizou-se 100 plantas de cada tratamento. Para a avaliação por RAPDs foram utilizadas as mesmas plantas avaliadas pelos sistemas isoenzimáticos, porém o número de plantas avaliadas foi menor devido a mortalidade de plantas ocorrida na casa de vegetação. Por isso foi considerada a percentagem de plantas variantes de maneira proporcional ao número de plantas avaliadas em cada tratamento.

### 6.4.1. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES VIA ISOENZIMAS

A análise isoenzimática das plantas micropropagadas através do sistema convencional de micropropagação detectou dois variantes (o que corresponde a 2,0%), ambos no tratamento sem PBZ. Como nos tratamentos com 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$  de PBZ não foram detectadas variações somaclonais, a percentagem de variantes em relação ao total de plantas avaliadas (300) foi de 0,67% (Tabela 9).

Tabela 9. Percentagem de variantes de mudas de abacaxizeiro (var. Amarelinho, acesso 7NV) micropropagadas pelo sistemas de micropropagação convencional, sob três concentrações de PBZ, com base em quatro sistemas isoenzimáticos (17 locos).

PBZ ( $\mu\text{M}$ )	PGI	PGM	PRX	MDH	Total (%)	
0	1	0	1	0	2,0	a
3	0	0	0	0	0	a
6	0	0	0	0	0	a
Total	1	0	1	0	2	
Média (%)	0,33	0	0,33	0	0,67%	

\* Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

No sistema de micropropagação por imersão temporária foram encontradas quatro variantes de um total de 600 plantas analisadas, o que também corresponde a 0,67%. Em cada uma das combinações de tratamentos PBZ zero e AG<sub>3</sub> 2,0  $\mu\text{M}$ ; PBZ 3,0  $\mu\text{M}$  e AG<sub>3</sub> zero; PBZ 6,0  $\mu\text{M}$  e AG<sub>3</sub> zero; e PBZ 3,0  $\mu\text{M}$  e AG<sub>3</sub> 2,0  $\mu\text{M}$  foi detectado 1,0% de variantes (Tabela 10). Nas mudas micropropagadas nas outras duas combinações de tratamentos (PBZ zero e

AG<sub>3</sub> zero e PBZ 3,0  $\mu$ M e AG<sub>3</sub> 2,0  $\mu$ M) não foram detectados variantes. A ausência ou presença de 2,0  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> não afetou a ocorrência de mudas variantes, pois em ambos os casos, um igual número de variantes foi detectado.

Tabela 10. Percentagem de variantes somaclonais de mudas de abacaxizeiro (var. Amarelinho, acesso 7NV) micropropagadas pelo sistema de imersão temporária sob três concentrações de PBZ e duas de AG<sub>3</sub>, com base em quatro sistemas isoenzimáticos (17 locos).

PBZ ( $\mu$ M)	AG <sub>3</sub> ( $\mu$ M)								Total de plantas	Média (%)
	0				2					
	PGI	PGM	PRX	MDH	PGI	PGM	PRX	MDH		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,5 a
3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,5 a
6	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1,0 a
Total	1	1	0	0	2	0	0	0	4	
Média (%)	0,67	0,67	0	0	1	0	0	0		
Média (%)	0,67 a				0,67 a					0,67

\* Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

Tomando-se a análise das 900 plantas avaliadas em ambos os sistemas de micropropagação, convencional e imersão temporária, a taxa de variação somaclonal foi de 0,67%. Este valor foi semelhante aquele obtido por Dal Vesco et al. (2000b), em que foi encontrado 0,57% de variantes em 1.741 plantas *in vitro* e mudas em aclimatização.

A incidência de variações somaclonais detectada por 17 locos isoenzimáticos nos dois sistemas de micropropagação pode ser considerada baixa. Além disso não houveram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em que foram detectadas variações somaclonais e os tratamentos onde não foram detectadas, bem como entre os dois sistemas de micropropagação.

Como foram utilizados apenas quatro sistemas isoenzimáticos e, assumindo que as mutações ocorrem ao acaso no genoma, não é de se esperar que um sistema seja mais eficiente que outro, na identificação de variantes. Contudo, o sistema isoenzimático PGI foi o único detectou variantes somaclonais entre as mudas micropropagadas nos dois sistemas de micropropagação e nenhum variante foi detectado através do sistema isoenzimático MDH (Tabelas 9 e 10).

A Figura 7 mostra géis de amido com os quatro sistemas isoenzimáticos utilizados, sendo que no sistema PGI e no sistema PGM observa-se amostras com padrões variantes. Num único caso, um variante foi identificado simultaneamente por isoenzimas e análise

fenotípica. Isto ocorreu, com uma muda (Figura 7d) oriunda do tratamento isento de PBZ e com 2,0  $\mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub>. O variante que tornou-se variegado também revelou um padrão isoenzimático PGI diferente do explante (Figura 7a). Contudo, não é possível concluir se ocorreu duas mutações ou uma mutação que afetou os dois locos.

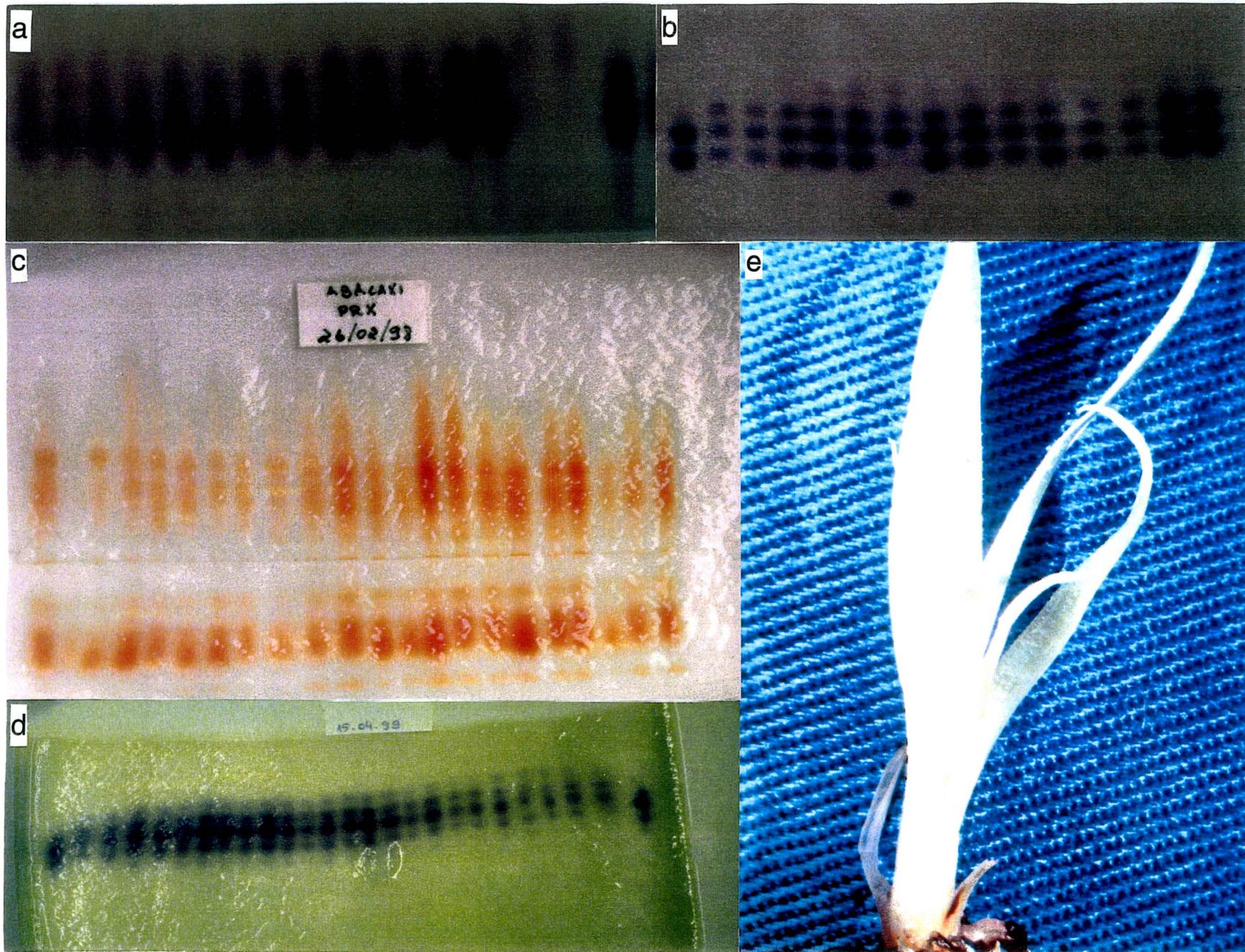


Figura 7. Géis de amido utilizados em eletroforese de isoenzimas: a) PGI (os duas amostras variantes pertencem a uma planta variegada); b) PGM (observa-se uma banda diferente, identificando um indivíduo variante); c) PRX; d) MDH; e) Planta variegada (analisada na foto a).

