

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Ramon Felipe Scherer

INOVAÇÕES EM SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO ABACAXIZEIRO (*ANANAS COMOSUS* VAR. *COMOSUS*) E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VARIEDADES CRIOULAS DO ESTADO DE SANTA CATARINA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra

Florianópolis

2011

Dedico aos meus pais,
Flávio Antônio Scherer e Berta Rieg Scherer
e ofereço a toda minha família,
todos aqueles que foram, que são e que serão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, por possibilitar a realização do mestrado.

Ao Professor Doutor Miguel Pedro Guerra pela orientação, formação, ensinamentos e oportunidades proporcionadas.

Ao Professor Doutor Lírio Luiz Dal Vesco e ao Doutor Douglas André Steinmacher pelas “não oficiais” co-orientações; e pelas contribuições na formação e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Charles Roland Clement pela contribuição na formação e ensinamentos.

A Doutora Paula Ângelo e ao doutorando Alisson Nazareno pela colaboração.

Aos professores do PPG em Recursos Genéticos Vegetais, principalmente àqueles que contribuíram diretamente na formação: Professores Rubens Onofre Nodari, Maurício Sedrez dos Reis e Alexandre Magno Sebbenn, além dos professores Miguel Pedro Guerra e Charles Roland Clement que já foram citados.

À secretária do PPG em Recursos Genéticos Vegetais Bernadete Ribas.

Aos antigos técnicos do LFDGV, Maria Luisa Peixoto e Marcelo Borghezán e à atual Bióloga do laboratório Camila Martins Pimentel.

À todos integrantes, e ex integrantes do LFDGV, principalmente Alan, Aline, Ana, Antônio, Bruna, Caio, Camila Cordeiro, Camila Junkes, Carol, Clarissa, Crhistian, Cristina, Cristina Santos, Daniel, Denise, Diogo, Dorival, Fernando André, Francine, Gustavo, Henrique, Hugo, Josiane, Leila, Lin, Maria Luiza, Morgana, Mathias, Neusa, Paulo, Rafael, Regina, Ricardo, Sarah, Tiago Montagna, Tiago, Vanessa, Vinícius, Vitor e Yohan.

À Capes (MEC) pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares, principalmente minha mãe e meu pai, Berta Rieg Scherer e Flávio Antônio Scherer, as minhas irmãs Vanessa e Rebeca e à minha noiva Marina, pelo incentivo e apoio.

À Deus e pelas forças do bem que me guiaram, iluminaram, inspiraram e contribuíram para que eu alcançasse os resultados almejados no mestrado.

“Cuide dos meios. O fim cuidará de si mesmo”
Mahatma Gandhi
(1869 – 1948)

RESUMO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma espécie domesticada no norte da América do Sul, a partir da espécie selvagem *A. comosus* var. *ananassoides*. No período anterior a conquista a espécie já estava dispersa por toda América Tropical e parte da Subtropical, configurando uma planta de grande importância social para os grupos humanos. Após o contato com os europeus o abacaxizeiro foi disperso pelo globo, e hoje se configura como uma das frutas tropicais de maior importância econômica mundial. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, tendo como principal consumidor o próprio mercado interno, mesmo apresentando um baixo consumo *per capita* da espécie. Isto configura um potencial de crescimento da exploração comercial da fruta, tanto no mercado interno como no externo. Em Santa Catarina a baixa produção de abacaxi, aliada ao consumo médio *per capita* da espécie maior que o nacional, tornam a revitalização do cultivo uma potencial oportunidade para a agricultura catarinense. Porém, para revitalizar o cultivo, os agricultores devem ter acesso a mudas de alto valor genético e isentas de pragas e doenças. A presente dissertação objetivou a caracterização genética de 29 genótipos presentes na coleção de germoplasma do CCA/UFSC, através de 7 marcadores microssatélites. Os acessos conservados na coleção são, em geral, genótipos locais do estado de Santa Catarina, configurando-se de grande importância genética regional. Nesta abordagem foi possível adaptar com sucesso um protocolo de extração de DNA genômico, extraído de partes de folhas basais de plantas adultas (aproximadamente 0,5g), obtendo-se em média 3750 ng de DNA genômico para cada acesso, concentrados em 75 µL de solução estoque. Porém, entre os loci estudados o maior polimorfismo encontrado foi de 27,58%, o maior número de alelos foi 4, o máximo número efetivo de alelos foi de 1,597 e foi encontrado 3 alelos raros, sendo que dois deles em um mesmo locus. Isto configura baixo poder de informação, impossibilitando a análise da distância genética e índices de variabilidade genética. A abordagem quanto a qualidade fitossanitária se deu por meio da elaboração de um protocolo de alta performance de micropropagação de abacaxizeiro baseado em culturas nodulares associadas a sistemas de imersão temporária. O protocolo foi dividido em indução e multiplicação de culturas nodulares, regeneração de microbrotos, crescimento à brotos e aclimatização. Os explantes utilizados foram bases foliares retiradas de brotos desenvolvidos *in*

vitro. A melhor combinação de fitorreguladores para a indução de culturas nodulares foi 2 μM de ANA e 8 μM de 2-iP. Para a multiplicação de culturas nodulares a combinação que gerou os melhores resultados foi a de 2 μM de ANA e 2 μM de BAP em sistema de imersão temporária por meio de frascos duplos. Esta mesma combinação de fitorreguladores mostrou-se eficiente para a regeneração de microbrotos, porém, utilizando-se sistema de imersão temporária em frascos RITA[®]. Posteriormente, em sistema de imersão permanente, o crescimento de microbrotos foi mais adequado em meio de cultura contendo 10 μM de AG₃. Brotos acima de 2 cm foram aclimatizados com sucesso em substrato composto por mistura (1:1) de casca de arroz carbonizada e Plantmax[®] HT, com uma porcentagem de sobrevivência superior a 92%.

Palavras chaves: *Ananas comosus* var. *comosus*, coleção de germoplasma, extração de DNA, caracterização genética, marcadores microssatélites, micropropagação, culturas nodulares, alta eficiência regenerativa.

ABSTRACT

The pineapple (*A. comosus* var. *comosus*) is a domesticated species in northern South America, from the wild species *A. comosus* var. *ananassoides*. In the years before the conquest of America the pineapple was already dispersed throughout of Tropical America and part of Subtropical, setting up a plant of great social importance to human groups. After contact with European, pineapple was scattered across the globe, and today is configured as a tropical fruit of greater importance economic worldwide. Brazil is one of the largest producers of pineapple, with the internal market as the main consumer, even with a low *per capita* consumption of the specie. This sets a growth potential of commercial of the fruit, both the internal and external market. In Santa Catarina state the low production of pineapples, along with the average *per capita* consumption of the specie greater than the country, transform the cultivation in the one potential opportunity for agriculture in Santa Catarina. However, to revitalize the cultivation, farmers should have access to seedlings of high genetic value and free of pests and diseases. This dissertation addressed the genetic quality through genetic characterization of 29 genotypes present in the germplasm collection of the CCA / UFSC, by 7 microsatellite markers. The accessions preserved in the collection are, in general, local genotypes of the state of Santa Catarina, becoming an important genetic bank regional. In this approach it was possible to successfully adapt a protocol for extracting genomic DNA extracted from parts of basal leaves of mature plants (approximately 0.5 g), yielding an average of 3750 ng of genomic DNA for each access, stocked in 75 mL of concentrated solution. However, among the loci studied it was found maximum polymorphism of 27.58%, the highest number of alleles was 4, the maximum effective number of alleles was 1.597 and it was found three rare alleles, two of them in the same locus. This sets a low power of information, thus difficulting a more precise analysis of genetic distance and levels of genetic variability. The approach for sanitary quality was achieved through the development of a high performance protocol of micropropagation, based in nodules cultures associated with temporary immersion systems. The protocol was divided into induction and multiplication of nodules cultures, regeneration of microshoots, growth of shoots and acclimatization. The explants were removed from leaf bases of shoots grown *in vitro*. The best combination of growth regulators to induce nodules cultures was 2 μ M of NAA and 8 μ M of 2-iP. For

multiplication of nodules cultures the combination that yielded the best results was the 2 μM of NAA and 2 μM of BAP in temporary immersion system through dual flasks. This same combination of growth regulators was efficient for the regeneration of microshoots, however, using a system of temporary immersion RITA[®]. Thereafter, growth of microshoots was enhanced in culture medium containing 10 μM GA₃ in permanent immersion system. Shoots larger than 2 cm were successfully acclimatized in substrates by mixing (1:1) of carbonized rice hull and Plantmax[®] HT, with a survival rate above 92%.

Key words: *Ananas comosus* var. *comosus*, germplasm collection, DNA extraction, genetic characterization, microsatellite markers, micropropagation, nodules clusters, high regenerative efficiency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do abacaxizeiro na América do Sul.....	28
Figura 2. Biorreatores de imersão temporária	33
Figura 3. Gel de agarose (0,8%) utilizado para quantificação do DNA do abacaxizeiro.....	48
Figura 4. Indução de culturas nodulares de abacaxizeiro	64
Figura 5. Multiplicação de culturas nodulares de abacaxizeiro em biorreatores de imersão temporária por frascos duplos.....	65
Figura 6. Multiplicação de culturas <i>in vitro</i> de abacaxizeiro sob diferentes sistemas de imersão	67
Figura 7. Alongamento de microbrotos de abacaxizeiro em sistema de imersão permanente e aclimatização.....	70
Figura 8. Protocolo de micropropagação de abacaxizeiro de alta eficiência baseado em culturas nodulares e biorreatores de imersão temporária	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Acessos de abacaxizeiro presentes na coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC	44
Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados para caracterizar geneticamente os genótipos da coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC.....	46
Tabela 3. Caracterização genética da coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC.....	49
Tabela 4. Taxa de indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de abacaxizeiro em resposta à combinação e concentração dos fitorreguladores ANA e BAP após 4 semanas de desenvolvimento <i>in vitro</i>	62
Tabela 5. Taxa de indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de abacaxizeiro em resposta à combinação e concentração dos fitorreguladores ANA e 2-iP após 4 semanas de desenvolvimento <i>in vitro</i>	62
Tabela 6. Efeito de diferentes combinações e concentrações dos fitorreguladores ANA e BAP na taxa proliferativa ((peso final – peso inicial)/peso inicial) e nos aspectos morfogênicos de culturas nodulares de abacaxizeiro em sistema de imersão temporária de frascos duplos após 4 semanas em cultura.....	64
Tabela 7. Efeito dos diferentes sistemas de imersão (sistema de imersão temporária em frascos duplos (SIT-FD), em aparatos RITA [®] (SIT-RITA) e sistema de imersão permanente (SIP)) na taxa proliferativa ((peso final – peso inicial)/peso inicial) de culturas vegetais em meio com formulação salina MS suplementado 3% de sacarose, 2 µM de ANA e 2 µM de BAP após 4 semanas em cultura	65
Tabela 8. Efeito dos diferentes sistemas de imersão (sistema de imersão temporária em frascos duplos (SIT-FD), em aparatos RITA [®] (SIT-RITA) e sistema de imersão permanente (SIP)) no número de unidades individuais por grama de cultura vegetal em meio com formulação salina MS suplementado 3% de sacarose, 2 µM de ANA e 2 µM de BAP, após 4 semanas em cultura	68
Tabela 9. Eficiência de diferentes concentrações de AG ₃ em promover o alongamento de microbrotos de abacaxizeiro em frasco de imersão permanente a brotos maiores que 4 cm após 8 semanas em cultura	68

Tabela 10. Eficiência da aclimatização de diferentes classes de altura de brotos de abacaxizeiro em substrato constituído por Plantmax[®] HT, após 4 semanas71

Tabela 11. Eficiência da aclimatização de diferentes classes de altura de brotos de abacaxizeiro em substrato constituído por mistura (1:1) de Plantmax[®] HT e casca de arroz carbonizada, após 4 semanas71

LISTA DE ABREVIATURAS

2-iP - N⁶ (2-isopentil) adenina
ANA – Ácido α -naftaleno acético
ANOVA – Análise de variância
AG₃ – Ácido giberélico
BAP – 6 – Benzilaminopurina
BAG – Banco ativo de germoplasma
CCA – Centro de Ciências Agrárias
CTAB – Brometo de cetiltrimetilamonio
CIA – clorofórmio:álcool isoamílico
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP – desoxiribonucleotídeos trifosfato
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
MS – formulação salina de Murashige e Skoog (1962)
PCR – Reação em cadeia da polimerase
SNK – teste de Student-Newman-Keuls
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. HIPÓTESES	25
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5. CAPÍTULO I: ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA	27
5.1. Qualidade Genética.....	30
5.2. Qualidade Fitossanitária	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
7. CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIRO DA UFSC POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	41
7.1. Introdução.....	42
7.2. Material e métodos	44
7.2.1. <i>Material vegetal</i>	44
7.2.2. <i>Extração de DNA</i>	45
7.2.3. <i>Genotipagem</i>	46
7.3. Resultados.....	48
7.3.1. <i>Extração de DNA</i>	48
7.3.2. <i>Genotipagem</i>	48
7.4. Discussão	50
7.5. Conclusões.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

9. CAPÍTULO III: ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE ALTA PERFORMANCE PARA ABACAXIZEIRO, BASEADO NA INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS NODULARES COM O USO DE BIORRETORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA	55
9.1. Introdução.....	56
9.2. Material e métodos	58
9.2.1. <i>Efeito de diferente fitorreguladores na indução de culturas nodulares</i>	58
9.2.2. <i>Multiplificação de culturas nodulares em biorreatores de imersão temporária</i>	59
9.2.3. <i>Alongamento de microbrotos</i>	60
9.2.4. <i>Aclimatização</i>	61
9.3. Resultados	62
9.3.1. <i>Indução de culturas nodulares</i>	62
9.3.2. <i>Multiplificação de culturas nodulares</i>	64
9.3.3. <i>Alongamento de microbrotos</i>	68
9.3.4. <i>Aclimatização das plântulas</i>	71
9.4. Discussão.....	72
9.5. Conclusões.....	76
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma planta domesticada a partir da espécie selvagem *A. comosus* var. *ananassoides* no norte da América do Sul (COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009). Entre sua domesticação e a conquista do continente americano no século XV esta espécie foi dispersa por toda América tropical e parte da subtropical. Tão logo houve o contato da espécie com os europeus já houve o interesse de comercializar a fruta com a Europa, primeiramente com o envio da fruta e da planta e depois com o encurtamento das rotas comerciais por meio de plantios fora das Américas (LOUDON, 1822; PATIÑO, 2002).