#### 6.4.2. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES VIA RAPDs

As plantas analisadas por RAPDs foram as mesmas analisadas por isoenzimas; entretanto como houve perdas de plantas por mortalidade, a quantidade de plantas analisadas por RAPDs foi menor comparativamente a análise com isoenzimas. O uso de RAPDs permitiu detectar 32 plantas variantes de um total de 504 plantas analisadas o que equivale a 6,3%.

Pode-se observar (Tabela 11) que houveram diferenças estatisticamente significativas na ocorrência de variações somaclonais entre as mudas oriundas de distintos tratamentos testados no sistema convencional. Assim, as mudas micropropagadas nos tratamentos isentos de PBZ apresentaram 8,5%, 6,0% e 7,9% de taxa de variação somaclonal (Tabela 11). A percentagem total de variantes apresentada na Tabela 11 se refere a percentagem de plantas variantes e não a soma dos variantes detectados por cada primer, pois alguns variantes foram detectados por mais de um primer.

Dos sete primers testados, três deles (GAG, CTG e GATA) não detectaram variações somaclonais. Entretanto, todos os demais primers detectaram a presença de variantes (Tabela 11). No tratamento isento de PBZ dois primers (OPA 9 e OPA 10) detectaram variações em um mesmo indivíduo. O mesmo ocorreu no tratamento contendo 6  $\mu\text{M}$  de PBZ, onde um mesmo indivíduo variante foi detectado por dois primers (OPA 10 e OPA 13).

Tabela 11. Percentagem de variantes de mudas de abacaxizeiro (var. Amarelinho, acesso 7NV) micropropagadas pelo sistema convencional, sob três concentrações de PBZ, com base em sete primers (32 bandas).

PBZ ( $\mu\text{M}$ )	OPA 9	OPA 10	OPA 11	OPA 13	GAG	CTG	GATA	Média (%)	
0	2,1	1,1	3,2	3,2	0	0	0	8,5%	a
3	2,4	1,2	1,2	1,2	0	0	0	6,0%	c
6	1,1	1,1	2,2	4,5	0	0	0	7,9%	b
Média (%)	5,6%	3,4%	6,6%	9,3%	0%	0%	0%	7,5%	

\* Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

No sistema de micropropagação por imersão temporária (Tabela 12) não foram detectadas diferenças significativas pela análise de RAPDs, entre os tratamentos isento de PBZ e com a presença de 3,0  $\mu\text{M}$  do PBZ, nos quais foram identificadas 4,0% e 2,8% de plantas variantes, respectivamente. Entretanto, o tratamento contendo 6,0  $\mu\text{M}$  de PBZ

apresentou 8,9% de plantas variantes, que é significativamente superior aos demais tratamentos. A presença (2,0  $\mu\text{M}$ ) ou ausência de  $\text{AG}_3$  não afetou significativamente a percentagem de mudas mutantes quando micropropagadas no sistema de imersão temporária.

A média geral de variantes apresentada na Tabela 12 se refere a percentagem de plantas variantes e não a soma dos variantes detectados por cada primer, pois alguns variantes foram detectados por mais de um primer. No tratamento isento de PBZ e isento de  $\text{AG}_3$  foi detectado um único variante, simultaneamente por três primers (OPA 10, OPA 13 e GAG). Também no tratamento isento de PBZ e com 2,0  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$ , um mesmo variante foi detectado por dois primers (OPA 10 e OPA 13).

Tabela 12. Percentagem de variantes de mudas de abacaxizeiro (var. Amarelinho, acesso 7NV) micropropagadas pelo sistema de imersão temporária, sob três concentrações de PBZ e duas de  $\text{AG}_3$ , com base em sete primers (32 bandas).

PBZ ( $\mu\text{M}$ )	AG <sub>3</sub> ( $\mu\text{M}$ )		Percentagem												
	0						2						Total		
	OPA9	OPA10	OPA11	OPA13	GAG	CTG	GATA	OPA9	OPA10	OPA11	OPA13	GAG	CTG	GATA	
0	0	5,0	0	5,0	5,0	0	0	1,3	2,5	0	1,3	0	0	0	4,0% a
3	0	0	0	0	3,7	0	0	0	0	0	0	2,3	0	0	2,8% a
6	3,0	0	0	0	3,0	0	0	5,9	2,9	2,9	0	0	0	0	8,9% b
Total	5,0% a						5,1% a						5,0%		

\* Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%, pelo teste SNK.

Dois dos três primers (CTG e GATA) que falharam em detectar mutantes no sistema convencional, também não identificaram mutante algum nas mudas oriundas do sistema de imersão temporária. Estes resultados não podem ser tomados como medida de eficiência de um primer em detectar variantes, uma vez que poucos primers foram testados e que pouco se conhece da natureza das variações somaclonais. Contudo, o fato de que dois dos três primers, que anelam em regiões genômicas portadoras de repetições de tri ou tetranucleotídeos (microsatélites), falharam em identificar pelo menos 1 mutante dos 32 detectados em 504 mudas pelos outros primers, necessita ser investigado mais profundamente. Uma hipótese que pode ser testada futuramente é a de que estas regiões são menos tolerantes a mutações provocadas pelos componentes e condições dos meios de cultura. Por outro lado, as regiões de microsatélites sofrem alterações no número de repetições (deleção ou duplicação) da sequência de nucleotídios base do microsatélite.

O emprego de diferentes marcadores possibilita um avanço no conhecimento sobre os efeitos da cultura de tecidos sobre o genoma. Assim, como exemplo, os microssatélites poderiam ser empregados para aprofundar o conhecimento da natureza dos variantes, pois se não amplificarem detectam mutações na região de anelamento do primer. Se detectarem fragmentos de diferentes tamanhos, a alteração seria do tipo deleção ou duplicação.

Segundo Skirvin et al. (1994), baseado em sua opinião profissional, um nível mais realístico de variação somaclonal esperado *in vitro* é, provavelmente, em torno de 1% a 3%. Isto não significa que um pesquisador poderia esperar 1% a 3% dos seus regenerantes mutados em um loco particular. Isto significa admitir que de 1% a 3% dos regenerantes apresentarão alteração em alguma característica física ou química em relação ao explante de origem. Al-Zahim et al. (1999) encontraram em alho, 1% de variantes em dois clones (Solent White e California Late) e 0,35% em outros três clones (Chinese, Long Keepes e Madena).

A taxa de variação final aqui detectada foi de 6,3% via RAPDs (Tabelas 11 e 12), valor este bem superior aquele detectado pelas isoenzimas, que foi de 0,67% (Tabelas 9 e 10).