Hoje o abacaxi destaca-se no mercado global como uma das frutas de maior importância econômica, e o Brasil encontra-se entre os maiores produtores do mundo, com produção nacional voltada, em sua grande maioria, para o mercado interno (REINHARDT & RODRIGUEZ, 2009; FAO). Segundo Villela et al. (2005), o consumo *per capita* de abacaxi no Brasil vem diminuindo nas últimas décadas, e é hoje muito menor que o registrado na Europa e EUA (GUEDES et al., 2008), configurando um grande mercado potencial para a fruta. Em Santa Catarina, a baixa produção de abacaxi ante a nacional, devido a redução da produção dessa espécie a partir da década de 70 (GUERRA et al., 1999), aliada ao elevado consumo da fruta no estado (CEASA, 2006), tornam a revitalização do cultivo uma potencial oportunidade para a agricultura catarinense. Porém, para revitalizar o cultivo, os agricultores devem ter acesso a mudas de alto valor genético, isentas de pragas e doenças e a genótipos adaptados a região específica de plantio.

A presente dissertação se relaciona com estes tópicos ao propor a avaliação da diversidade genética da coleção de germoplasma do CCA/UFSC, composta principalmente por variedades crioulas da espécie, por meio de marcadores microssatélites; e o emprego de biotecnologias apropriadas à micropropagação massal de abacaxizeiro por meio da rota morfogênética de culturas nodulares associada ao emprego de biorreatores de imersão temporária.

Com o desenvolvimento das duas temáticas busca-se a possibilidade de produzir em um pequeno espaço de tempo, área reduzida e baixo custo, um grande número de mudas de genótipos de interesse, bem como estabelecer estratégias eficientes para a

conservação e melhoramento genético de genótipos adaptados ao sul do Brasil.

O presente trabalho foi organizado na forma de capítulos, onde o primeiro capítulo descreve os aspectos básicos relacionados aos recursos genéticos de abacaxi e sua distribuição, bem como alguns fatores relacionados à cultura *in vitro* e a situação do problema. No segundo capítulo descreve-se a caracterização genética, baseada em marcadores microssatélites, de variedades crioulas de abacaxi do estado de Santa Catarina. Por fim, o terceiro capítulo descreve o desenvolvimento de um sistema regenerativo de alta performance baseado na indução de culturas nodulares e seu desenvolvimento em biorreatores de imersão temporária.

2. HIPÓTESES

Marcadores microssatélites são ferramentas úteis para a análise da diversidade genética do abacaxizeiro; assim como o estabelecimento de um protocolo de multiplicação desta espécie baseado em culturas nodulares associadas a sistemas de imersão temporária se configura como uma técnica de alta eficiência regenerativa *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Descrever o contexto histórico e atual da cultura do abacaxizeiro, avaliar a diversidade genética de variedades crioulas catarinenses por meio de marcadores microssatélites e estabelecer um protocolo de micropropagação *in vitro* de alta capacidade regenerativa, baseado na indução e desenvolvimento de culturas nodulares.

3.2. *Objetivos específicos*

- a. Descrever o processo histórico da origem, domesticação e situação atual da cultura do abacaxizeiro.
- b. Avaliar a diversidade genética da coleção de germoplasma de *A. comosus* var. *comosus* do CCA/UFSC, por meio de marcadores microssatélites.
- c. Estabelecer um protocolo de indução e multiplicação de culturas nodulares, e regeneração e aclimatização de brotos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ceasa. Centrais de abastecimento do estado de Santa Catarina. Abacaxi. São José: CEASA, 2006.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Duval, M. F. The Domestication of Pineapple: Context and Hypotheses. Issue No. 16 Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science July, 2009.
- Fao. Faostat crops. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acessado em: 5 de fevereiro de 2011.
- Guedes, B. L. B; Manzano, L. M; Perosa, J. M. Y. Prospecção de mercado externo do abacaxi “IAC gomo-de-mel” In: XX Congresso de Fruticultura 54th International Meeting of the interamerican society for Tropical Horticulture, Vitória E.S., 2008.
- Guerra, M. P; Dal Vesco, L. L; Pescador, R; Schuelter A. R; Nodari R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34: 1557-1563, 1999.
- Loudon, J. C. The different modes of cultivating the pineapple, from its first introduction Europa to the late improvements of T. A. Knight Esq. Houlgman Hurst Resome Brown, London, 1822.
- Patiño, V. M. Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Geotrópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Asofrucol y Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. Publicación CIAT 326, Cali, Colombia, 2002.
- Reinhardt, A; Rodriguez, L. V. Industrial Processing of Pineapple – Trends and Perspectives. Acta Hort. 822, ISHS 2009.
- Villela, P. S; Castro, C. W; Avellar, S. O. C. Análise da oferta e da demanda de frutas selecionadas no Brasil para o decênio 2006/2015, 2005. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/arquivos>>. Acessado em: 30 de maio de 2009.

5. CAPÍTULO I: ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA

O abacaxizeiro (*Ananas comosu* var. *comosus*) pertence à família Bromeliaceae, sub-família Bromelioideae. O gênero *Ananas* é composto por duas espécies, *A. macrodontes* e *A. comosus*. Dentro da espécie *A. comosus* há cinco variedades botânicas: *ananassoides*, *parguazensis*, *erectifolius*, *bracteatus* e *comosus*, sendo que o abacaxizeiro para produção de frutos refere-se a *A. comosus* var. *comosus* (COPPENS D'EECKENBRUGGE e LEAL, 2003; COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009).

O centro de origem de domesticação do abacaxizeiro foi proposto por Bertoni (1919) como sendo a região central da América do Sul, hipótese esta reforçada por Vavilov (1951) e Collins (1960) e aceita posteriormente por Purseglove (1972), Pickersgill (1976) e Sauer (1993). Porém, em períodos posteriores ao contato europeu, alguns exploradores e naturalistas já consideravam o norte da América do Sul como o “berço” do abacaxizeiro cultivado. Assim, Brücher (1971) considerou a região das Guianas como o centro de domesticação. No entanto, todas essas hipóteses basearam-se basicamente em observações morfológicas e/ou botânicas (COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009; LEAL e ANTONI, 1981; PATIÑO, 2002).

A partir de expedições de pesquisa para o norte da América do Sul, principalmente Venezuela, Brasil e Guiana Francesa, realizadas nas duas últimas décadas do século XX, pode-se ampliar o conhecimento sobre esta espécie por meio de informações morfológicas, bioquímicas, moleculares e geográficas. Com isso foram propostos dois grandes centros de diversidade ao norte da América do Sul; um deles no oeste Amazônico e outro no Escudo das Guianas, sendo o último apontado como o mais provável centro de origem de domesticação do abacaxizeiro cultivado (Figura 1). Além da área geográfica onde se iniciou a co-evolução entre o abacaxizeiro e o homem, essas pesquisas também apontaram que a variedade selvagem *Ananas comosus* var. *ananassoides* foi o ancestral do abacaxizeiro (COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009).

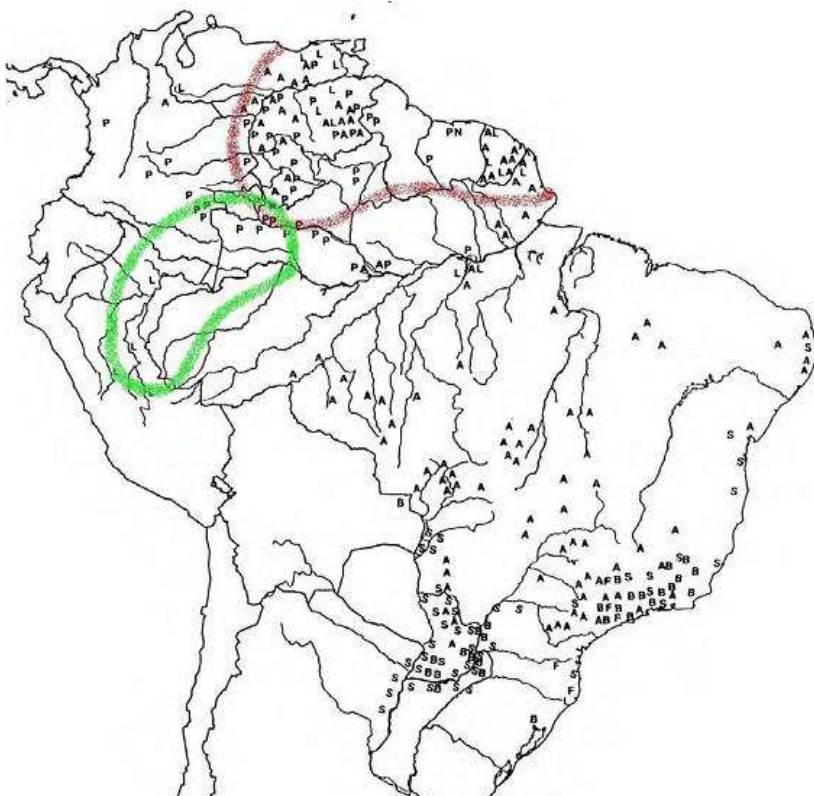


Figura 1. Distribuição do abacaxizeiro na América do Sul; com o centro primário de domesticação (bordas marrons) e o centro secundário de diversidade (bordas verdes). Fonte: COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009.

Quando europeus chegaram à América no final do século XV, esta espécie já havia passado por um processo acentuado de domesticação, e estava dispersa por grande parte da América intertropical, indo do sul do México ao Rio da Prata no sentido norte-sul, do oceano Pacífico ao Atlântico no sentido oeste-leste e do nível do mar às encostas andinas no plano vertical. As principais razões para explicar tal distribuição se relacionam com a facilidade com que a planta pode ser propagada, sua resistência a desidratação e a possibilidade de produção de bebida fermentada a partir da infrutescência (PATIÑO, 2002). Nesse sentido, Coppens D'Eeckenbrugge e Duval (2009) e

Clement et al. (2010) sugeriram que a reprodução basicamente assexuada, combinada com essa ampla adaptação a diferentes ambientes, aliada a evidências do início da agricultura na região amazônica no final do pleistoceno para outras espécies, servem de evidências robustas para se propor que o início da domesticação do abacaxizeiro tenha ocorrido entre 6.000 e 10.000 anos atrás.

O período pré-conquista europeu marcou um momento em que culturalmente o cultivo do abacaxizeiro exercia importante papel em muitas sociedades indígenas. Mesmo com o processo genocida praticado contra os nativos, hoje ainda é possível registrar o abacaxi sendo cultuado com reverências e festas por alguns povos (COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009). Como resultado da dinâmica pré-conquista, temos hoje o Brasil como maior centro de diversidade genética do abacaxizeiro.

O primeiro contato do abacaxizeiro com o europeu ocorreu em 1493 através do explorador Cristóvão Colombo, e o interesse europeu pelo abacaxi foi imediato. Tanto que nas primeiras décadas após Colombo ter conhecido a espécie, ela já havia sido dispersa para outras zonas tropicais do mundo, porém, dificilmente a fruta chegava em quantidades consideráveis ao mercado europeu. Por isso entre os séculos XVII e XVIII, o abacaxizeiro foi cultivado na Europa em sistemas de cultivos protegidos, principalmente na Rússia, Alemanha, França, Holanda e Itália. Esses cultivos cessaram a partir do momento que abacaxis começaram a chegar ao continente em boas condições de consumo, por meio do envio da planta inteira, vindas das Américas (LOUDON, 1822; PATIÑO, 2002). Esse processo foi substituído pelo encurtamento da rota comercial através de plantios, na ilha de Açores para abastecer o mercado europeu; e Florida, Bahamas, Porto Rico e Cuba para suprir o mercado norte americano. Após a segunda-guerra os plantios comerciais já estavam disperso pelo globo (ROHRBACH et al., 2003). A FAO acompanha desde a década de 60 a produção, produtividade, e área plantada de abacaxizeiro no mundo, e desde que esse acompanhamento começou o Brasil sempre se encontra entre os maiores produtores mundiais de abacaxi, sendo que a produção nacional é, em sua grande maioria, consumida pelo mercado interno. Atualmente os maiores exportadores são a Costa Rica, Tailândia, Filipinas, Indonésia e Costa do Marfim, que se destacam nas exportações do fruto “in natura” ou processados (REINHARDT e RODRIGUEZ, 2009; FAO).

O consumo *per capita* de abacaxi no Brasil que já foi de 2,9

Kg/hab/ano em 1987, diminuiu para 1,0 Kg/hab/ano em 1996 e para 0,8 Kg/hab/ano em 2003 (VILLELA et al., 2005). Esses dados apontam um baixo consumo atual, representando um grande mercado a ser explorado, quando se toma como base o consumo *per capita* norte americano e de países europeus como, por exemplo, o da Holanda que é de 7,4 Kg/hab/ano (GUEDES et al., 2008). Em Santa Catarina a oportunidade do mercado dessa fruta fica mais evidente uma vez que a sua produção vem diminuindo progressivamente desde a década de 70, principalmente devido à doença fúngica conhecida como gomose (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinationans*) em conjunto com a praga broca dos frutos (*Thecla basalides*) (GUERRA et al., 1999). Diferentemente, em nível nacional, a produção teve crescimento médio de 5,65% ao ano entre 1990 e 2003 (VILLELA et al., 2005). Além disso, um dos produtos mais vendidos na Central de abastecimento do estado de Santa Catarina S.A. (CEASA/SC) é o abacaxi, sendo que parte irrisória é fornecida pelo próprio estado (CEASA, 2006). Ou seja, o estado de Santa Catarina é um grande consumidor da fruta, porém não é um grande produtor, o que transforma a revitalização do cultivo no estado uma oportunidade de renda com mercado já estabelecido aos agricultores catarinenses. Porém, para isso é necessário que os produtores tenham acesso a plantas de alta qualidade genética e fitossanitária.

5.1. Qualidade Genética

Estudos associados à genética molecular em plantas podem ser empregados para responder questionamentos históricos, tais como aqueles relacionados aos centros de origem, de diversidade, domesticação, filogenia e evolução de espécies (DOEBLEY et al., 2006; EMSHWILLER, 2006; SCHULTE et al., 2009; COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009). Da mesma forma, podem ser gerados dados relevantes para programas de conservação, seleção e/ou melhoramento (BIANCHI et al., 2004).

Estudos auxiliados por genética molecular em abacaxizeiro têm sido baseados no emprego de marcadores AFLP, RAPD, RFLP e isoenzimas, proporcionando avanços consideráveis no conhecimento geral da espécie, de cunho biológico, agrônomico e histórico (LEAL e COPPENS D'EECKENBRUGGE, 1996; DUVAL et al., 1997; COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 1997; DUVAL et al., 2001; COPPENS D'EECKENBRUGGE e LEAL, 2003; DUVAL et al., 2003;

CARLIER et al., 2004; COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009). Além desses aspectos gerais, com os marcadores citados também foi possível a realização de estudos específicos, tais como a comparação de diversidade genética entre genótipos de interesse (RUAS et al., 1995; PEREIRA e KERR, 2001; GOTTARDI et al., 2001; TAPIA et al., 2005) e estudos associados à ocorrência de variação somaclonal (FEUSER, 2000). Nesse sentido, Kinsual e Kumar (2007) identificaram e testaram 19 iniciadores de marcadores microssatélites polimórficos para o abacaxizeiro.

Marcadores microssatélites são uma classe de marcadores moleculares que se configuram como uma ferramenta robusta para avaliar diferenças entre genótipos, uma vez que são codominantes, com natureza neutra do fragmento, com capacidade de apresentar alto polimorfismo e com facilidade de detecção via PCR. Além disso, após a obtenção de microssatélites polimórficos, os custos da utilização desses marcadores reduzem-se drasticamente (BUSO et al., 2003).

O conhecimento da diversidade genética entre indivíduos permite inferir classes de parentescos que podem ser utilizadas para programas de melhoramento genético, de seleção de indivíduos e de caracterização genética do grupo de plantas estudadas. Essas informações são relevantes para o estabelecimento de um banco de germoplasma, o qual é definido como sendo uma coleção de genótipos que é rotineiramente usada para propósito de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização de materiais (EMBRAPA).

O Centro de Ciências Agrárias da UFSC mantém na Fazenda Experimental da Ressacada uma coleção de germoplasma de abacaxizeiro com ênfase às variedades crioulas do estado de Santa Catarina. Além desta coleção se constituir importante fonte de recurso genético da espécie para o estado, representando acesso imediato de genótipos adaptados à diferentes regiões catarinenses, ela pode prover indivíduos para trabalhos de melhoramento genético, caracterização genética e seleção de acessos para o plantio, combinando a adaptação local com as principais características buscadas pelos melhoristas. Essas características segundo Cabral et al. (1997) são: resistência à gomose (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*), crescimento rápido, folhas sem espinhos ou com poucos espinhos, rebentão precoce, fruto cilíndrico, polpa e casca amarela, polpa pouco fibrosa, elevado teor de sólidos solúveis totais (Brix maior que 16°), acidez moderada e alta concentração de ácido ascórbico. Adicionalmente, acessos crioulos podem servir de base para seleção de material que produza em

ambientes degradados, em solos salinizados, em regiões com períodos de seca, entre outros.

5.2. *Qualidade Fitossanitária*

Por meio de ferramentas biotecnológicas é possível produzir milhares de mudas de abacaxizeiro isentas de pragas e doenças em um pequeno espaço de tempo, a partir de uma só gema (PASQUAL et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2001). A micropropagação, ou propagação *in vitro*, possibilita essas características e atualmente existem numerosos protocolos de micropropagação para o abacaxizeiro. Porém, em geral, o custo da muda micropropagada não a torna competitiva perante a convencional (BE e DEBERGH, 2006). Segundo Teixeira et al. (2001) o custo da muda de abacaxizeiro micropropagada *in vitro* é cerca de 5 a 10 vezes superior que a muda convencional. Isso faz com que as biofábricas produzam, em geral, mudas de abacaxizeiro para suprir apenas lavouras matrizes, e não o plantio comercial. Entretanto, os estudos de Dal Vesco e Guerra (2010) e Dal Vesco (2010) mostraram um novo sistema de multiplicação *in vitro* de bromélias, baseado na indução de culturas nodulares, que aparenta ser mais eficiente economicamente que o sistema de organogênese convencional.

Culturas nodulares são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde clara e de textura friável ou levemente compacta, que se assemelham a culturas embriogênicas, mas que se apresentam basicamente compostas por aglomerados meristemáticos (DAL VESCO e GUERRA, 2010). O potencial de multiplicação de culturas nodulares é superior ao da organogênese convencional, alcançando índices similares aos observados na embriogênese somática, com a vantagem de que a conversão de culturas nodulares à brotos é muito mais simples do que a conversão de embriões somáticos, se assemelhando a organogênese (GUERRA e DAL VESCO, 2010; DAL VESCO e GUERRA, 2010). No entanto, pouco é conhecido sobre as bases morfo-histológicas que diferenciam a formação das culturas nodulares da formação de embriões somáticos. De qualquer forma, o uso desta rota regenerativa vem se destacando por sua alta eficiência em diversas espécies, especialmente de bromélias (RECH Filho et al., 2005, 2009; ALVES et al., 2006; DAL VESCO e GUERRA, 2010; DAL VESCO, 2010). Em abacaxizeiro alguns trabalhos representam experimentos básicos de indução de culturas nodulares com posteriores regenerações em sistema de imersão permanente, sem explorar a multiplicação com o objetivo direto de

produção massal (WAKASA et al., 1978; TENG, 1997; DOLGOV et al., 1998; SRIPAORAYA et al., 2003; FIROSABADY e MOY, 2004).

Outra ferramenta que proporciona aumentar a eficiência da produção de mudas *in vitro* encontra-se associada aos biorreatores de imersão temporária. Esta tecnologia possibilita uma maior taxa de multiplicação, menor necessidade de mão de obra, utilização de meio de cultura líquido e assim, pode reduzir os custos de produção das mudas (SILVA et al., 2007; RECH FILHO et al., 2005; FEUSER, 2000; STEINMACHER et al., *in press*). Além disto, segundo Feuser (2000) o sistema de imersão temporária resulta em uma menor taxa de variação somaclonal quando comparado ao sistema convencional de micropropagação. Existem diferentes sistemas de imersão temporária, porém todos seguem o mesmo princípio, ou seja, contato das culturas vegetais com o meio de cultura por períodos temporários a uma frequência pré-determinada. No presente estudo utilizou-se os sistemas de frascos duplos idealizado por Escalona et al. (1999) e o sistema RITA[®] desenvolvido por Teisson e Alvard (1995) (Figura 2).

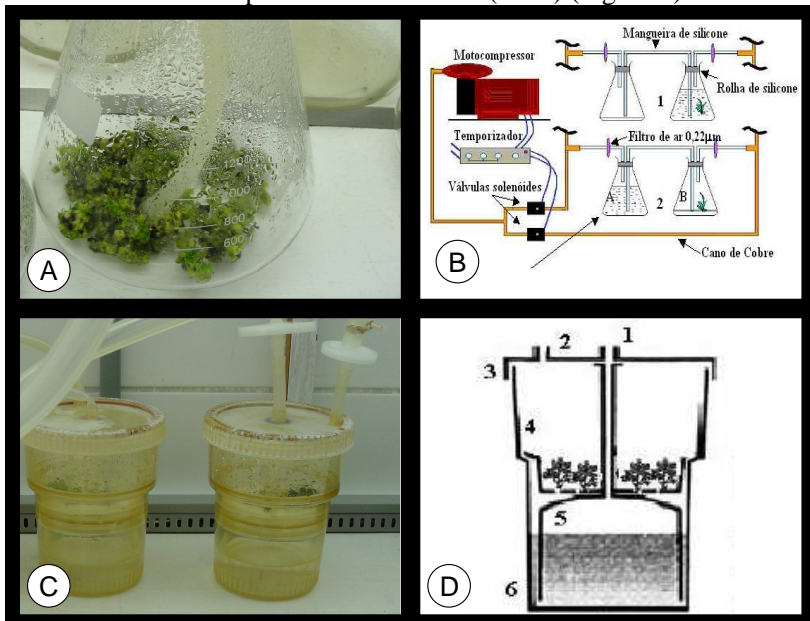


Figura 2. Biorreatores de imersão temporária. A- Frasco de erlenmeyer em sistema de imersão temporária em frascos duplos; B – Mecanismo de funcionamento de sistema de imersão temporária por frascos duplos; C – Aparatos RITA[®] em imersão temporária; D – Mecanismo de funcionamento de

sistema de imersão temporária por aparatos RITA[®] (legenda: 1 entrada de ar, 2 saída de ar; 3 tampa de vedação, 4 câmara de crescimento, 5 base interna, 6 base do aparato). Adaptado de Feuser (2000) e Scheidt et al. (2009).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, G. M; Dal Vesco, L. L; Guerra, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*. V. 110, 204-207, 2006.
- Be, L. V; Debergh, P. C. Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*). *South African J. Bot.*, 72: 191-194, 2006.
- Bertoni, M. S. Contributions a l'étude botanique des plantes cultivees. I. Essai d'une monographie du enre Ananas. *Anales Cientificos Paraguayos (Ser.II)*: 4, 250-322, 1919.
- Bianchi, V. J; Fachinello, J. C; Schuch, M. W; Sansavini, S. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. *Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal*, v.26, n. 3, 2004.
- Brücher, H. Zur Widerlegung von Vavilovs geographisch-botanischer Differentialmethode. *Erdkunde* 25:20–36, 1971.
- Buso, G. S. C; Ciampi, A. Y; Moretzsohn, M. C; Amaral, Z. P. S; Brondani, R. V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.7, p.46-50, 2003.
- Cabral, J. R. S; Souza, J. S; Ferreira, F. R. Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro, 1997. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/abacaxi.pdf>> Acessado em: 8 de fevereiro de 2011.
- Carrier, J. D; Reis, A; Duval, M. F; Coppens D'Eeckenbrugge, G. C; Leitao, J. M. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. *Plant Breeding* 123:186–192, 2004.
- Ceasa. Centrais de abastecimento do estado de Santa Catarina. Abacaxi. São José: CEASA, 2006.
- Clement, C. R; De Cristo-Araújo, M; Coppens D'Eeckenbrugge, G; Pereira, A. A; Picanço-Rodrigues, D. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity* ^{JCR}, v. 2, p. 72-106, 2010.

- Collins, J. L. The Pineapple: Botany, Cultivation and Utilization. Interscience Publishers, New York, 1960.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Duval, M. F. The Domestication of Pineapple: Context and Hypotheses. Issue No. 16, Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science July, 2009.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Leal, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: Bartholomew, D. P.; Paull, R. E.; Rohrbach, K. G. (Ed.) The pineapple: Botany, production and uses. New York: CAB International, p.13-32, 2003.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Leal, F; Duval, M. F. Germplasm resources of pineapple. Horticultural reviews 21, 133-175, 1997.
- Dal Vesco, L. L; Guerra, M. P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. Scientia Horticulturae ^{JCR}, v. 125, p. 748-755, 2010.
- Dal Vesco, L. L. Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal. Dissertação (Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, SC. 70p, 2010.
- Doebley, J; Gaut, B; Smith, B. The molecular genetics of domestication. Cell 127: 1309-21, 2006.
- Dolgov, S. V; Shushkova, T. V; Firsov, A. P. Pineapple (*Ananas comosus* Merr.) regeneration from leaf explants. In: Drew, R. A., ed. Proc. of the Int. Symp. on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. Acta Hort. 461:439-444; 1998.
- Duval, M.-F; Buso, G. C; Ferreira, F. R; Bianchetti, L. de B; Coppens D'Eeckenbrugge, G; Hamon, P; Ferreira, M. E. Relationships in *Ananas* and other related genera using chloroplast DNA restriction site variation. Genome 46: 990-1004, 2003.
- Duval, M.-F; Coppens D'Eeckenbrugge, G; Ferreira, F. R; Cabral, J. R. S; Bianchetti, L. de B. First results from joint EMBRAPA-CIRAD *Ananas* germplasm collecting in Brazil and French Guyana. Acta Hort. 425:137-144, 1997.
- Duval, M. F; Noyer, J. L; Perrier, X; Coppens D'Eeckenbrugge G;

- Hamon, P. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and applied genetics*, 102 (1) : 83-90, 2001.
- Embrapa. Glossário de recursos genéticos Cenargen. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/glossario/c.html>>. Acessado em: 8 de fevereiro de 2011.
- Emshwiller, E. Genetic data and plant domestication. In: Zeder, M. A.; Bradley, D. G.; Emshwiller, E.; Smith, B. D. *Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms*, Eds.; University of California Press: Berkeley, California, USA, pp. 99-122, 2006.
- Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; Gonzalez, B. L.; Daquinta, M.; Gonzalez, J. L.; Desjardins, Y.; Borroto, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant cell, Reports*, 18: 743-748, 1999.
- Fao. Faostat crops. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acessado em: 5 de fevereiro de 2011.
- Feuser, S. Micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores moleculares. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, SC. 70p, 2000.
- Firozabady, E.; Moy, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40: 67-74, 2004.
- Gottardi, M. V. C.; Lemos, E. G. M.; Ruggiero, C. Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cv Smooth Cayenne utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.23, n.3, p.463-467, 2001.
- Guedes, B. L. B.; Manzano, L. M.; Perosa, J. M. Y. Prospecção de mercado externo do abacaxi “IAC gomo-de-mel” In: XX Congresso de Fruticultura 54th International Meeting of the interamerican society for Tropical Horticulture, Vitória E.S., 2008.
- Guerra, M. P.; Dal Vesco, L. L.; Pescador, R.; Schuelter A. R.; Nodari R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*

34: 1557-1563, 1999.

- Guerra, M. P; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In.: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press-Springer, v.589, pp.47-66, 2010.
- Kinsual, M; Kumar, S. V. Polymorphic microsatellite and cryptic simple repeat sequence markers in pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus*). Molecular Ecology Notes 7, 1032–1035, 2007.
- Leal, F; Antoni, M. G. Especies del género *Ananas*: origen y distribución geográfica. Rev Fac Agron, Universidad Central de Venezuela, 29:5-12, 1981.
- Leal, F; Coppens D'Eeckenbrugge, G. Pineapple. In: Janick, J; Moore, J. N. ed. Fruit breeding tree and tropical fruits. New York. John Willey, v. 1, cap. 9, p. 515-557, 1996.
- Loudon, J. C. The different modes of cultivating the pineapple , from its first introduction Europa to the late improvements of T. A. Knight Esq. Houlgman Hurst Resome Brown, London, 1822.
- Pasqual, M; Moreira, M. A; Anjos Sobrinho, A. dos. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.
- Patiño, V. M. Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Geotrópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Asofrucol y Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. Publicación CIAT 326, Cali, Colombia, 2002.
- Pereira, C. D; Kerr, W. E. Divergência Genética entre Doze Genótipos de Abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) estimada por Análise de Marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.23, p.335-338 , 2001.
- Pickersgill, B. Pineapple. *Ananas comosus* (Bromeliaceae). In Evolution of crop plants, edited by N. W. Simmonds, pp 14-18, Longman, London, 1976.
- Purseglove, J. W. Tropical crops: monocotyledons, Vol. 1. Londres, Longman Group Limited. P. 334, 1972.