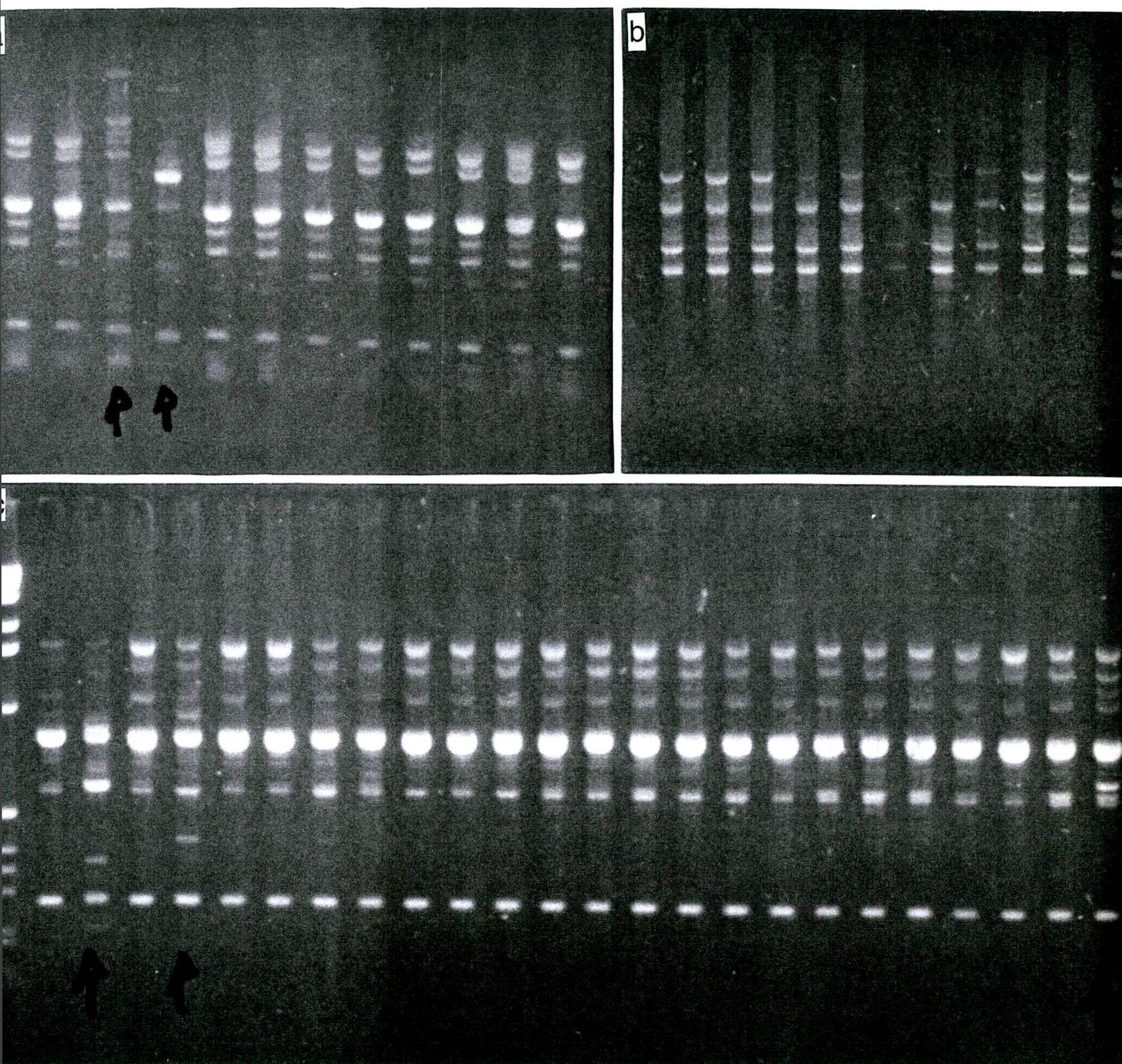


Figura 8. RAPDs resolvidos em géis de agarose (1,5%): a) Presença de duas amostras com padrões de diferentes para o primer OPA 9; b) Padrão típico do primer GAG; c) Presença de três amostras com padrões de bandas diferentes para o primer OPA 10.

## 7. CONCLUSÕES

1. Não houveram diferenças significativas na taxas de multiplicação para os diferentes níveis de PBZ no sistema de micropropagação convencional;
2. No sistema de multiplicação por imersão temporária a maior taxa de multiplicação ocorreu na concentração 6  $\mu\text{M}$  PBZ (172,3 brotos por explante), diferindo significativamente dos níveis 0 e 3  $\mu\text{M}$  de PBZ, que não diferiram estatisticamente entre si;
3. A presença ou ausência de  $\text{AG}_3$  não influenciou significativamente a taxa de multiplicação total no sistema de micropropagação por imersão temporária, entretanto, se forem considerados os brotos maiores de 1 cm, os tratamentos com 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  (49,7 brotos por explante) apresentou taxa de multiplicação significativamente maior que os tratamentos isentos de  $\text{AG}_3$  (10,8 broto por explantes);
4. A taxa de multiplicação no sistema de micropropagação por imersão temporária, 131,2 brotos por explante, foi significativamente maior que no sistema convencional, 5,9 brotos por explante, o que corresponde a uma taxa 22,2 vezes maior;
5. No experimento de indução a embriogênese somática, não houve diferenças estatisticamente significativas na proliferação de calos entre os fitoreguladores dicamba, picloram e 2,4,5-T, entretanto, dicamba e picloram se mostraram superiores aos tratamentos contendo 2,4-D;
6. As concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$  de dicamba, picloram e 2,4,5-T mostraram uma percentagem de proliferação de calos significativamente superior aos tratamentos isentos desses reguladores, mas não diferiram significativamente entre si;
7. A presença de 2  $\mu\text{M}$  de cinetina não apresentou diferenças estatisticamente significativa em relação aos tratamentos isentos de cinetina;
8. Dicamba apresentou calos bastante compactos e de coloração escura, picloram apresentou calos friáveis e de coloração branca ou amarelada e em quantidade relativamente maior que dicamba, 2,4-D e 2,4,5-T apresentaram pouca quantidade de calos, de coloração branca ou amarelada e de consistência pouco friável, e com a presença de raízes;
9. Não houveram respostas em nenhum dos tratamentos de indução de calos ao desenvolvimento de embriões somáticos;

10. A análise isoenzimática detectou 0,67 % de plantas variantes para o ambos os sistemas de micropropagação, e não houveram diferenças significativas entre os tratamentos para ambos os sistemas;
11. A avaliação da fidelidade genotípica via RAPDs detectou 7,5 % de plantas variantes para o sistema convencional e 5,0 % de plantas variantes para o sistema de imersão temporária, entretanto, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os sistemas de micropropagação. No sistema de micropropagação convencional, no tratamento PBZ 0  $\mu\text{M}$  foi detectada a maior ocorrência de variantes (8,5 %), diferindo do tratamento PBZ 6,0  $\mu\text{M}$  (7,9 % de variantes), e ambos diferindo também do tratamento PBZ 3,0  $\mu\text{M}$  (6,0 % de variantes). No sistema de micropropagação por imersão temporária, no tratamento PBZ 6,0  $\mu\text{M}$  foi detectada a maior ocorrência de plantas variantes (8,9 %), diferindo estatisticamente dos tratamentos PBZ 0  $\mu\text{M}$  e PBZ 3,0  $\mu\text{M}$  (4,0 e 2,8 % de variantes, respectivamente);

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados no presente trabalho abrem novas perspectivas para a viabilização da produção de mudas de abacaxizeiro em grande escala.

O uso do sistema de imersão temporária proporciona uma maior taxa de multiplicação, o que implica em uma considerável (i) redução do tempo necessário para a multiplicação de mudas, (ii) redução do espaço físico ocupado pelas culturas, (iii) diminuição da mão-de-obra nas repicagens e (iv) diminuição do custo final por muda micropropagada. Além disso, a imersão temporária oferece menor risco de ocorrência de hiperhidricidade devido ao menor tempo de contato dos explantes com o meio de cultura líquido, e a renovação periódica da atmosfera do frasco de cultivo reduz o efeito inibidor do acúmulo de etileno e outros gases no frasco, possibilita a renovação de CO<sub>2</sub>, aumenta a possibilidade de ocorrência de fotossíntese *in vitro* e torna as plantas mais resistentes a aclimatização.

Um inconveniente que sempre gera preocupações no cultivo de plantas *in vitro* é a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais e a dificuldade de quantificar a existência destes variantes. Este trabalho apresenta uma contribuição neste sentido, uma vez que proporcionou uma quantificação da ocorrência destas variações baseada no uso de dois tipos de marcadores moleculares (isoenzimas e RAPDs), sendo que ambos se mostraram eficientes na detecção de variantes. Os resultados indicaram que de fato estas variante surgem a uma taxa que exige monitoramento da fidelidade genotípica e agronômica das mudas oriundas de micropropagação.