- Rech Filho, A; Dal Vesco, L. L; Guerra, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. *Cien. Rural* 39 (3), 909912, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008005000088.
- Rech Filho, A; Dal Vesco, L. L; Nodari, R. O; Lischka, R. W; Müller, C. V; Guerra, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiv. Cons.*4, 1799-180, 2005.
- Reinhardt, A; Rodriguez, L. V. Industrial Processing of Pineapple – Trends and Perspectives. *Acta Hort.* 822, ISHS 2009.
- Rohrbach, K. G; Leal, F; Coppens D’eeckenbrugge, G. History, Distribution and World Production. In: Bartholomew, D. P.; Paull, R. E.; Rohrbach, K. G. (Ed.) *The pineapple: Botany, production and uses*. New York: CAB International, p.1-12, 2003.
- Ruas, P. M; Ruas, C. F; Fairbanks, D. J; Andersen, W. R; Cabral, J. R. S. Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Brazilian Journal of Genetics*, 18: 413-416, 1995.
- Sauer, J. D. *Historical Geography of Crop Plants*. CRC Press; Boca Raton, FL. pp73-80, 1993.
- Scheidt, G. N; Arakaki, A. H; Chimilovski, J. S; Portella, A. C. F; Spier, M. R; Woiciechowski, A. L; Biasi, L. A; Soccol, C. R. Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. *Braz. arch. biol. technol.* [online]. vol.52, n.spe, pp. 37-43. ISSN 1516-8913, 2009, doi: 10.1590/S1516-89132009000700005.
- Schulte, K; Barfuss, M. H. J; Zizka, G. Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51 (2), pp. 327-339, 2009.
- Silva, A. B. da; Pasqual, M; Teixeira, J. B; De Araújo, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(9): 1257-1260, 2007.
- Sripaoraya, S; Marchant, R; Power, J. B; Davey, M. R. Plant

- regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol.*, Plant 39, 450—454, 2003.
- Steinmacher, D. A; Guerra, M. P; Saare-Surminski, K; Lieberei, R. Temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, in press.
- Tapia, C. E; Gutiérrez, E. M. A; Guillén, A. H; Warbourton, L. M; Uriza, A. D; Rebolledo, M. A. Characterization of pineapple germplasm (*Ananas spp*) by mean AFLPs. *Proc. IVth IS on Pineapple, Acta Hort 666, ISHS, 2005.*
- Teisson, C; Alvard, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi, M; Cella, R; Falavigna, A. (eds). *Current issues in plant molecular and cellular biology.* Kluwer academic Publ, Dordrecht, 105-109, 1995.
- Teixeira, J; Cruz, A. R. R; Ferreira, F. R; Cabral, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia ciência e Desenvolvimento, Brasília, v.3, p.42-47, 2001.*
- Teng, W. L. An alternative propagation method of *Ananas comosus* through nodule culture. *Plant Cell Rep.* 16, 454-457, 1997.
- Vavilov, N. I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. Start. *Chron. Bot.* 13:1-366, 1951.
- Villela, P. S; Castro, C. W; Avellar, S. O. C. Análise da oferta e da demanda de frutas selecionadas no Brasil para o decênio 2006/2015, 2005. Disponível em: <www.faesbr.org.br/arquivos>. Acessado em: 30 de maio de 2009.
- Wakasa, K; Koga, Y; Kudo, M. Differentiation from in vitro culture of *Ananas comosus*. *Jap. J. Breed.* 28:113–121, 1978.

7. CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DE ABACAXIZEIRO DA UFSC POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Resumo

A abacaxicultura comercial está baseada em uma estreita base genética devido à utilização de poucos grupos genéticos. Isto ameaça a toda cadeia de mercado envolvida com a espécie uma vez que torna os plantios comerciais com a espécie vulneráveis a pragas, doenças e outros problemas. A utilização da maior diversidade genética possível dentro dos grupos utilizados comercialmente, aliada à conservação genética daqueles genótipos não explorados comercialmente configuram em uma estratégia que possibilita a produção, o melhoramento e a conservação de recursos genéticos da espécie. Isto se torna possível com a formação de bancos de germoplasma, conservando tanto genótipos comerciais quanto não comerciais. A UFSC mantém uma coleção de genótipos de abacaxizeiro na Fazenda Experimental da Ressacada, com o principal objetivo em conservar genótipos de uso potencial para o estado de Santa Catarina. Realizou-se no presente estudo uma caracterização genética dos genótipos pertencentes à referida coleção. O DNA genômico foi extraído, com sucesso, de partes de folhas basais (aproximadamente 0,5g) de plantas adultas utilizando-se um protocolo de extração simplificado. Para cada genótipo foi extraído em média 3750 ng de DNA genômico, concentrado em 75 μ L de solução estoque. A caracterização genética foi realizada por meio de sete iniciadores de marcadores microssatélites. Entre os loci estudados o maior polimorfismo encontrado foi de 27,58%, o maior número de alelos foi 4, o máximo número efetivo de alelos foi de 1,597 e foi encontrado 3 alelos raros, sendo que dois deles em um mesmo locus. Isto configura baixo poder de informação, impossibilitando a análise da distância genética e índices de variabilidade genética.

Palavras chaves: Coleção de germoplasma, *Ananas comosus* var. *comosus*, extração de DNA, caracterização genética e marcadores microssatélites.

Abreviaturas: DNA – Ácido Desoxiribonucleico; CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio; CIA – clorofórmio:álcool isoamílico; dNTP – desoxiribonucleotídeos trifosfato.

Abstract

The commercial cultivation of pineapple is based on a narrow genetic basis because the use of a few genetic groups. This threatens the entire market since the commercial cultivation make this species vulnerable to pests, diseases and other problems. The use of the higher genetic diversity possible within the commercial groups, combined with the genetic conservation of genotypes that are not exploited commercially is a strategy that enables the production, improvement and conservation of genetic resources of this species. This is possible when associated to the establishment of germplasm collections of both, commercial and noncommercial genotypes. The UFSC establishment a germplasm collection in the Fazenda Experimental da Ressacada, Florianópolis, Santa Catarina state, with the main objective to preserve genotypes of potential use for the state of Santa Catarina. This study aimed at the genetic characterization of genotypes belonging to that collection. Genomic DNA was extracted successfully in parts of basal leaves (approximately 0.5 g) of adult plants using a simplified extraction protocol. For each genotype an average of 3750 ng DNA was extracted, concentrated in 75 μ L of stock solution. Genetic characterization was performed using seven microsatellite markers. The highest polymorphism was 27.58%, and 4 different alleles were found, the maximum effective number of alleles was 1.597 and it was found three rare alleles, two of them in the same locus. The low informative capacity of the microsatellite markers used did not allow the analysis of genetic distance and levels of genetic variability in the studied pineapple population.

Keywords: Germplasm collection, *Ananas comosus* var. *comosus*, DNA extraction, genetic characterization and microsatellite markers.

Abbreviations: DNA –Deoxyribonucleic acid; CTAB – Cetyl trimethyl ammonium bromide; CIA – chloroform:alcohol isoamlic; dNTP – Desoxiribonucleotide triphosphate.

7.1. Introdução

O Brasil apresenta o maior centro de diversidade mundial do abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*), que teve o início de sua domesticação no Escudo das Guianas, seguida de dispersão pela América (PATIÑO, 2002; COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009). Hoje, o abacaxi é uma das frutas tropicais mais

consumidas mundialmente, sendo que a abacaxicultura mundial está baseada nos grupos: Cayenne, Queen, Pérola, Perolera, Singapore Spanish e Española Roja, enquanto outros grupos apresentam importância isolada em regiões específicas. Smooth Cayenne representa mais de 70% de toda produção mundial, e, com exceção do Brasil, que cultiva em mais de 80% variedades do grupo Pérola, os outros principais países produtores quando não cultivam Smooth Cayenne, cultivam, em geral, variedades dos grupos Queen, Sinagapore Spanish ou Española Roja (COPPENS D'EECKENBRUGGE et al., 1997; ROHRBACH et al., 2003; MATOS e REINHARDT, 2009; REINHARDT e RODRIGUES, 2009).

Considerando a hegemonia da variedade Smooth Cayenne na produção comercial mundial, pode-se sugerir que a cadeia produtiva envolvida nessa atividade esteja vulnerável a problemas como pandemias, baixa adaptação a mudanças ambientais, entre outros, que este grupo possa desenvolver. O Brasil, mesmo com grande diversidade genética da espécie, também está sujeito a problemas similares, já que mais de 80% da produção nacional está baseada no grupo Pérola. Porém é possível minimizar os problemas da utilização de poucos grupos, explorando a máxima diversidade possível desses. Segundo Gottardi et al. (2001) a variedade Smooth Cayenne é composta por uma série de clones, porém uma maior variabilidade genética é encontrada na variedade Pérola. Conhecer a variabilidade genética dentro desses grupos possibilita desenvolver estratégias de seleção, produção e melhoramento aliada a manutenção da diversidade existente. Não menos importante é a conservação genética da espécie em geral, por meio dos diversos grupos e acessos existentes, conhecendo a variabilidade genética dentro dos grupos e a distância genética entre eles.

Estudos prévios utilizando os marcadores moleculares (principalmente AFLP, RAPD e isoenzimas) mostram a eficiência da genética molecular em detectar variação genética entre indivíduos de abacaxizeiro (RUAS et al., 1995; PEREIRA e KERR, 2001; GOTTARDI et al., 2001; TAPIA et al., 2005). Nesse aspecto, marcadores microssatélites para a espécie, estabelecidos por Kinsual e Kumar (2007), podem constituir uma opção mais robusta para a investigação da diversidade genética na espécie. Isto porque marcadores microssatélites apresentam características ideais como: codominância, natureza neutra do fragmento, capacidade de apresentar alto polimorfismo, especificidade e facilidade de detecção via PCR. Além disso, após a obtenção de microssatélites polimórficos, os custos da

utilização desses marcadores reduzem-se drasticamente (BUSO et al., 2003). Estas características os tornam mais informativos que os outros marcadores citados.

Nesse capítulo objetivou-se estudar a variabilidade genética da coleção de germoplasma de abacaxizeiro da Universidade Federal de Santa Catarina por meio de marcadores microssatélites.

7.2. Material e métodos

7.2.1. Material vegetal

Amostras dos genótipos representados na coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC (Tabela 1) foram coletadas a campo e armazenadas no LFDGV em freezer a -80 °C. Para o processo de extração de DNA utilizou-se partes de folhas basais de plantas adultas dos abacaxizeiros.

Tabela 1. Acessos de abacaxizeiro presentes na coleção de germoplasma do CCA/UFSC, localizado na Fazenda da Ressacada, Florianópolis, Santa Catarina, que foram utilizados para caracterização por marcadores microssatélites.

Nome	Fonte	Grupo
7nvza	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
ab1	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
ab2	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Acr	Acre (EPAGRI)	
Amarelo	Santa Catarina (UFSC)	
Armazen	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Bel	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Camb	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Cej	Santa Catarina (EPAGRI)	
Cx	Santa Catarina (UFSC)	
Del	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
f1	Desconhecido	Pérola
f2	Desconhecida	Pérola
Gua	Santa Catarina (UFSC)	
Jag	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Jsg	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Lag	Santa Catarina (UFSC)	Pérola

Nv	Santa Catarina (UFSC)	Pérola
Pl	Santa Catarina (UFSC)	Pérola
Pne	Nordeste	Pérola
pr>	Santa Catarina (UFSC)	Pérola
Pr	Santa Catarina (UFSC)	Pérola
Sjs	Santa Catarina (UFSC)	Pérola
Smt1	Desconhecido	Cayenne
Smt2	Desconhecido	Cayenne
Ta	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola
Tb	Santa Catarina(EPAGRI)	Pérola
Tu	Santa Catarina (UFSC)	Pérola
Uruss	Santa Catarina (EPAGRI)	Pérola

7.2.2. *Extração de DNA*

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo adaptado de Stefenon et al. (2004), utilizando aproximadamente 0,5 g de tecido foliar de plantas adultas. Após a maceração acrescentou-se ao material 2 mL, por amostra, de solução de extração CTAB 2% (2% cetiltrimetilamonio; 0,7 M NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8.0 e 1% 2-mercaptoetanol), encubando-as a 60°C por um período entre 40 min a 1h e 20 min, com agitações freqüentes, e logo após esse período adicionou-se 0,6 mL cloroformio:álcool isoamilico (CIA) (24:1), seguido de centrifugação a 13000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Após o primeiro processo de centrifugação, coletou-se o sobrenadante e adicionou-se cerca de 1/10 do seu volume com CTAB 10%. Após homogeneizar a mistura, acrescentou-se 0,6 mL de CIA (24:1), invertendo-se a solução por 3 minutos, seguida centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos. Após a segunda centrifugação retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para um tubo de 1,5 mL. Para a precipitação do DNA adicionou-se 2/3 equivalente ao volume da amostra, de isopropanol a -20 °C. As amostras foram armazenadas a -20 °C, por no mínimo 1h em freezer. Após esse período elas foram centrifugadas a 7000 rpm durante 10 minutos. Feita a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, e acrescentou-se 1 mL de etanol absoluto ao precipitado, acondicionando o material em freezer a -20°C por no mínimo 10 min, e centrifugando em seguida a 8000 rpm por 10 min. Em seguida descartou-se novamente o sobrenadante e deixou-se o precipitado secar em câmara de fluxo laminar. Após seco o precipitado,

adicionou-se 75 μL de TrisEDTA+RNase (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase), encubando as amostras a 37°C durante uma hora, e posteriormente armazenando-as em freezer a -20°C até o uso. A quantificação de DNA foi realizada através de gel de agarose 0,8% em Tris base 0,1 M, Ácido bórico anidro 0,09 M, $\text{Na}_2\text{EDTA}2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (TBE 1 X), comparando as amostras com padrões de peso lambda (λ) de 10, 50 e 100 pares de bases (pb).

7.2.3. Genotipagem

A solução de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi composta de 3 μL de solução de trabalho de DNA (10 ng/ μL), 1 μL (3 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$) de cada iniciador (direto e reverso), 0,2 μL de Taq polimerase Fermentas[®] (5 U/ μL), 0,6 μL de MgCl (25 μM), 0,8 μL de dNTP (10 mM), 1 μL de Tampão de Cloreto de Potássio (10 X), e 2,4 μL de H_2O , constituindo 10 μL . Os iniciadores utilizados foram selecionados do grupo de iniciadores estabelecidos por Kinsual e Kumar (2007), buscando de preferência aqueles mais polimórficos, porém no início dos trabalhos escolheu-se aleatoriamente (Tabela 2).

As soluções de PCR foram realizadas em Termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) utilizando a seguinte metodologia: 94 °C de desnaturação por 5', 33 ciclos de 94°C durante 30'', temperatura de anelamento (T_m , Tabela 10) durante 30'' e 72 °C por mais 30'', seguida de extensão final a 72°C durante 5'.

Utilizou-se a técnica da eletroforese para separar os fragmentos amplificados sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 6%, seguindo o protocolo de Creste et al. (2001). Aos fragmentos amplificados adicionou-se 3 μL de tampão desnaturante, constituído de solução de 95% de Formamida, 10 mM de NaOH, 12,5% de sacarose, 0,05% de xileno cianol e 0,05% de azul de bromofenol. O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação ao marcador de 10 pb (InvitrogenTM), que variava de 10 pb à 320 pb.

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados para caracterizar geneticamente os genótipos da coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC. Para cada locus apresenta-se o nome (locus), o motif repetido (microssatélite), os iniciadores direto (F) e reverso (R) (iniciadores), a temperatura de anelamento (T_m °C), o número de alelos (n° de alelos), a heterozigosidade observada (Ho) e a esperada (He), e o número de acesso ao banco de genes (n° de acesso ao banco de genes).

Locus	Micros satélite	Iniciadores	Tamanho esperado (pb)	Tm °C	Nº de alelos	Ho	He	Nº de acesso ao banco de genes
ACL R179 C	(CT) ₁₀	F:GTCGC ACCTCTC TCTCTCT C R:CCGAG TTATTTT GCCGATT	284	56	2	0,98 71	0,50 15	DQ019 851
ACL R776 B	(CT) ₄ (CT) ₄	F:AGTAA TCGGCGG CGTGTC R:GGAGG GCGAGA GAGAGA G	220	47	2	0,97 58	0,53 05	AY551 308
ACP CT13 6B	(GAC) ₇	F:GGGTC CGAGTG GAGAGA TTC R:TCGTG CAGTGTT TCGCTTA G	128	58	3	1,0	0,62 68	DQ356 283
ACP CT12 4B	(CTTC TC) ₃	F:GGGGG AGGGGTT GTTACC R:GAGCA GCAGGA GAAGGA GA	193	58	4	0,22 73	0,32 04	DQ356 280
ACP CT65 1B	(GAA) ₁ 3	F:CAGTG TATTGGA GGGGGA AGA R:AAACG GAAGGA AGGAAG GAA	165	49	4	0,99 43	0,58 11	DQ381 768
ACP CT13 8A	(CTT) ₄ ..(AAG) ₃	F:GACGA GGACCGT ACTCACG A R:ATGGC ATGATCT	161	58	4	0,95 35	0,63 33	DQ768 079

		CGTCCAC						
		T						
ACU	(AC) ₅	F:AGCGG	160	59	3	1,0	0,51	DQ019
MS22		GTTGCTA					27	857
8C		TCAAGAC						
		T						
		R:TGAGC						
		AGTGTGT						
		GTGTGTG						
		TG						

Adaptado de Kinsual e Kumar (2007).

7.3. Resultados

7.3.1. Extração de DNA

Obteve-se em média 3750 ng de DNA a partir de 0,5 g de tecido fresco. Este DNA foi diluído para uma concentração de 50 ng μL^{-1} (Figura 3).

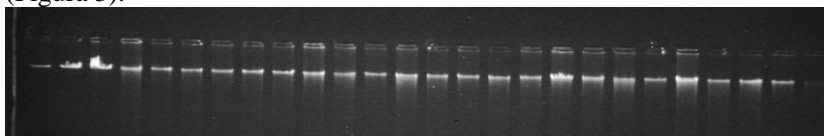


Figura 3. Gel de agarose (0,8%) utilizado para quantificação do DNA do abacaxizeiro; Três primeiras bandas (da esquerda para a direita): lambda de 10, 50 e 100 ng, respectivamente; demais bandas: amostras de DNA de abacaxizeiro.

7.3.2. Genotipagem

Foi possível amplificar sete dos 19 iniciadores de microssatélites por meio dos acessos estudados. Dos sete iniciadores amplificados, três (ACPCT138A, ACPCT136B e ACPCT 124B) foram monomórficos e quatro apresentaram polimorfismo (ACUMS228C, ACPCT651B, ACLR776B e ACLR179C). Considerando apenas os iniciadores polimórficos, o número médio de alelos por locus foi de 2,25. Este número aliado ao pequeno número de locus polimórficos fez com que não fosse possível realizar um estudo confiável de diversidade genética. Por isto, o presente estudo explora apenas as frequências alélicas, porcentagem de locus polimórficos (frequência > 0,05), número efetivo de alelos e número de alelos raros, (frequência < 0,05) (Tabela 3). Nesse

sentido, como valor máximo de polimorfismo entre os lócus encontrou-se 27,58%, porcentagem observada em 3 locus, sendo que as outras porcentagens de polimorfismo foram de 10,34, 3,44 e dois lócus totalmente monomórficos. Quanto ao número de alelos por lócus, observou-se 1 lócus com 4 alelos, 2 locus com 3 alelos, 3 locus com 2 alelos e 1 lócus com apenas 1 alelo. Entretanto o número efetivo de alelos não chegou a 2, variando de 1 a 1,597. Por outro lado, foram detectados 3 alelos raros: 2 no lócus ACLR776B e um no lócus ACPCT136B.

Tabela 3. Caracterização genética da coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC (01, 02, 03 e 04 representam os “alelos” observados”) por meio de sete locus microssatélites. Apresenta-se porcentagem de lócus polimórficos (P%), frequência alélica (Freq.) e número de alelos, número de alelos efetivos e de alelos raros.

Genótip o\Primer	ACLR 776B	ACLR 179B	ACPC T651B	ACPC T124B	ACPC T138A	ACUM S228C	ACPC T136B
7nvza *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
ab1 *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
ab2 *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Acr ***	0202	0404	0202	0102	0101	0202	0102
Amarelo	0102	0404	0102	0102	0101	0102	0103
Armazen							
*	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Bel *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Camb *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Cej	0102	0203	0102	0102	0101	0202	0102
Cx	0102	0103	0102	0102	0101	0202	0102
Del *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
f1	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
f2	0203	0304	0102	0102	0101	0202	0102
Gua	0102	0103	0102	0102	0101	0202	0102
Jag *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Jsg *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Lag *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Nv *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Pl *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Pne *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
pr> *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Pr *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102

Sjs *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Smt1 **	0102	0303	0202	0102	0101	0202	0102
Smt2 **	0102	0303	0202	0102	0101	0202	0102
Ta *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Tb *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102
Tu	0102	0203	0102	0102	0101	0202	0102
Uruss *	0203	0304	0102	0102	0101	0102	0102

P(%)	27,58	27,58	10,34	0	0	27,58	3,44
------	-------	-------	-------	---	---	-------	------

Freq.:							
01	0,121	0,034	0,448	0,5	1	0,362	0,5
02	0,517	0,034	0,552	0,5	-	0,638	0,483
03	0,362	0,5	-	-	-	-	0,017
04	-	0,431	-	-	-	-	-

Nº de alelos	3	4	2	2	1	2	3
--------------	---	---	---	---	---	---	---

Nº efetivo de alelos	1,597	1,572	1,503	1,509	1	1,47	1,526
----------------------	-------	-------	-------	-------	---	------	-------

Nº de alelos raros	0	2	0	0	0	0	1
--------------------	---	---	---	---	---	---	---

* Grupo Pérola

** Grupo Smoth Cayenne

*** Grupo oeste amazônico (sem espinho)

7.4. Discussão

O protocolo adaptado de Stefenon et al. (2004) foi eficiente para a obtenção de DNA de abacaxizeiro em quantidade e qualidade suficiente para as análises do presente estudo. Ele possibilitou a extração do DNA de uma maneira simplificada quando se compara aos métodos realizados por Ruas et al. (1995); Gottardi et al. (2001); Pereira e Kerr (2001) e Tapia et al. (2005).

Comparando-se os resultados obtidos no presente estudo com os

apresentados por Kinsual e Kumar (2007) encontrou-se menor número médio de alelos e menor polimorfismo. Esses resultados, aliados à um baixo número efetivo de alelos rejeitam a hipótese de que haveria maior diversidade genética no grupo de plantas conservadas no CCA/UFSC em relação ao grupo de plantas utilizado para caracterizar os marcadores, oriundo da Malásia. Resultados esperados devido o Brasil apresentar a maior diversidade da espécie. Ou seja, enquanto os cultivos presentes na Malásia, segundo Chan et al. (2003) são basicamente dois, Singapore Spanish e um híbrido entre este e Smooth Cayenne, na coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC os genótipos são de diferentes grupos, na sua maioria do grupo Pérola. Com base nestes resultados, sugere-se que ou os iniciadores estudados tem limitado poder de polimorfismo ou a espécie possui um elevado grau de domesticação que tenha conduzido a uma baixa diversidade genética, ou grande parte dos acessos estudados tem origem recente de uma mesma planta mãe.

Porém, a alta diversidade encontrada entre genótipos de abacaxizeiro utilizando isoenzimas, RAPD e AFLP, mesmo se tratando de marcadores de diferente natureza, enfraquecem a hipótese de que a baixa diversidade encontrada seja consequência de uma baixa diversidade genética natural da espécie (RUAS et al., 1995; GOTTARDI et al., 2001; PEREIRA e KERR, 2001; TAPIA et al., 2005).

Segundo Pereira e Kerr (2001) não há correlação entre a variação fenotípica e molecular, entretanto, no presente estudo há uma tendência dos genótipos do grupo pérola apresentarem padrões iguais de genotipagem assim como Smooth Cayenne. Isto pode sugerir que os mesmos podem ser genótipos oriundos de uma mesma planta mãe, ou que os marcadores moleculares estão ligados a pelo menos um gene transcrito. O fato de que, segundo Gottardi et al. (2001), as lavouras de abacaxizeiro são formadas por uma mistura de clones, aliado a tendência de que plantas tropicais em condições subtropicais apresentem maiores taxas de mutação, reforçam a hipótese de que os marcadores estejam ligados a um gene, já que implica que exista não só diversidade entre lavouras, mas também dentro de cada lavoura, dificultando que diferentes cultivos tenham indivíduos com mesma informação genética devido a uma ancestralidade recente comum, o que os resultados obtidos poderiam sugerir. Se a hipótese de que os marcadores utilizados estejam ligados a genes for confirmada, não seria recomendada a utilização desses iniciadores para estudos de diversidade genética, tampouco

poderiam ser considerados marcadores microssatélites, porém os mesmos poderiam ser empregados para finalidade de melhoramento assistido. Porém, é necessário que haja a caracterização da espécie com estes iniciadores utilizando um grupo maior de indivíduos, com maior diversidade aparente, para que se tenham conclusões inequívocas sobre o poder de informação desses loci.

7.5. Conclusões

No presente estudo foi possível adaptar uma metodologia de extração de DNA de abacaxizeiro eficiente para a realização de estudos com marcadores microssatélites. Por outro lado, os marcadores microssatélites utilizados para a caracterização molecular apresentaram baixo polimorfismo, o que impediu estudos de diversidade genética entre os indivíduos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buso, G. S. C.; Ciampi, A. Y.; Moretzsohn, M. C.; Amaral, Z. P. S.; Brondani, R. V. Marcadores Microssatélites em Espécies Vegetais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.7, p.46-50, 2003.
- Chan, Y. K; Coppens D'Eeckenbrugge, G; Sanewski, G. M. Breeding and variety improvement. In: Bartholomew, D. P., Paull, R. E., Rohrbach, K. G. (Ed.) *The pineapple: Botany, production and uses*. New York: CAB International, p.13-32, 2003.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Duval, M. F. The Domestication of Pineapple: Context and Hypotheses. Issue No. 16 Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science July, 2009.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Leal, F; Duval, M. F. Germplasm resources of pineapple. *Horticultural reviews* 21, 133-175, 1997.
- Creste, S; Tulmann Neto, A; Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:1-8, 2001.
- Gottardi, M. V. C; Lemos, E. G. M; Ruggiero, C. Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cv Smooth Cayenne utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.23, n.3, p.463-467, 2001.
- Kinsual, M; Kumar, S. V. Polymorphic microsatellite and cryptic simple repeat sequence markers in pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Molecular Ecology Notes* 7, 1032–1035, 2007.
- Matos, A. P.; Reinhardt, D. H. R. C. Pineapple in Brazil: Characteristics, Research and Perspectives. *Acta Horticulturae*, v. 822, p. 25-36, 2009
- Patiño, V. M. Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Geotrópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Asohfrucol y Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. Publicación CIAT 326, Cali, Colombia, 2002.
- Pereira, C. D; Kerr, W. E. Divergência Genética entre Doze Genótipos

- de Abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merrill) estimada por Análise de Marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.23, p.335-338 , 2001.
- Reinhardt, A; Rodriguez, L. V. Industrial Processing of Pineapple – Trends and Perspectives. Acta Hort. 822, ISHS 2009.
- Rohrbach, K. G; Leal, F; Coppens D’eeckenbrugge, G. History, Distribution and World Production. In: Bartholomew, D. P.; Paull, R. E.; Rohrbach, K. G. (Ed.) The pineapple: Botany, production and uses. New York: CAB International, p.1-12, 2003.
- Ruas, P. M; Ruas, C. F; Fairbanks, D. J; Andersen, W. R; Cabral, J. R. S. Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Brazilian Journal of Genetics, 18: 413-416, 1995.
- Stefenon, V. M; Nodari, R. O; Guerra, M. P. Genética e conservação de *Araucaria angustifolia*: III. Protocolo de extração de DNA e capacidade informativa de marcadores RAPD para análise da diversidade genética em populações naturais. Biotemas. 17, 47-63, 2004.
- Tapia, C. E; Gutiérrez, E. M. A; Guillén, A. H; Warbourton, L. M; Uriza, A. D; Rebolledo, M. A. Characterization of pineapple germplasm (*Ananas spp*) by mean AFLPs. Proc. IVth IS on Pineapple, Acta Hort 666, ISHS, 2005.

9. CAPÍTULO III: ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE ALTA PERFORMANCE PARA ABACAXIZEIRO, BASEADO NA INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS NODULARES COM O USO DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Resumo

Um dos principais gargalos para a agricultura mundial se relaciona com a qualidade das mudas empregadas, o que pode ser sanado com utilização de propágulos de alta qualidade fitossanitária e genética. A cultura *in vitro* possibilita a produção massal de plântulas isentas de pragas e doenças. Protocolos de organogênese convencional vêm produzindo mudas de abacaxizeiro com as qualidades citadas, porém com preços impraticáveis à agricultura, sendo cerca de 5 a 10 vezes superiores as mudas produzidas naturalmente por reprodução assexuada. Nesse sentido estabeleceu-se um protocolo de micropropagação *in vitro* de abacaxizeiro baseado em culturas nodulares e em biorreatores de imersão temporária, alcançando alta eficiência regenerativa. O protocolo foi dividido em indução e multiplicação de culturas nodulares, regeneração de microbrotos, crescimento à brotos e aclimatização. Os explantes utilizados foram bases foliares retiradas de brotos desenvolvidos *in vitro*. A melhor combinação de fitorreguladores para a indução de culturas nodulares foi 2 μM de ANA e 8 μM de 2-iP. Para a multiplicação de culturas nodulares, mantendo uma cultura cíclica, a combinação que gerou os melhores resultados foi a de 2 μM de ANA e 2 μM de BAP em sistema de imersão temporária por meio de frascos duplos. Esta mesma combinação de fitorreguladores mostrou-se eficiente para a regeneração de microbrotos, porém, utilizando-se sistema de imersão temporária em frascos RITA[®]. Posteriormente, em sistema de imersão permanente em meio líquido, o crescimento de microbrotos foi mais adequado em meio de cultura contendo 10 μM de AG₃. Brotos com mais de 2 cm foram aclimatizadas com sucesso em substrato composto por mistura (1:1) de casca de arroz carbonizada e Plantmax[®] HT, com uma porcentagem de sobrevivência superior a 92%.