Neste trabalho foram utilizados apenas quatro sistema isoenzimáticos que possibilitaram o acesso a 17 locos e sete iniciadores que geraram 32 bandas, o que representa a avaliação de uma pequena parcela do genoma. Entretanto, em pesquisas futuras poder-se-á testar outros sistemas isoenzimáticos e outros iniciadores para se obter uma maior abrangência do genoma e uma avaliação mais precisa da ocorrência de variações somaclonais.

A possibilidade de se produzir mudas de abacaxizeiro por embriogênese somática poderá aumentar ainda mais a taxa de multiplicação *in vitro*, o que seria altamente desejável em um processo de produção em grande escala. Os experimentos de indução a embriogênese somática apresentados neste trabalho proporcionaram até 47% de indução a proliferação de calos, resultados semelhante aos obtidos em Cuba (Daquinta et al., 1994). Esta é a primeira fase do desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para abacaxizeiro no LFDGV. Conseguiu-se além da indução de calos, a manutenção de culturas de células. A

próxima fase a ser desenvolvida é o controle da indução a formação de embriões somáticos e a maturação, etapas necessárias a regeneração de plantas *in vitro*.

Na Figura 9 observa-se uma representação esquemática de um protocolo de embriogênese somática. O primeiro círculo representa a fase de indução a formação de células embriogênicas e sua multiplicação em ciclos repetitivos, o segundo círculo representa a fase de desenvolvimento e maturação de embriões, que ainda não foi obtida em nosso laboratório.

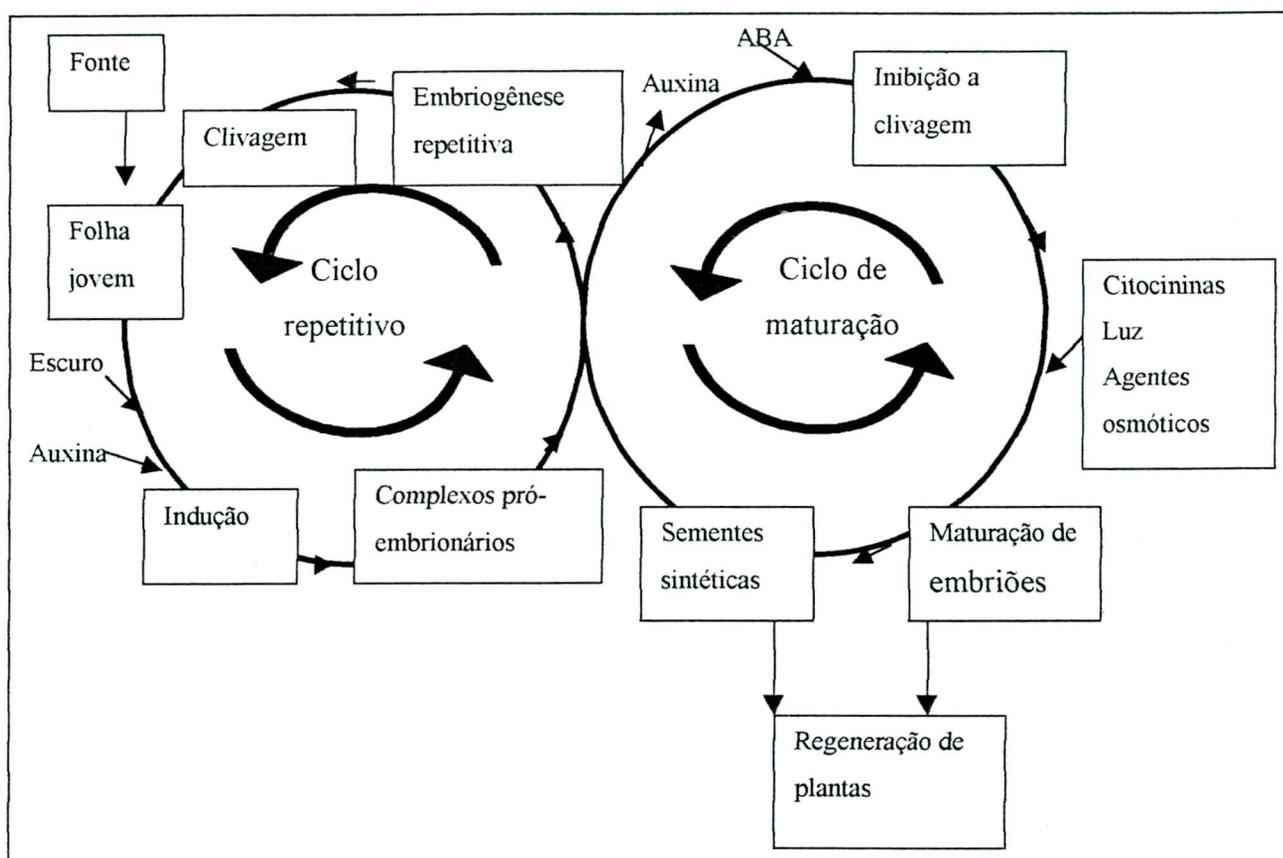


Figura 9. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática. Adaptado de Durzan (1988).

## 9. BIBLIOGRAFIA

- AGHION, D. e BEAUCHESNE, G. Utilization de la technique de culture sterile d'organes pour des clones d'*Ananas*. *Fruits*, 15 (10): 464 - 466, 1960.
- AHUJA, M.R. Somaclonal variation. In: BONGA, J.M. e DURZAN, D.J. (eds.). *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, p. 272-285. 1987.
- AQUILAR, J. A. E. Fusariose do abacaxizeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ABAXICULTURA, 1º, Jaboticabal, 1982. Anais..., Jaboticabal, FCAV, 1982. P. 205-216.
- ALFENAS, A. C., PETERS, I., BRUNE, W., PASSADOR, G. C. *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Universidade Federal de Viçosa. MG. 1991. 242 p.
- ALVARD, D., CÔTE, F. e TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation, *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 32, p. 55-60. 1993.
- AL-ZAHIM, M.A., FORD-LLOYD, B.V. E NEWBURY, H.J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and citological analysis. *Plant Cell Reports*. p. 853-857. Jun.1999.
- BAKER, K. e COLLINS, J. L. Notes on the distribution and ecology of *Ananas* and *Pseudananas* in South America. *American Journal of Botany*. 26:697-702. 1939.
- BELÓ, A., PINTO, A.A., VESCO, L.L., GUERRA, M.P., NODARI, R.O. Detecção de variação somaclonal em mudas micropropagadas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*). In: REUNIÃO ESPECIAL DA SBPC, 3ª, Florianópolis, SC, 1995. Anais..., SBPC, São Paulo, p. 510.
- BERTONI, M. S. Contributions à l'étude botanique des plantes cultivées. I.Essai d'une monographie du genre *Ananas*. *Anales Cient. Paraguayos* 2(4):50-322. 1919.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331. 1980.
- BREWER, G.J. *An introduction to isozyme technique*. New York, Academic Press. 1970.
- CABRAL J. R. S., MATOS, A.P. *Recomendações de Cultivares resistentes a fusariose*. Cruz das Almas. EMBRAPA, 4 p. (Comunicado Técnico, 11). 1986.
- CABRAL, J. R. S. e MATOS, A. P. Pineapple breeding for resistance to Fusariosis in Brazil. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 21:137-145. 1995.