Palavras chaves: Micropropagação, culturas nodulares, *Ananas comosus* var. *comosus*, alta eficiência regenerativa.

Abreviaturas: 2-iP - N6 (isopentenil) adenina; ANA - Ácido α -naftaleno acético, BAP - 6 - Benzil aminopurina; AG₃ - Ácido giberélico.

Abstract

One of the major bottlenecks in world agriculture is related to the use of high quality phytosanitary plant propagules with desired genetic qualities. *In vitro* tissue culture is one technique that allows mass production of plantlets with these characteristics. However, traditional protocols for *in vitro* regeneration produced high-quality pineapple plantlets, but with prohibitive prices (i.e 5 to 10 times higher than plants naturally produced by asexual reproduction). In this sense, in the present study a protocol for pineapple *in vitro* micropropagation was established based on nodules cluster cultures associated with temporary immersion bioreactors, in order to establishmet an efficient regenerative protocol. The protocol was divided into induction and multiplication of nodules clusters, microshoot regenerations, growth of shoots and plantlet acclimatization. The combination 2 μM NAA and 8 μM 2-iP was superior for the induction of nodule clusters through leaf bases removed from shoots derived of developed *in vitro*. For multiplication of nodule clusters, maintaining a cyclic culture, the best combination was 2 μM NAA plus 2 μM BAP in a dual flasks temporary immersion system. The same combination of growth regulators but with a RITA[®] temporary immersion system was efficient for the regeneration of microshoots. For elongation of the microshoots the use of 10 μM GA₃ in permanent immersion system in liquid medium showed the best results. Plantlets taller than 2 cm had a survival rate of 92% when acclimatized in a substrate composed of a mixture (1:1) of carbonized rice straw and plant max HT[®] in a greenhouse.

Keywords: Micropropagation, nodule clusters, *Ananas comosus* var. *comosus*, high regenerative efficiency.

Abbreviations: 2-iP - N6 (isopentyl) adenine; ANA - α - Naphthaleneacetic; BAP - 6 - Benzylaminopurine; AG₃ - Gibberellic acid.

9.1. Introdução

O abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) é uma bromeliácea domesticada no norte da América do Sul, pertencente à família *Bromeliaceae* e que apresenta grande importância social e econômica para o Brasil (COPPENS D'EECKENBRUGGE e DUVAL, 2009).

Um dos principais gargalos para a agricultura mundial é a

qualidade dos propágulos empregados. Esta qualidade é definida em termos de atributos genéticos e sanitários. Biotecnologias apropriadas configuram-se como ferramentas valiosas para a consecução desses atributos. É comum no plantio convencional do abacaxizeiro ser empregadas mudas infestadas de pragas e/ou doenças. Porém, com o auxílio de ferramentas biotecnológicas é possível produzir elevado número de mudas de abacaxizeiro de alto valor genético e fitossanitário em um pequeno espaço de tempo (PASQUAL et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2001). Entretanto, o custo da muda não a torna competitiva perante a convencional (BE e DEBERGH, 2006). Segundo Teixeira et al. (2001) o custo da muda de abacaxizeiro micropropagada *in vitro* é cerca de 5 a 10 vezes superior a muda convencional. Isto faz com que as biofábricas produzam, em geral, mudas de abacaxizeiro para suprir apenas lavouras matrizes, e não o plantio comercial. Entretanto, um novo sistema de multiplicação *in vitro*, baseado na micropropagação de culturas nodulares e a associação deste com sistemas de imersão temporária pode ser mais eficiente economicamente que o sistema de organogênese convencional, podendo inclusive competir com as mudas produzidas naturalmente a partir da planta.

Culturas nodulares são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde clara e textura friável ou levemente compacta, que se assemelham a culturas embriogenéticas, mas que se apresentam basicamente compostas por aglomerados meristemáticos (GUERRA e DAL VESCO, 2010; DAL VESCO e GUERRA, 2010). O Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética vegetal (LFDGV) do CCA/UFSC vem se destacando no desenvolvimento dessa nova ferramenta biotecnológica para diversas espécies (RECH FILHO et al., 2005, 2009; ALVES et al., 2006, GUERRA e DAL VESCO, 2010; DAL VESCO e GUERRA, 2010; DAL VESCO, 2010). Em abacaxizeiro, existem alguns trabalhos com culturas nodulares, em geral definidas de forma diferente, e que representam experimentos básicos de indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de brotos oriundos de cultivo *in vitro*, com posteriores regenerações (WAKASA, 1978; TENG, 1997; DOLGOV et al., 1998; SRIPAORAYA et al., 2003; FIROSABADY e MOY, 2004).

Existem diferentes sistemas de imersão temporária, porém todos seguem o mesmo princípio, relacionado ao contato das culturas vegetais com o meio de cultura por períodos temporários a uma frequência pré-determinada. Biorreatores de imersão temporária possibilitam uma maior taxa de multiplicação, menor necessidade de mão de obra,

utilização de meio de cultura líquido e assim, pode reduzir os custos de produção das mudas (SILVA et al., 2007; RECH FILHO et al., 2005; FEUSER, 2000; STEINMACHER et al., in press).

O presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo de micropropagação de abacaxizeiro baseado na indução e regeneração de culturas nodulares, associado ao emprego de biorreatores de imersão temporária.

9.2. Material e métodos

Os experimentos, exceto o de aclimatização, foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética vegetal (LFDGV) do CCA/UFSC em sala de crescimento com $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e 16h de luz de intensidade de $40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes frias de luz branca Sylvania®. Utilizando como meio de cultura básico (MSB) sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose e vitamina de Morel (MOREL e WETMORE, 1951), autoclavado por 15 minutos à 1,1atm e 121°C .

Os dados foram avaliados por tabela de contingência, quando eram bivariados; e por Análise de Variância (ANOVA) e separação de médias pelo método Student-Newman-Keuls (SNK), quando contínuos, ambos com 95% de confiabilidade (SOKAL e ROLF 1969).

9.2.1. Efeito de diferente fitorreguladores na indução de culturas nodulares

Utilizou-se como fonte de explantes segmentos de folha contendo a base foliar de *A. comosus* var. *comosus* (acesso “Gua”, Tabela 1) extraídas de brotos jovens cultivados *in vitro* com aproximadamente 2cm de altura. Estes brotos eram cultivados empregando-se o protocolo descrito por Guerra et al. (1999), e a partir deles foram retiradas de 2 a 4 folhas por broto, compreendidas entre a 3ª e 7ª folha, as quais foram cortadas longitudinalmente, formando segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento contendo a base foliar. Estes explantes foram então inoculados em tubos de ensaio (22 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura (MSB) geleificado com 7,2 g/L de agar e com pH aferido para 5,8, contendo como tratamentos diferentes combinações de concentrações de ácido α -naftaleno acético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). As concentrações de ANA foram 0 e $2\mu\text{M}$, e

as concentrações de BAP foram 0, 4, 8, 12 e 16 μM , sendo que todas as combinações entre os dois fitorreguladores foram avaliadas. Um segundo experimento avaliou diferentes concentrações de N6 (2-isopentil) adenina (2-iP) (0, 4, 8, 12 e 16 μM) na presença de 2 μM de ANA, além da testemunha, constituída por meio de cultura isento de fitorreguladores. Em ambos os experimentos, as culturas permaneceram na ausência de luz na primeira semana após a inoculação, sendo posteriormente transferidas às condições luminosas da sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados em ambos estudos. No primeiro experimento houve cinco repetições, sendo que uma unidade experimental foi constituída por 10 tubos de ensaio, e em cada tubo de ensaio foram inoculados dois explantes. No segundo experimento, foram 4 repetições, sendo que uma unidade experimental foi constituída por 5 tubos de ensaio, e em cada tubo de ensaio foram inoculados dois explantes. Em ambos os experimentos, os dados foram avaliados após 4 semanas de desenvolvimento *in vitro* por meio de tabela de contingência, considerando como fator positivo a indução de culturas nodulares e como fator negativo a não indução de culturas nodulares.

9.2.2. Multiplicação de culturas nodulares em biorreatores de imersão temporária

Em um primeiro estudo foi realizado a avaliação da capacidade de multiplicação das culturas nodulares em sistema de imersão temporária, 3 minutos de imersão a cada 3 horas, em resposta a diferentes tipos e combinações de fitorreguladores. Utilizou-se o sistema de imersão temporária com frascos duplos (Erlenmeyers de 2L, conforme Figura 2), inoculando-se 8 g de culturas nodulares em um dos erlenmeyers enquanto o outro continha 300 mL de meio de cultura. O meio basal foi MSB com pH ajustado para 5,8, e os tratamentos foram: testemunha (meio basal sem fitorreguladores); e meio basal adicionado de: 2 μM de ANA; 2 μM de BAP; 2 μM de ANA mais 2 μM de BAP; e 4 μM de ANA mais 2 μM de BAP. As fontes de explantes foram culturas nodulares coletadas de frascos de micropropagação convencional (protocolo de Guerra et al. (1999)), nos quais houve a formação de culturas nodulares. O período de imersão das culturas vegetais foi de 3 minutos, com intervalos de 3h entre cada imersão. As variáveis analisadas foram a taxa de multiplicação ((peso final - peso inicial)/

peso inicial), e o aspecto das culturas vegetais, obtidos após 4 semanas de cultivo. Por não ter repetições o estudo constituiu-se de um ensaio.

Um segundo experimento foi instalado avaliando-se as performances de 3 sistemas de cultivo: sistema de imersão temporária em frascos duplos (SIT-FD), sistema de imersão temporária RITA[®] (SIT-RITA) e sistema de imersão permanente (SIP). Os períodos de imersão e intervalo nos sistemas de imersão temporária seguiram o mesmo padrão do estudo anterior, e padronizou-se a relação de 60 mL de meio de cultura para cada 1g de culturas nodulares, tendo como meio de cultura MSB suplementado com 2 µM de ANA e 2 µM de BAP, e pH ajustado para 5,8. Com isto, no SIT-FD cada par de erlenmeyers recebeu 300 mL de meio e 5g de culturas nodulares; no SIT-RITA o aparato recebeu 200 mL de meio de cultura e 3,33g de culturas nodulares; e no SIP utilizou-se 20 mL de meio de cultura e 0,33g de culturas nodulares para cada frasco de cultivo (capacidade de 340 mL, altura 121,7 mm, diâmetro do corpo de 69 mm). As culturas nodulares utilizadas como explante foram coletadas de biorreatores de imersão temporária em frascos duplos que constituíram o ensaio anterior.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, com 4 repetições. No SIT-FD uma unidade experimental constituiu-se de um par de erlenmeyers, no SIT-RITA constituiu-se de um aparato de imersão temporária e no SIP de 5 frascos de cultivo. As variáveis analisadas foram taxa de multiplicação ((peso final - peso inicial)/ peso inicial), e o número de brotos individualizados. Os dados foram coletados após 4 semanas de cultivo e submetidos ao teste F_{\max} para verificar a homogeneidade dentro de cada tratamento, seguindo ANOVA e teste de separação de médias SNK (95%). Além disto, também foram realizadas observações morfológicas das culturas obtidas.

9.2.3. Alongamento de microbrotos

Neste experimento foi utilizado como explante 1 g de microbrotos obtidos no experimento anterior (oriundos do SIT-RITA), e cultivados em frascos de cultivo contendo 25 mL de meio de cultura. O meio de cultura basal foi MSB, com pH ajustado à 5,5. Os tratamentos avaliados foram controle (meio basal sem fitoregulador) e meio basal suplementado com 5, 10, 15 e 20 µM de ácido giberélico (AG₃), que foram adicionados ao meio antes da autoclavagem. A variável estudada foi o número de brotos acima de 4 cm por frasco após 8 semanas de

cultivo, altura pré definida com base em ensaios e experimentos anteriores.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, com 4 repetições, sendo que uma unidade experimental constituiu-se de 3 frascos. O teste F_{\max} foi realizado para verificar a homogeneidade dentro de cada tratamento, seguindo ANOVA e teste de separação de médias SNK (95%).

9.2.4. Aclimatização

Diferentes classes de altura de brotos foram testadas para avaliar a capacidade de aclimatização. Utilizou-se como explante brotos obtidos do experimento anterior sendo que os tratamentos foram diferentes classes de altura: 0,1-1 cm, 1,1-2 cm, 2,1-3 cm, 3,1-4 cm, 4,1-5 cm, 5,1-6 cm e maiores que 6,1 cm, totalizando 6 tratamentos. Para o processo de aclimatização utilizou-se o substrato Plantmax[®] HT e bandejas de 200 células (0,012074 m³ por célula), sendo que após 4 semanas de desenvolvimento na bandeja foi feita a avaliação de sobrevivência de brotos.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, totalizando 10 indivíduos para cada tratamento em cada bloco, totalizando 40 indivíduos por tratamento. Os dados foram avaliados por meio de tabela de contingência, considerando a sobrevivência de brotos como fator positivo, e a morte de brotos como fator negativo.

Um segundo experimento foi conduzido e os tratamentos testados foram diferentes classes de altura de brotos, 2,1-3 cm, 3,1-4 cm, 4,1-5 cm, 5,1-6 cm, totalizando 4 tratamentos. Os brotos foram desenvolvidos no mesmo meio de cultura que o experimento anterior. Utilizou-se como substrato uma mistura (1:1) de Plantmax[®] HT e casca de arroz carbonizada, em bandejas de 128 células (0,014354 m³ por célula). Após 4 semanas foi feita a avaliação de sobrevivência de brotos.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, totalizando 25 indivíduos para cada tratamento em cada bloco, totalizando 100 indivíduos por tratamento no experimento e ao todo 400 unidades no experimento. Avaliaram-se os dados por meio de tabela de contingência, considerando a sobrevivência de brotos como fator positivo, e a morte de brotos como fator negativo.

9.3. Resultados

9.3.1. Indução de culturas nodulares

Observou-se que a taxa de indução de culturas nodulares esteve relacionada à combinação de fitorreguladores presente no meio de cultura, havendo diferença estatística entre os tratamentos utilizados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Taxa de indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de abacaxizeiro em resposta à combinação e concentração dos fitorreguladores ANA e BAP após 4 semanas de desenvolvimento *in vitro*.

BAP (μM)	ANA (μM)		Média
	0	2	
0	7,14% B	0% C	2,2 E
4	21,4% B	21,7% B	21,5 D
8	22,2% B	65,1% A	60 A
12	23,1% B	35,7% B	31,7 B
16	14,2% B	35,5% B	28,8 C
Média	17,6% b	38,3% a	

Médias seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna, minúscula na linha e maiúscula em negrito na interação entre fatores, apresentam diferenças significativas, segundo tabela de contingência (95% de confiabilidade).

Tabela 5. Taxa de indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de abacaxizeiro em resposta à combinação e concentração dos fitorreguladores ANA e 2-iP após 4 semanas de desenvolvimento *in vitro*.

2-iP (μM)	ANA (μM)
	2
0	0% B
4	55,0% A
8	65,0% A
12	50,0% A
16	52,5% A
Testemunha MS isento de ANA e	0% B

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas, segundo tabela de contingência (95% de confiabilidade).

No primeiro experimento, a combinação de 2 μM de ANA e 8 μM de BAP resultou nas maiores taxas de indução, onde 65,1% dos explantes apresentaram a formação de culturas nodulares. Culturas nodulares foram induzidas em todos os demais tratamentos, com exceção do tratamento com 2 μM de ANA e ausência de BAP. Com a utilização isolada de 2 μM de ANA ou em combinação com baixas concentrações de BAP, foi observado o desenvolvimento de raízes.

No segundo estudo, padrões similares de respostas foram observados, onde a ausência de fitorreguladores não induziu nenhuma resposta morfogênética, enquanto no tratamento apenas com 2 μM de ANA novamente ocorreu a indução de raízes. Nos demais tratamentos houve a indução de culturas nodulares, não havendo diferença estatística entre os tratamentos. Porém, o tratamento contendo 2 μM de ANA e 8 μM de 2iP apresentou a maior porcentagem de indução, 65%, similar aos resultados observados no experimento anterior. Desta forma, a presença de citocinina e auxina influenciou o desenvolvimento de culturas nodulares (Figura 4), que pôde ser observado a partir da segunda semana, na base dos explantes. Observou-se que após 4 semanas as culturas nodulares induzidas evoluíram para microbrotos em maior frequência nos tratamentos que continham BAP como fonte de citocinina (dados não mostrados).

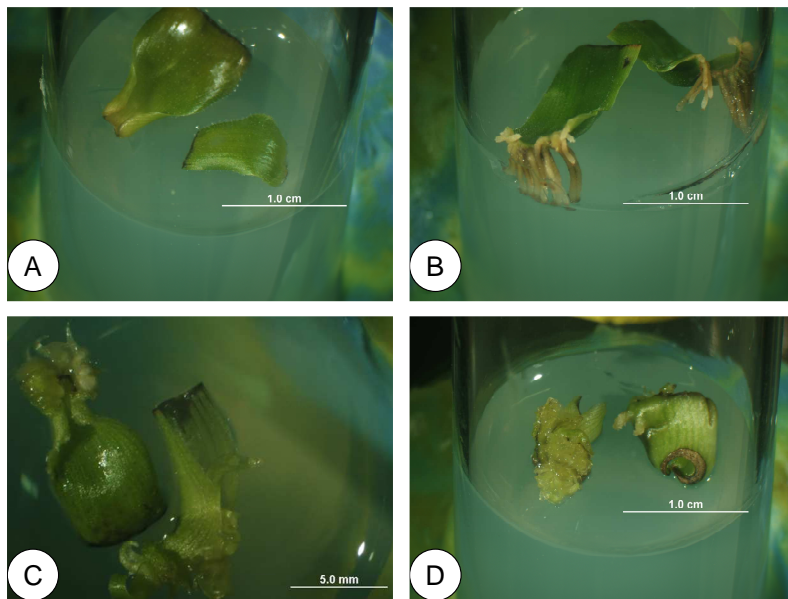


Figura 4. Indução de culturas nodulares de abacaxizeiro. A – bases foliares sem resposta morfogênica em meio de cultura isento de fitorreguladores; B – Indução de raízes em meio de cultura com 2 μM de ANA; C- Indução de culturas nodulares em meio de cultura com 2 μM de ANA e 8 μM de BAP; D – Indução de culturas modulares em meio de cultura com 2 μM de ANA e 8 μM de 2-iP.

9.3.2. Multiplicação de culturas nodulares

No primeiro ensaio, a multiplicação das culturas nodulares pode ser obtida com sucesso. Com base no peso fresco inicial, peso fresco final e a capacidade proliferativa, observou-se que o meio de cultura suplementado com 2 μM de ANA e 2 μM de BAP resultou na maior taxa de multiplicação. Este tratamento também resultou em melhor qualidade de culturas nodulares formadas, com nódulos globulares de coloração verde clara e ótima aparência (Tabela 6; Figura 5).

Tabela 6. Efeito de diferentes combinações e concentrações dos fitorreguladores ANA e BAP na taxa proliferativa ((peso final – peso inicial)/peso inicial) e nos aspectos morfogênicos de culturas nodulares de abacaxizeiro em sistema de imersão temporária de frascos duplos após 4 semanas em cultura.

Taxa proliferativa	Aspectos morfogênicos
--------------------	-----------------------

ANA (μM)	BAP (μM)		BAP (μM)	
	0	2	0	2
0	-	1,88		Cor verde acinzentada
2	1,75	2,75	Cor verde escura (alta taxa de oxidação)	Verde clara (ótima aparência)
4	-	2,25		Muita formação de brotos

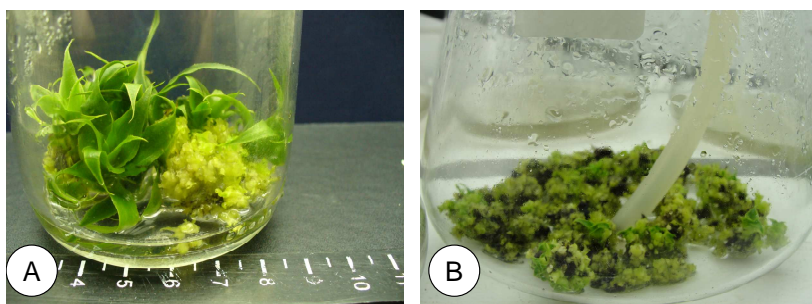


Figura 5. Multiplicação de culturas nodulares de abacaxizeiro em biorreatores de imersão temporária por frascos duplos. A – Culturas nodulares em frasco de organogênese convencional em fase de multiplicação; B - Detalhe de culturas nodulares multiplicadas em sistema de frascos duplos durante 4 semanas.

No segundo experimento, avaliou-se separadamente as variáveis taxa proliferativa, número de unidades individuais por peso e aparência morfológica. Na avaliação quanto à influência do sistema de cultivo sobre a taxa proliferativa, observou-se que o sistema de imersão temporária RITA[®] foi o que apresentou maior taxa (14,01), seguido do SIT-FD (4,37) e por fim o sistema em imersão permanente, SIP, que apresentou uma taxa de 0,61 (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito dos diferentes sistemas de imersão (sistema de imersão temporária em frascos duplos (SIT-FD), em aparatos RITA[®] (SIT-RITA) e sistema de imersão permanente (SIP)) na taxa proliferativa ((peso final – peso inicial)/peso inicial) de culturas vegetais em meio com formulação salina MS suplementado 3% de sacarose, 2 μM de ANA e 2 μM de BAP,

após 4 semanas em cultura.

Sistema de imersão	Taxa proliferativa ((Peso final – Peso inicial)/Peso inicial)
SIT-RITA	14,01 A
SIT-FD	4,37 B
SIP	0,61 C

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas, segundo teste SNK à 95% de confiabilidade. Coeficiente de variação de 11,29%.

Entretanto, a fase de desenvolvimento das culturas vegetais obtidas em cada tratamento diferiu (Figura 6). Enquanto no SIT-RITA o material vegetal obtido evoluiu de culturas nodulares à microbrotos, no SIT-FD e no SIP o material vegetal permaneceu na forma de culturas nodulares. Porém, comparando-se a aparência dos últimos, observa-se que a qualidade das culturas obtidas no SIT-FD foi superior à obtida no SIP; aquelas se apresentando com boa aparência, verdes-claras, enquanto que as últimas apresentaram alta taxa de oxidação.

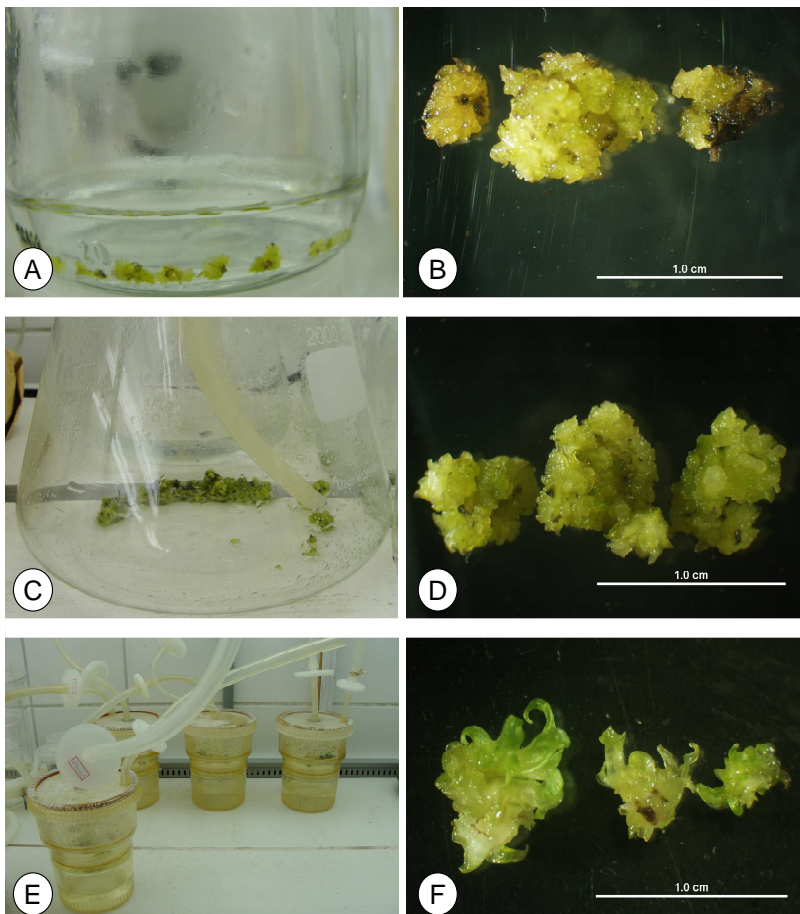


Figura 6. Multiplicação de culturas *in vitro* de abacaxizeiro sob diferentes sistemas de imersão. A – Culturas nodulares em sistema de imersão permanente; B – Aspecto morfológico de culturas nodulares desenvolvidas em imersão permanente durante 4 semanas; C – Culturas nodulares em biorreator de imersão temporária em frascos duplos; D – Aspecto morfológico de culturas nodulares desenvolvidas em frascos duplos durante 4 semanas; E – Culturas nodulares em biorreator de imersão temporária RITA®; F - Aspecto morfológico de microbrotos regenerados após 4 semanas em biorreator de imersão temporária RITA®.

Para a variável número de unidades individuais por peso, considerou-se unidades individuais estruturas capazes de formar brotos,

desde meristemas observáveis à microbrotos. Observou-se que o tratamento que demonstrou maior número de unidades individuais por grama foi o SIT-FD, com média de aproximadamente 141 unidades, seguida do SIP, com aproximadamente 124 unidades, e SIT-RITA, com aproximadamente 113 unidades, sendo que SIP e SIT-RITA não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 8; Figura 6).

Tabela 8. Efeito dos diferentes sistemas de imersão (sistema de imersão temporária em frascos duplos (SIT-FD), em aparatos RITA[®] (SIT-RITA) e sistema de imersão permanente (SIP)) no número de unidades individuais por grama de cultura vegetal em meio com formulação salina MS suplementado 3% de sacarose, 2 μ M de ANA e 2 μ M de BAP, após 4 semanas em cultura.

Tratamento	Número de unidades individuais
SIT-FD	141,3 A
SIP	124,2 B
SIT-RITA	112,9 B

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas, segundo teste SNK à 95% de confiabilidade. Coeficiente de variação de 8,008%.

9.3.3. Alongamento de microbrotos

Observou-se que houve homogeneidade dentro dos tratamentos e diferença estatística entre os tratamentos estudados (Tabela 9).

Tabela 9. Eficiência de diferentes concentrações de AG₃ em promover o alongamento de microbrotos de abacaxizeiro em frasco de imersão permanente a brotos maiores que 4 cm após 8 semanas em cultura.

Concentrações de AG ₃ (μ M)	Nº médio de brotos maiores que 4 cm
0	9,6 C
5	20,1 B
10	25,5 A
15	22,1 B
20	20,3 B

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas, segundo teste SNK à 95% de confiabilidade. Coeficiente de variação de 19,65%.

Observou-se que o número de brotos acima de 4 cm obtidos por meio de microbrotos em diferentes concentrações de AG₃ após 8 semanas (Figura 7 – A, B e C) seguiu um comportamento no qual houve crescimento numérico partindo do tratamento com ausência de AG₃, em média, 9,6 brotos, aumentando para 20,1 no tratamento contendo 5 µM de AG₃, e chegando ao resultado superior com o tratamento com 10 µM de AG₃, com 25,5 brotos, daí decrescendo para 22,1 e 20,3 brotos, respectivamente nos tratamentos contendo 15 e 20 µM de AG₃. Houve diferença estatística entre blocos, o que se justifica na coleta dos microbrotos do aparato Rita[®], quando provavelmente houve uma diferença no padrão de desenvolvimento das culturas coletadas na montagem entre os blocos, por essa mesma característica observa-se um alto coeficiente de variação (19,65%).



Figura 7. Alongamento de microbrotos de abacaxizeiro em sistema de imersão permanente e aclimatização. A- Microbrotos em biorreator de imersão temporária RITA[®]; B – Detalhes de microbrotos utilizados como fonte de explante; C – Frascos em sistema de imersão permanente com brotos desenvolvidos em diferentes concentrações de ácido giberélico durante 8 semanas; D – Plântulas de abacaxizeiro aclimatizadas, desenvolvidas *ex vitro* por 8 semanas.