- CABRAL, J. R. S., CUNHA, G. A. P. e RODRIGUES, E. M. Micropropagação do abacaxizeiro. In: *III CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 5., 1983, Florianópolis. Anais ... Florianópolis, SC: SBF, v.1, p.124-127. 1984.
- CAVALCANTE ALVES, J.M., SIHACHAKR, D., ALLOT, M., TIZROUTINE, S., MUSSIO, I., SERVAES, A., DUCREUX, G. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Plant Cell Reports*, 13:437-441. 1994.
- CHU, C. C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE*, 1978. PeCing. Proceedings... Boston, Pitman Advanced Publishing Program. p. 43-50, 1981.
- CISNEROS, A., DAQUINTA, M.A., RODRIGUEZ, Y., ESCALONA, M., LUNA, I. e BORROTO, C.G. Influencia de los reguladores del crecimiento clorinados en la embriogénesis somática en piña. *Rev. Bras. Frutic.*, Cruz das Almas, v. 18, nº. 2, p. 269-274, agosto. 1996.
- COLLINS, J. L. *The pineapple, botany, utilisation, cultivation*. London. Leonard Hill, 294 p. 1960.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G., DUVAL, M. F. Bases genéticas para definir una estrategia de mejoramiento de la piña. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 21:95-118. 1995.
- COUSINEAU, J.C., DOUNELLY, D.J. Identification of raspberry cultivars *in vivo* and *in vitro* using isozymes analysis. *HortScience* 24:490-492. 1989.
- COUTO, F. A., RAMO, V. H. V. e TANAK, M. A. S. Comparações entre métodos para identificar muda de abacaxizeiro portadores de fusariose. In: *III CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 5., 1983, Florianópolis. Anais... Florianópolis, SC: SBF, p. 86-96. 1984.
- DAQUINTA, M. *Propagacion in vitro de la piña (Ananas comosus (L) Merr.)*. Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba. 128 p. 1997. (Tese).
- DAQUINTA, M. e BENEGA, R. Review of tissue culture in pineapple. *Pineapple News* 3(1), 1997.
- DAQUINTA, M., CASTILLO, R., LORENZO, J. C., COBO, I., ESCALONA, M., TRUJILLO, R., BORROTO, C. G. Formacion de callos en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.16, nº. 2, p. 83-89. Setembro 1994.

- DAL VESCO, L. L., GUERRA, M. P., PINTO, A. A. e NODARI, R. O. Otimizações do protocolo regenerativo in vitro para o abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L) Merrill). *Fruits*. 2000a. (Submetido).
- DAL VESCO, L., PESCADOR, R., BELO, A., FEUSER, S., OLIVEIRA, E. N., BRANCHER, A., ZAFFARI, G. R., NODARI, R. O. e GUERRA, M. P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, 22(1):80-85. 2000b.
- DE BRAGANÇA PEREIRA, C. A. Teste estatístico para comparar proporções em eventos de citogenética. In: Mutagênese, Teralogênese e carcinogênese. Eds. Rabelo-Gay, N. Rodrigues, M. A. e Monteleone-Neto, R. SBG. pp. 113-21. 1991.
- DEVERNO, L.L., CHAREST, P.J., BONEN, L. Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of Larix. *Theor. Appl. Genet.*, 88:727-732. 1994.
- DeWALD, M.G., MOORE, G.A., SHERMAN, W.B. Identification of Pineapple Cultivars by isozyme genotypes. *J. Amer. Soc. Hort.* 113(6):935-938. 1988.
- DeWALD, M. G., MOORE, G. A. e SHERMAN, W. B. Isozymas in Ananas (Pineapple): Genetics and usefulness in taxonomy. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 117(3)491-4966, 1992.
- DREW, R. A. Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. *Queensland Agric. Journal*, set.-oct., p.447- 452, 1980.
- DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. *Biot. and Gen. Eng. Rev.* 6:341-378, 1988.
- DUVAL, M. F., COPPENS d'EECKENBRUGGE, G. Genetic variability in the genus *Ananas*. *Acta Horticulturae* 334:27-37. 1993.
- EHLENFELDT, M. K. Enhanced bud production in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in response to paclobutrazol. *HortScience* 33(1):75-77. 1998.
- ESCALONA, M., ESPINOSA, P., DAQUINTA, M., LORENZO, J. C., GONZALEZ, B. L., FUNDORA, Z., BORROTO, C. Aportes a la regeneración de callos embriogénicos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad Cayena Lisa Serrana. *BioVeg'97*. Centro de Bioplantas, Ciego de Avila, Cuba, 1997.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R., MEDINA FILHO, H.P. Somaclonal and gametoclinal variation. *Am J Bot* 71:759-774. 1984a.
- EVANS, D.A., SHARP, W.R., BRAVO, J.E. Cell culture methods for crop improvement. In: Ammirato, P, Sharp WR, Evans D, Yamada Y (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3. Crops Species. New York, Macmillan Publ. Co. 1984b.

- FICHET, M. Organogenesis in callus cultures of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta Horticulturae* 275:267-275. 1990.
- GUERRA, M. P., DAL VESCO, L. L., PESCADOR, R., SCHUELTER A. R e NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34:(9) 1557-1563. 1999.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (eds). *Culturas de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568. 1999.
- HUNTER, R.L., MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125:1294-1295. 1957.
- INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. New York, Academic Press. 1990.
- JEFFREY, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73. 1985.
- KAWATA, M., OHMIYA, A., SHIMAMOTO, Y., OONO, K., TAKAIWA, F. Structural changes in the plamid DNA of rice (*Oryza sativa* L.) during tissue culture. *Theor. Appl. Genet.*, 90:364-371. 1995.
- KISS, E., KISS, J., GYULAI, G. e HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience*, 30(1)127-129, 1995.
- KOLLER, O. L. O cultivo do abacaxi em Santa Catarina. Florianópolis, SC: EMPASC. 20 p. (Boletim Técnico, 9). 1981.
- LAKSHMI SITA, G., SINGH, R. e IYER, C. P. A. Plantlets through shoot tip culture in pineapple. *Curr. Sci*, n. 43, p. 724, 1974.
- LARKIN, P.J., SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:547-554. 1981.
- LEAL, F. e COPPENS d'EECKENBRUGGE, G. Pineapple. Fruit Breeding, Volume I: *Tree and tropical fruits*. Edited by Jules Janick and James N. Moore. p. 515-557. 1996.
- LEAL, F. On the history, origin and taxonomy of the pineapple. *Interciencia*, v. 14, Nº. 5, sep-oct 1989.
- LORENZO, J.C., GONZÁLES, B.L., ESCALONA, M., TEISSON, C., ESPINOSA, P. e BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in na improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54:197-200. 1998.

- MATHEWS, V. H. e RANGAN, T. S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant in vitro culture of pineapple. *Sci. Horticultural*, 11(4)319-28, 1979.
- MATOS, A. P. Epidemiologia da fusariose do abacaxizeiro. A cultura do abacaxizeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11 (130). p 46-49. outubro de 1985.
- MENENDEZ, R.A., LARSEN, F.E., FRITTS, Jr. R. Identification of Apple Rootstock cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Hort. Sc.*, 111:933-937. 1986.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, p. 473-497, 1962.
- PANNETIER, C. e LANAUD, C. Divers aspects de l'utilisation possible des cultures "in vitro" pour la multiplication végétative de l'*Ananas comosus* L. Merr., variété 'Cayenne Lisse'. *Fruits* 31:739-750. 1976.
- PEHU, E., GASSMAN, C., VEILLEUX, R., KALB, T. Changes in isozyme patterns and ultrastructure of calus tissue of *Solanum phureja* during regeneration. *HortScience*, 21:251. 1986.
- PESCADOR, R. , GUERRA, M. P., PEDROTTI, E. L. e ZAFFARI, G. R. Desenvolvimento e otimização de um protocolo de micropropagação do abacaxizeiro cv. amarelinho. In: *XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, Salvador, BA. Anais ... Salvador, BA: SBF, 1994.
- PESCHKE, V. M., PHILLIPS, R. L. Genetic implications of Somaclonal Variation in plants. *Advances in genetics*. v. 30. 1992.
- RANGAN, T. S. Pineapple In: *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan Publishing Co., v. 3, p. 373-82, 1984.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. (2ª ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- SAUER, J.D. Historical geography of crop plants: a select roster. *CRC Press*, Boca Raton, FL. 1993.
- SCHULTER, A. R., DAL VESCO, L. L., SILVA, A. L., GUERRA, M. P., MARASCHIN, M. Propagação massal de cultivares de abacaxi (*Ananas comosus*) resistente a fusariose através da cultura de tecidos. In: *XI CBICCA*, Lavras, MG. Anais . Lavras, MG. 1991.
- SKIRVIN, R. M., McPHEETERS, K. D., NORTON, M. Sources and frequencies of somaclonal variation. *Hort Science*, v. 29(11), p. 1232-1237. Novembro de 1994.
- SMITH, L. B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. *Bot. Jahrb.* 66:446-448. 1934.

- SOUZA, S. M. C. Abacaxi. Doenças de plantas II. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11 (123), p 6-9. março de 1985.
- TAUTZ, D., RENZ, M. simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12:4127-4138. 1984.
- TAYLOR, P.W.J., GEIJSKES, J.R., KO, H.L., FRASER, T.A., HENRY, R.J., BIRCH, R.G. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. *Theor. Appl. Genet.*, 90:1169-1173. 1995.
- TEISSON, C., ALVARD, D., BERTHOULY, B., CÔTE, F., ESCALANT, J.V., ETIENNE, H. e LARTAUD, M. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. Proc. Int. Sym. Plant Production in closed ecosystems. *Acta Horticulturae* ISHS. p. 521-526. 1996.
- TEISSON, C. e ALVARD, D. A new concept of plant *in vitro* culture in liquid medium: temporary immersion. In: *VIII<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE*. IAPTC, Firenze, June 12-17, 1994.
- VASIL, I.K. e VASIL, V. Clonal Propagation. In: VASIL, I.K. (ed.). Perspectives in plant cell and Tissue Culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl* 11A, New York, Academic Press. p.145-173. 1980.
- VASIL, I.K., AHUJA, M.R., VASIL, V. Plant tissue culture in genetics and plant breeding. *Adv Genet* 20:127-215. 1979.
- VAZ, R. L. e NOGUEROLES, J. Micropropagação e influência do tempo de permanência em meio contendo floroglucinol no enraizamento de brotos apicais de pessegueiro e macieira. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 12., 1981, Recife. Anais... Recife, PE.
- WAKASA, K. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Y.P.S. Bajaj. v. 5. p. 13-29. 1989.
- WEEDEN, N.F., LAMB, R.C. Identification of apple cultivars by isozyme analysis. *J. Amer. Hort. Sc.* 110:509-515. 1985.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535. 1990.
- WELSH, J. e MCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218. 1990.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application* N.º 0534858 A1. 1993.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. Meio de Cultura MS (Murashige e Skoog, 1962).

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÃO FINAL (mg/l)
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
<b>Micronutrientes</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Vitaminas (mg/l- μM)</b>	
TIAMINA- HCl	0,1
PIRIDOXINA-HCl	0,5
ÁC. NICOTÍNICO	0,5
GLICINA	2,0
<b>Fontes de Carbono</b>	
MIO-INOSITOL	0,1
SACAROSE	30

## ANEXO 2. Protocolo de extração de DNA vegetal

1. Identificar cada amostra no lado e na tampa do tubo;  
*Utilizar uma caneta cuja tinta não saia com a água.*
2. Macerar o material vegetal com nitrogênio líquido;  
*Para tubos de 1,5 ml utilizar aproximadamente 150 mg de material vegetal e completar o tubo com N líquido. Cuidado com o manuseio do N líquido pois a temperatura é de  $-196^{\circ}\text{C}$  e pode provocar queimaduras. A maceração pode ser feita diretamente dentro do tubo utilizando-se o moinho. Quando for necessário uma maior quantidade de material vegetal utilizar tubos maiores e fazer a maceração com bastão em cadinho de porcelana.*
3. Adicionar 700  $\mu\text{l}$  de solução de extração;  
*Executar esta operação dentro da capela, pois a solução de extração contém  $\beta$ -mercaptoetanol, que possui um odor bastante desagradável.*
4. Agitar os tubos para homogeneização das amostras;
5. Incubação em banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 hora;  
*Homogeneizar as amostras a cada 15 min.*
6. Adicionar de 600  $\mu\text{l}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1);  
*Segurar os tubos pelas extremidades para que os mesmos não se abram e impedir vazamentos.*
7. Agitar levemente os tubos por inversão até a formação de uma emulsão;  
*Cuidar para que os tubos estejam limpos de clorofórmio.*
8. Centrifugar a 13000 RPM por 5 min;  
*Equilibrar os pesos dos tubos na centrífuga antes de centrifugar.*  
*Atenção: o restante do material no fundo do tubo contém clorofórmio que é um solvente orgânico muito forte, portanto não pode ser descartado no lixo comum. Deve ser armazenado em uma garrafa de vidro própria para esse fim que se encontra no interior da capela.*
9. Retirar a maior quantidade da fase aquosa (sobrenadante) para um novo tubo ( $\pm 540 \mu\text{l}$ );  
*Esta etapa pode ser suprimida quando o material vegetal não apresenta excesso de carboidrato, como folhas de abacaxi, por exemplo. Passar então para o passo 14.*
10. Adicionar de 1/10 do volume de solução de CTAB 10%, misturando gentilmente por 5 min;
11. Adicionar de 600  $\mu\text{l}$  de CIA (24:1);

12. Agitar levemente os tubos por inversão até a formação de uma emulsão;
13. Centrifugar a 13000 RPM por 5 min;  
*Equilibrar os pesos dos tubos novamente.*
14. Adicionar 400 µl de isopropanol a -20 °C;  
*No caso de goiabeira serrana, abacaxi e araucária, é necessário deixar os tubos pelo menos por 1 h e 30 min no freezer, ou os tubos podem permanecer over night no freezer. Atenção: se for necessário interromper o processo de extração do DNA, este é o momento em que isto pode ser feito.*
15. Incubar no freezer a -20 °C para a precipitação do DNA;
16. Centrifugar a 7500 RPM por 5 min;
17. Descartar o sobrenadante;  
*Virar o tubo com cuidado para não perder o pellet de DNA.*
18. Lavar o pellet de DNA em etanol 70% por 5 min;
19. Lavar o pellet de DNA em etanol absoluto por 3 min;
20. Deixar escorrer o tubo invertido por 5 a 10 min para sair todo o álcool;
21. Colocar os tubos na posição normal sobre a bancada pelo tempo que for necessário para a evaporação de todo o álcool ou secar com a bomba de vácuo;
22. Solubilizar em TE + RNase (10 µg/ml de RNase);  
*Aproximadamente 50 µl de TE por tubo (depende da quantidade de DNA presente no tubo).*
23. Incubar em banho-maria por 30 min a 37°C ou deixar 24 h em bancada a temperatura ambiente (preferível);
24. Identificar os tubos e armazenar em freezer a -20°C.

## SOLUÇÕES NECESSÁRIAS

## Solução de extração de DNA

0,7 m NaCl	40,915 g
50 mM Tris	6,055 g
10 mM EDTA	3,7224 g
1% CTAB	10 g
0,1% $\beta$ -mercaptoetanol*	1 ml
água destilada e deionizada	completar para 1 litro
ajustar o pH para 8,0 com HCl	
* Adicionar no momento de usar.	

## CIA (24:1)

Clorofórmio + álcool isoamílico na proporção 24:1

## TE (solução tampão Tris-EDTA)

10 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TE + RNase

10  $\mu$ g de RNase por ml de TE

## Solução CTAB 10%

10% CTAB  
0,7 M NaCl

### ANEXO 3 - Soluções e Sistemas de revelação de isoenzimas

#### Fosfoglucomutase (PGM)

Glucose-1-fosfato, Na <sub>3</sub>	0,0125 g
EDTA	0,025 g
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	0,01 g
MTT	0,01 g
PMS	0,001 g
MgCl <sub>2</sub>	0,01 g
Tris-HCl 0,1 M pH 8,5	50 ml
G6PDH	20 U

#### Fosfoglucoose isomerase (PGI)

Frutose-6-fosfato, Na <sub>3</sub>	0,020 g
NADP <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	0,01 g
MTT	0,01 g
PMS	0,001 g
MgCl <sub>2</sub>	0,01 g
Tris-HCl 0,1 M pH 8,0	50 ml
G6PDH	10 U

#### Malato Desidrogenase (MDH)

Ácido Málico 0,5 M pH 8,0	2 ml
NAD <sup>+</sup> , Na <sub>2</sub>	0,01 g
MTT	0,01 g
PMS	0,001 g
Tris-HCl 0,1 M pH 8,5	50 ml
G6PDH	20 U

#### Peroxidase (PRX)

O-dianisidina	0,016 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	30 µl
Acetato de Sódio 0,1 M pH 4,5	50 ml

#### Tampão Citrato-Morfolina pH 6,1 de eletrodo

Ácido Cítrico monoidratado	8,40 g
N-(3-Aminopropil)-Morfolina (titulação)	± 15 ml
Água destilada e deionizada	completar para 1 litro

#### Tampão Citrato-Morfolina pH 6,1 de gel

Diluir o tampão de eletrodo 1:20

Tampão de extração de isoenzimas

Fosfato de sódio bibásico	0,6 g	(0,034 M)
Sacarose	7 g	(0,2 M)
PVP – 40	2,56 g	(2,56%)
DTT	56 mg	(3 mM)
L-ácido ascórbico	100 mg	(5,7 mM)
DIECA	100 mg	(5,8 mM)
Bissulfito de Sódio	50 mg	(2,6 mM)
Borato de Sódio	50 mg	(2,5 mM)
β-Mercaptoetanol	0,2 ml	(0,2%)
Polietilenoglicol – 6000	1 g	(1%)
Água destilada e deionizada	<b>completar para</b>	
	<b>100 ml</b>	

**ANEXO 4 - Programas utilizados para PCR**

## 1. M.J. Research, Inc. – PTC – 100 (96 amostras)

94 °C ----- 1 min	}	3 ciclos
35 °C ----- 1 min		
72 °C ----- 2 min		

94 °C ----- 30 s	}	37 ciclos
37 °C ----- 40 s		
72 °C ----- 2 min		

72 °C ----- 5 min  
4 °C ----- ∞

## 2. Perkin Elmer – Gene Amp PCR System 2400 (24 amostras)

94 °C ----- 1 min	}	3 ciclos
35 °C ----- 1 min		
72 °C ----- 2 min		

94 °C ----- 20 s	}	35 ciclos
37 °C ----- 30 s		
72 °C ----- 2 min		

72 °C ----- 5 min  
4 °C ----- ∞

**ANEXO 5 – Reagentes para uma reação de PCR**

Água miliQ autoclavada	5,42 µl
BSA Sigma (2,5 mg/ml)	1,04 µl
Tampão 10 X Cenbiot (c/ 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	1,30 µl
DNTPs (2,5 mM)	1,04 µl
Taq DNA Polimerase Cenbiot (5 U/µl)	0,20 µl
Primer [2,5 µM (OPERON) ou 5 µM (GIBCO)]	2,00 µl
DNA abacaxi	2,00 µl
	13,00 µl

Primer	Sequência de bases	Fornecedor
GAG	5'-GAGGAGGAGGAGGAG-3'	GIBCO
CTG	5'-CTGCTGCTGCTGCTG-3'	GIBCO
GATA	5'-GATAGATAGATAGATA-3'	GIBCO
OPA 09	5'-GCGTAACGCC-3'	OPERON
OPA 10	5'-GTGATCGCAT-3'	OPERON
OPA 11	5'-CAATCGCCGT-3'	OPERON
OPA 13	5'-CAGCAGCCAC-3'	OPERON

**ANEXO 6 – Eletroforese de DNA**

1. Preparar gel de agarose 1,5% (300 ml) em placa horizontal para gel submarino;
2. Adicionar 2 µl de tampão de carregamento a cada tubo contendo o DNA amplificado (produto da PCR);
3. Aplicar o produto da PCR nos poços do gel;
4. Realizar a eletroforese em tampão TBE 1X com uma voltagem de 120 V por aproximadamente 1 h e 30 min;
5. Visualizar o gel em Transluminador UV;
6. Fotografar o gel em Câmera Polaroid PB.

**Gel de agarose 1,5%:**

Agarose	4,5 g
Tampão TBE 1X	300 ml
Brometo de Etídeo	60 µl

**TBE 5X:**

Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 ml

**Tampão de Carregamento:**

Brometo de Etídeo	0,02 mg
Azul de Bromofenol	2,50 mg
Sacarose	400,0 mg
Tampão TE	1,0 ml

**LADDER 1 Kb (33 ng/μl):**

Ladder 1 Kb (1 μg/μl)	33,0 μl
Tampão de carregamento	167,0 μl
Tampão TE	800,0 μl

**ANEXO 7 – Quantificação de DNA****Quantificação em gel de agarose:**

1. Preparar um gel de agarose 0,8% em tampão TBE;
2. Preparar a amostra, adicionando 2 μl de tampão de carregamento a 5 μl da amostra de DNA;
3. Aplicar 3 padrões de DNA λ no gel, nas quantidades de 50 ng/μl, 100 ng/μl e 200 ng/μl;
4. Aplicar as amostras de DNA no gel;
5. Correr as amostras em eletroforese horizontal de gel submarino a ± 120 V por 20 a 30 min;
6. Visualizar as amostras em transluminador UV (T 2202 Sigma Chemical Company);
7. Determinar a quantidade de DNA presentes nas amostras pela comparação da intensidade das bandas de DNA λ padrão com as bandas de DNA genômico.

**Quantificação por Fluorímetro (Hoefer ® Dyna Quant 200):**

1. preparar a solução de leitura e solução de DNA padrão (*Calf thymus*);
2. Zerar o instrumento, colocando 2 ml da solução de leitura na cubeta, colocar no aparelho e pressionar <ZERO>;
3. Calibrar o instrumento, colocando 2 μl da solução de DNA padrão (*Calf thymus*) em 2 ml da solução de leitura na cubeta, agitar bem e pressionar <CALIB>, digitar o valor 100 e pressionar <ENTER>;
4. Zerar o instrumento novamente;
5. Medir a amostra, adicionando 2 μ de amostra e agitando bem, depois colocar no aparelho e fazer a leitura;
6. Medir as amostras subsequentes, repetindo os passos 4 e 5 a cada amostra.

Solução de leitura (0,1 µg/ml H33258 em TNE 1X):

Solução estoque H33258	10,0 µl
Tampão TNE 10X	10,0 ml
Água filtrada e destilada	90,0 ml

DNA padrão [diluir 1:10 (100µg/ml) de 1 mg/ml da solução estoque padrão]:

DNA estoque padrão	100 µl
Tampão TNE 10X	100 µl
Água destilada	800 µl

Tampão TNE 10X:

Tris (100 mM)	12,11 g
EDTA Na.2H <sub>2</sub> O (10 mM)	3,72 g
NaCl (2 M)	116,89 g
Água destilada	Completar para 1 litro
Ajustar pH para 7,4 com HCl concentrado.	

## ANEXO 8 – Dados primários

### 1. Micropropagação pelo sistema Convencional

Acesso 7 NV

Implantação 21/05/98

Avaliação 22/07/98

PBZ (µM)	Tamanho	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Soma	Taxa
0	< 1 cm	11	9	7	28	10	15	5	12	10	19	126	3,15
	1 a 2 cm	10	5	11	5	22	11	19	12	23	5	123	3,075
	> 2 cm	-	4	-	-	-	-	-	4	-	-	8	0,2
	<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>33</b>	<b>32</b>	<b>26</b>	<b>24</b>	<b>28</b>	<b>33</b>	<b>24</b>	<b>257</b>	<b>6,425</b>
3	< 1 cm	11	18	15	26	8	32	19	16	26	17	188	4,7
	1 a 2 cm	-	-	-	4	9	-	-	4	-	-	17	0,425
	> 2 cm	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	0,025
	<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>18</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>17</b>	<b>32</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>26</b>	<b>17</b>	<b>206</b>	<b>5,15</b>
6	< 1 cm	17	20	21	38	22	17	15	27	27	9	213	5,325
	1 a 2 cm	3	-	3	-	-	3	4	-	-	17	30	0,75
	> 2 cm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>38</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>243</b>	<b>6,075</b>

Experimento com 4 explantes por vidro

## 2. Micropropagação por Imersão Temporária

1ª Repetição

Implantação 08/12/98

Avaliação 10/02/98

Tratamento	Classe					Total	Taxa de multiplicação
	0 a 1 cm	1 a 2 cm	2 a 3 cm	3 a 4 cm	> 4 cm		
<b>P0G0</b>	238	26	9	1	1	275	34,375
<b>P0G3</b>	404	339	66	13	2	824	103
<b>P3G0</b>	448	63	17	1	0	529	66,125
<b>P3G3</b>	426	269	21	3	0	719	89,875
<b>P6G0</b>	1839	79	5	2	0	1925	240,625
<b>P6G3</b>	714	421	48	6	0	1189	148,625
<b>Total/classe</b>	4069	1197	166	26	3	5461	113,77083

\*avaliação do número de brotos por tratamento

oito explantes por frasco

2ª Repetição

Implantação 15/02/99

Avaliação 29/04/99

Tratamento	Classe					Total	Taxa de multiplicação
	0 a 1 cm	1 a 2 cm	2 a 3 cm	3 a 4 cm	> 4 cm		
<b>P0G0</b>	557	43	17	3	1	621	77,625
<b>P0G3</b>	500	317	67	52	9	945	118,125
<b>P3G0</b>	1001	129	23	10	2	1165	145,625
<b>P3G3</b>	587	152	51	14	8	812	101,5
<b>P6G0</b>	958	156	51	12	7	1184	148
<b>P6G3</b>	1045	403	93	23	8	1572	196,5
<b>Total/classe</b>	4648	1200	302	114	35	6299	131,22917

\*avaliação do número de brotos por tratamento

oito explantes por frasco

## 3. Indução a Embriogênese Somática – 1º Experimento

Avaliação: 28/04/98

Data indução: 05/02/98

Acesso: 9CAS

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Med	%	Observação
dic0 K0	0	0	0	0	0	0	1 broto
dic0 K2	0	0	1	0	0,25	5	1 broto
dic2,5 K0	0	0	1	0	0,25	5	raízes
dic2,5 K2	2	2	0	3	1,75	35	massa celular escura
dic5 K0	5	3	1	0	2,25	45	massa celular escura e raízes
dic5 K2	2	2	3	2	2,25	45	massa celular escura
dicamba						22,5	
P0 K0	0	0	0	0	0	0	nada
P0 K2	0	1	1	1	0,75	15	células + ou - friáveis
P2,5 K0	2	1	1	0	1	20	massas celulares claras e escuras
P2,5 K2	0	0	0	0	0	0	2 brotos
P5 K0	1	2	0	1	1	20	massas celulares claras
P5 K2	1	2	2	3	2	40	células + friáveis
Picloram						15,833	
D0 K0	0	0	0	0	0	0	1 broto
D0 K2	0	0	0	0	0	0	2 broto
D2,5 K0	0	0	0	0	0	0	1 broto
D2,5 K2	0	0	0	0	0	0	raízes
D5 K0	0	1	0	0	0,25	5	raízes
D5 K2	1	3	0	0	1	20	massas celulares muito escuras
2,4-D						4,1667	

Obs.: 5 exp./ repetição

\* Número de explantes com formação de massa celular(0-5)

## 4. Indução a Embriogênese Somática – 2º Experimento

Indução: 23/06/98 Avaliação: 17/08/98 Acesso: 9CAS

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Total	%	Observação
zero	0	0	X	X	0	0	nada
K2	0	0	0	0	0	0	nada
dic5 K0	5	5	5	3	18	90	massa celular branca e compacta
dic5 K2	1	2	5	4	12	60	pequena massa celular branca ou marrom
dic10 K0	3	3	4	5	15	75	massa celular branca e compacta
dic10 K2	3	4	4	1	12	60	pequena massa celular branca e compacta
P5 K0	5	3	3	1	12	60	pequena quantidade
P5 K2	0	4	4	2	10	50	pequena quantidade
P10 K0	3	3	3	2	11	55	pequena quantidade
P10 K2	5	4	1	2	12	60	pequena quantidade
T5 K0	1	1	3	X	5	33,33	formação arredondada e com muitas raízes
T5 K2	1	3	3	3	10	50	formação arredondada e brancas
T10 K0	1	3	0	X	4	26,67	pequena quantidade
T10 K2	1	1	4	0	6	30	pequena quantidade

Obs.: 5 exp./ repetição

\* Número de explantes com formação de massa celular(0-5)

## 5. Indução a Embriogênese Somática – 3º Experimento

Indução: 09/10/98 Avaliação: 09/12/98 Acesso: 9CAS

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Total	%	Observação
zero	0	0	0	0	0	0	nada
K2	0	0	0	0	0	0	nada
dic5 K0	3	3	3	0	9	45	células branca-amareladas
dic5 K2	3	1	2	3	9	45	células escurecidas e mais compactas
dic10 K0	3	2	3	1	9	45	células branca-amareladas
dic10 K2	3	3	2	2	10	50	células branca-amareladas
P5 K0	2	4	2	1	9	45	células branca-amareladas nas nervuras
P5 K2	0	0	2	1	3	15	poucas células
P10 K0	0	0	0	1	1	5	células branca-amareladas nas nervuras
P10 K2	1	2	1	1	5	25	células amareladas ou escurecidas
T5 K0	1	1	2	4	8	40	poucas células, amareladas e com raízes
T5 K2	3	2	2	4	11	55	poucas células, amareladas e com raízes
T10 K0	2	2	2	2	8	40	poucas células, amareladas e com raízes
T10 K2	1	1	1	1	4	20	células amareladas ou escurecidas, e compactas

Obs.: 5 explantes por repetição

\* Número de explantes com formação de massa celular (0-5)

Indução: 13/10/98 Avaliação: 09/12/98 Acesso: 8NV

Tratamento	R1	R2	R3	R4	Total	%	Observação
zero	0	0	0	0	0	0	nada
K2	0	0	0	0	0	0	nada
dic5 K0	2	2	1	1	6	30	poucas células branco-amareladas e compactas
dic5 K2	0	0	1	X	1	6,67	poucas células
dic10 K0	2	0	1	1	4	20	poucas células amareladas e compactas
dic10 K2	0	0	0	0	0	0	entumecimento na base foliar
P5 K0	0	X	X	X	0	0	nada
P5 K2	2	2	0	1	5	25	células amareladas e compactas
P10 K0	X	X	X	X	X	X	contaminou tudo
P10 K2	0	3	1	2	6	30	células amareladas e compactas
T5 K0	0	0	0	0	0	0	nada
T5 K2	1	0	1	1	3	15	poucas células, compactas e escuras
T10 K0	2	2	0	3	7	35	poucas células, compactas e escuras
T10 K2	0	0	0	1	1	5	poucas células

Obs.: 5 explantes por repetição

\* Número de explantes com formação de massa celular (0-5)

6. Ocorrência de variantes somaclonais nos experimentos de micropropagação avaliados por eletroforese de isoenzimas (os números se referem a planta variante).

Sistemas	Convencional			Imersão temporária					
	P0	P3	P6	T1	T2	T3	T4	T5	T6
PGI	67	-	-	-	60	67	-	-	31
PGM	-	-	-	-	-	-	-	52	-
PRX	65	-	-	-	-	-	-	-	-
MDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	2	0	0	0	1	1	0	1	1
Nº de plantas avaliadas	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Percentagem	2,00	0	0	0	1,00	1,00	0	1,00	1,00

7. Ocorrência de variantes somaclonais nos experimentos de micropropagação avaliados por RAPDs (os números se referem a planta variante).

Primers	Convencional			Imersão temporária					
	P0	P3	P6	T1	T2	T3	T4	T5	T6
OPA 9	19; 52	67; 69	48	-	24	-	-	35	39; 63
OPA 10	19	13	51	46	67; 94	-	-	-	10
OPA 11	24; 54; 91	37	57; 59	-	-	-	-	-	65
OPA 13	4; 6; 8	59	26; 33; 38; 51	46	67	-	-	-	-
GAG	-	-	-	46	-	7	71	49	-
CTG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GATA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	8	5	7	1	3	1	1	2	4
Nº de plantas avaliadas	94	83	89	20	80	27	44	33	34
Percentagem	8,51	6,02	7,87	5,00	3,75	3,70	2,27	6,06	11,76