9.3.4. Aclimatização das plântulas

Comparando-se as diferentes classes de altura testadas no primeiro experimento, os intervalos de 5,1 a 6 cm, e 6,1 a 7 cm, apresentaram maior taxa de sobrevivência, 95%, seguidos pelo intervalo de 4,1 a 5 cm com 85%, intervalo de 3,1 a 4 cm com 57,5%, intervalo de 2,1 a 3 cm com 42,5% e intervalo de 1,1 a 2 cm com 7,5%. O intervalo de 0,1 a 1 cm não apresentou sobrevivência (Tabela 10). Já no segundo experimento não foi observado diferença estatística entre os tratamentos, sendo que todos os tratamentos apresentaram mais que 92% de sobrevivência (Tabela 11; Figura 7 - D).

Tabela 10. Eficiência da aclimatização de diferentes classes de altura de brotos de abacaxizeiro em substrato constituído por Plantmax[®] HT, após 4 semanas.

Classes de altura de brotos (cm)	Sobrevivência (%)
0 a 1	0,0 C
1,1 a 2	7,5 C
2,1 a 3	42,5 B
3,1 a 4	57,5 B
4,1 a 5	85 A
5,1 a 6	95 A
6,1 a 7	95 A

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas, segundo tabela de contingência (95% de confiabilidade).

Tabela 11. Eficiência da aclimatização de diferentes classes de altura de brotos de abacaxizeiro em substrato constituído por mistura (1:1) de Plantmax[®] HT e casca de arroz carbonizada, após 4 semanas.

Classes de altura de brotos (cm)	Sobrevivência %
2,1 a 3	92 A

3,1 a 4	96 A
4,1 a 5	92 A
5,1 a 6	93 A

Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo tabela de contingência (95% de confiabilidade).

9.4. Discussão

Observou-se nos dois experimentos referentes a indução de culturas nodulares que a relação citocinina/auxina que se mostrou superior para a formação de culturas nodulares em explante de base foliar de abacaxizeiro foi de 8 μM de citocinina e 2 μM de auxina. Esta combinação hormonal resultou em uma boa porcentagem de indução de culturas nodulares (cerca de 65%). Segundo Mercier et al. (2003) a indução de culturas nodulares a partir das bases foliares de abacaxizeiro é dependente da presença tanto de auxina quanto de citocinina, o que vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo. Desta maneira, observou-se que tratamentos com presença somente de auxina, na concentração de 2 μM , induziram a formação de raízes, e tratamentos com presença somente de citocinina, 4, 8, 12 e 16 μM , mostraram-se menos aptos à formação de culturas nodulares quando comparadas aos tratamentos com a presença de combinação de 2 μM ANA com diferentes concentrações de citocinina (4, 8, 12 ou 16 μM). Estudos com resultados similares de indução de culturas nodulares a partir de bases foliares de abacaxizeiro *in vitro* também foram reportados por Dolgov et al. (1998), Teng (1997), Sripaoraya et al. (2003), Firozabady e Moy (2004) e Hamasaki et al. (2005). Em outro trabalho com o abacaxizeiro, reportado por Wakasa et al. (1978), obteve-se culturas nodulares a partir de outras fontes de explantes, segmentos do sincarpo, e gemas axilares. E em outras bromeliáceas a obtenção de culturas nodulares a partir de bases foliares foi reportada por Mercier e Kerbauy (1995); Koh e Davies JR (1997); Alves e Guerra (2001); Rech Filho et al. (2005), (2009); Alves et al. (2006); Dal Vesco e Guerra (2010) e Dal Vesco (2010).

A relativa similaridade de resultados obtidos por meio de uma relação citocinina/auxina positiva, utilizando diferentes genótipos da var. *comosus*, sugere que o presente protocolo de indução de culturas

nodulares seja recorrente para o abacaxizeiro. Mercier et al. (2003) reforçam essa sugestão com a afirmação de que em abacaxizeiro, a indução de culturas nodulares está relacionada com a relação endógena citocinina/auxina, principalmente com o aumento nos níveis de Isopenteniladenina (iP), presente na base foliar, área do explante que apresenta indução.

O fato da citocinina BAP promover com uma maior frequência a formação precoce de microbrotos faz com que ela seja recomendada quando o objetivo não é obter culturas cíclicas, possível apenas na fase de culturas nodulares. Dessa forma, sugere-se que a utilização da combinação 8 μM de 2-iP combinada à 2 μM de ANA seja a mais recomendada para processos que visem a indução de culturas nodulares seguida de multiplicação massal.

Para a multiplicação de culturas nodulares em biorreatores de imersão temporária o meio de cultura básico suplementado com 2 μM de ANA e 2 μM de BAP no sistema de imersão temporária em frascos duplos mostrou-se ser o mais eficiente. Isto possibilitou o estabelecimento de uma cultura cíclica, o que torna o protocolo eficiente para a regeneração de um maior número de mudas. Resultados similares foram encontrados por Dal Vesco e Guerra (2010) com culturas nodulares de *Vriesea reitzii*, induzidas de sementes em meio de cultura contendo 4 μM de ANA e multiplicadas, mantendo-as em culturas nodulares, em meio contendo 2 μM de ANA e 2 μM de 2-iP. Neste mesmo trabalho esses autores reportaram a combinação 4 μM de ANA e 2 μM de BAP para a multiplicação conservativa de culturas nodulares induzidas a partir de bases foliares de *V. reitzii*. Dal Vesco (2010) observou que em *Billbergia zebrina* o meio de cultura suplementado com 0,01 μM de TDZ e 2 μM de 2-iP em meio geleificado mostrou-se superior para a manutenção cíclica de culturas nodulares, e que o processo de multiplicação mais eficiente foi o meio de cultura líquido isento de fitorreguladores, mantendo-se as culturas sob ponte de papel filtro. Nesse estudo a indução dessas culturas ocorreu com a concentração de 0,01 μM de TDZ. Não foi encontrado para o abacaxizeiro até então experimentos que explorassem a multiplicação de culturas nodulares.

Por outro lado, para a formação de microbrotos observou-se que o SIT-RITA foi mais eficiente que os demais tratamentos, possibilitando também alta taxa de multiplicação. Sugere-se que o fator desencadeante à regeneração seja o ambiente menos irrigado que este sistema confere quando comparado ao SIT-FD e SIP. Os estudos de Dal Vesco e Guerra

(2010) e Dal Vesco (2010) reforçam esta sugestão uma vez que culturas nodulares de *V. reitzii* e *B. zebrina*, respectivamente, apresentam maior frequência de regeneração sob ponte de papel filtro quando comparada ao meio geleificado. Nesse sentido, tomando como base o estudo de Geigenberger (2003) sobre os efeitos da falta de oxigênio em tecidos de culturas vegetais, observou-se que o ambiente presente no SIP conduziu às culturas vegetais hipoxia, uma vez que desencadeou problemas para o desenvolvimento celular que culminaram na baixa taxa de multiplicação alcançada e no aspecto oxidado obtido nas culturas. Por outro lado, as condições obtidas no SIT-RITA e no SIT-FD foram propícias para o desenvolvimento celular, o primeiro para a regeneração aliada à multiplicação de microbrotos e o último para a multiplicação de culturas nodulares.

Os resultados do presente trabalho também confirmaram a maior eficiência dos biorreatores de imersão temporária em relação aos sistemas de imersão permanente quanto a taxa proliferativa. Resultados similares foram obtidos por Steinmacher et al. (*in press*), Escalona et al. (1999), Feuser (2000) e Silva et al. (2007). Adicionalmente, quando se compara a taxa proliferativa da organogênese convencional em SIT-FD reportados por Escalona et al. (1999), Feuser (2000) e Silva et al. (2007), todos trabalhos com abacaxizeiro, com a taxa proliferativa encontrada no presente trabalho, constata-se a maior capacidade da rota regenerativa por meio de culturas nodulares do que pela organogênese direta.

Para a fase de alongamento de brotos obteve-se como melhor tratamento o meio de cultura suplementado com 10 μM de AG_3 . Resultados similares foram encontrados por Dal Vesco (2010) com *B. zebrina*, estudo que apresentou dados no qual o mesmo meio de cultura suplementado com 10 μM de AG_3 foi o mais apto para promover o alongamento de brotos.

Através do tratamento superior foi possível a obtenção de cerca de 25 brotos aclimatizáveis, maiores do que 4 cm nos frascos de cultivo. Esse número é superior aos encontrados em protocolos de organogênese convencional na fase de crescimento ou alongamento quando se leva em consideração o número de brotos por área nos protocolos tradicionais, como os estudos de Guerra et al. (1999) e Teixeira et al. (2001). Isto está relacionado com a maior densidade de unidades individuais do presente protocolo ante a densidade encontrada em protocolos convencionais. Enquanto na organogênese convencional 1g de cultura vegetal na fase de multiplicação resulta em poucos brotos, no protocolo proposto 1g de

microbrotos representa mais de uma centena de unidades individuais. Levando-se em consideração o presente protocolo desenvolvido, cada SIT-RITA contendo 50 g de microbrotos tem potencialidade para produzir cerca de 1250 brotos acima de 4 cm após 8 semanas de desenvolvimento. Estes dados apontam que a fase de crescimento de brotos requer um aumento na sua eficiência, já que 1g de microbrotos inoculados deveria resultar em mais de uma centena de brotos, porém alcança em média 25 brotos acima de 4cm. Por outro lado o peso das culturas vegetais abaixo de 4 cm no tratamento com 10 μ M de AG₃ é de 12,5g (dados não mostrados), equivalente a mais de 1000 microbrotos. Ou seja, mesmo que o protocolo estabelecido apresenta-se como um sistema de alta performance para a produção de mudas de abacaxizeiro, ainda existe potencialidade para aumentar em muitas vezes sua taxa proliferativa.

A aclimatização das plântulas provenientes da cultura *in vitro* pode ser considerada um passo crítico em um protocolo de alta eficiência, pois acumula todos os custos já envolvidos na regeneração das plântulas (Steinmacher et al., 2007). Para o presente estudo, considerou-se, *a priori*, uma porcentagem de sobrevivência em torno de 90% como mínimo aceitável para a fase de aclimatização. Neste sentido, apresentaram-se aptas à fazer parte do protocolo estabelecido os tratamentos, do primeiro experimento, 4,1 a 5 cm; 5,1 a 6 cm e maiores que 6,1 cm, com sobrevivência de 85%, 95% e 95%, respectivamente; e todos os tratamentos estudados no segundo experimento, 2,1 a 3,0 cm; 3,1 a 4,0 cm; 4,1 a 5,0 cm e 5,1 a 6 cm, respectivamente 92, 96, 92 e 93% de sobrevivência. Sugere-se que a diferença entre os dois experimentos esteja relacionada com a época de plantio e o tipo de substrato utilizado. Enquanto no primeiro experimento utilizou-se Plantmax[®] HT como única fonte de substrato, e a época de plantio foi no início da primavera, no segundo experimento utilizou-se como substrato uma mistura 1:1 de casca de arroz carbonizada e Plantmax[®] HT, e a época de plantio foi no início do verão. A primeira combinação conduz a um substrato com maior susceptibilidade ao excesso hídrico e a ocorrência de baixas temperaturas, características negativas para o desenvolvimento do abacaxizeiro. Em outros trabalhos com abacaxizeiro, Amin et al. (2005) relata a sobrevivência de, em média, 90% de brotos aclimatizados e Sripaoraya et al. (2003) de 100%, porém não há nestes dois estudos detalhes quanto o tamanho de brotos aclimatizados.

Em protocolos baseados em culturas nodulares com outras

espécies, Dal Vesco e Guerra (2010) reportam a sobrevivência de 100% de brotos de *V. reitzii* oriundos de protocolo regenerativo por meio de culturas nodulares a partir de 3,5 cm de altura com a utilização do substrato composto por uma mistura 1:1:1 de casca de arroz carbonizada, Plantmax[®] HT e casca de pinus. No mesmo sentido, Dal Vesco (2010) observou que com a utilização desse mesmo substrato foi possível obter a sobrevivência de 85% de brotos de *B. zebrina* com altura a partir de 3,5cm.

Levando-se em consideração a taxa de sobrevivência do segundo experimento, alcançou-se resultados similares à sobrevivência encontrada em plântulas oriundas da organogênese convencional, reportada por Guerra et al. (1999). Isto confirma a eficiência do presente protocolo, que apresenta sobrevivência semelhante à organogênese convencional ao mesmo tempo em que possui uma eficiência regenerativa muito maior.

9.5. Conclusões

No presente trabalho foi possível estabelecer um protocolo de micropropagação de abacaxizeiro de alta eficiência, baseado em culturas nodulares e biorreatores de imersão temporária (Figura 8). As etapas resumidas do protocolo são:

Indução de culturas nodulares: Inoculação de bases foliares de abacaxizeiro retiradas de brotos desenvolvidos *in vitro* em meio constituído de sais MS, e suplementado com 3% de sacarose 0,72% de agar, 2 µM de ANA e 8 µM de 2-iP, com pH ajustado para 5,8. A duração nessa fase é de 4 semanas.

Fase intermediária entre indução e multiplicação: Cultivo das bases foliares induzidas (contendo culturas nodulares e microbrotos) em frasco com lâmina de meio de cultura líquido constituído de sais MS, e suplementado com 3% de sacarose, 2 µM de ANA e 2 µM de BAP, com pH ajustado para 5,8. Após 4 semanas realiza-se a seleção de culturas nodulares.

Multiplicação de culturas nodulares: Desenvolvimento de culturas nodulares em meio de cultura constituído de sais MS, e suplementado com 3% de sacarose, 2 µM de ANA e 2 µM de BAP, com pH ajustado para 5,8 em sistema de imersão temporária em frascos duplos. Após 4 semanas realiza-se o subcultivo e a seleção de culturas para a fase de regeneração.

Regeneração de microbrotos: Inoculação de culturas nodulares em

aparato de imersão temporária RITA[®] em meio de cultura constituído de sais MS, e suplementado com 3% de sacarose, 2 µM de ANA e 2 µM de BAP, com pH ajustado para 5,8. Após 4 semanas os microbrotos formados seguem para fase de alongamento de brotos.

Alongamento de brotos: Inoculação de microbrotos em frascos de cultivo contendo meio de cultura constituído de sais MS, e suplementado com 3% de sacarose, 10 µM de AG₃, com pH ajustado para 5,5. Após 8 semanas os brotos seguem para a fase de aclimatização.

Aclimatização: Plantio de brotos maiores de 2 cm em substrato constituído de mistura (1:1) de Plantmax[®] HT e casca de arroz carbonizada.

Este protocolo traz inovações consideráveis aos protocolos até estão descritos para a micropropagação do abacaxizeiro, por incorporarem novas metodologias relacionadas ao emprego de culturas nodulares associadas aos biorreatores. Com isto pode-se obter maior rapidez, menor mão de obra e manipulação das culturas e menor preço final das mudas obtidas.

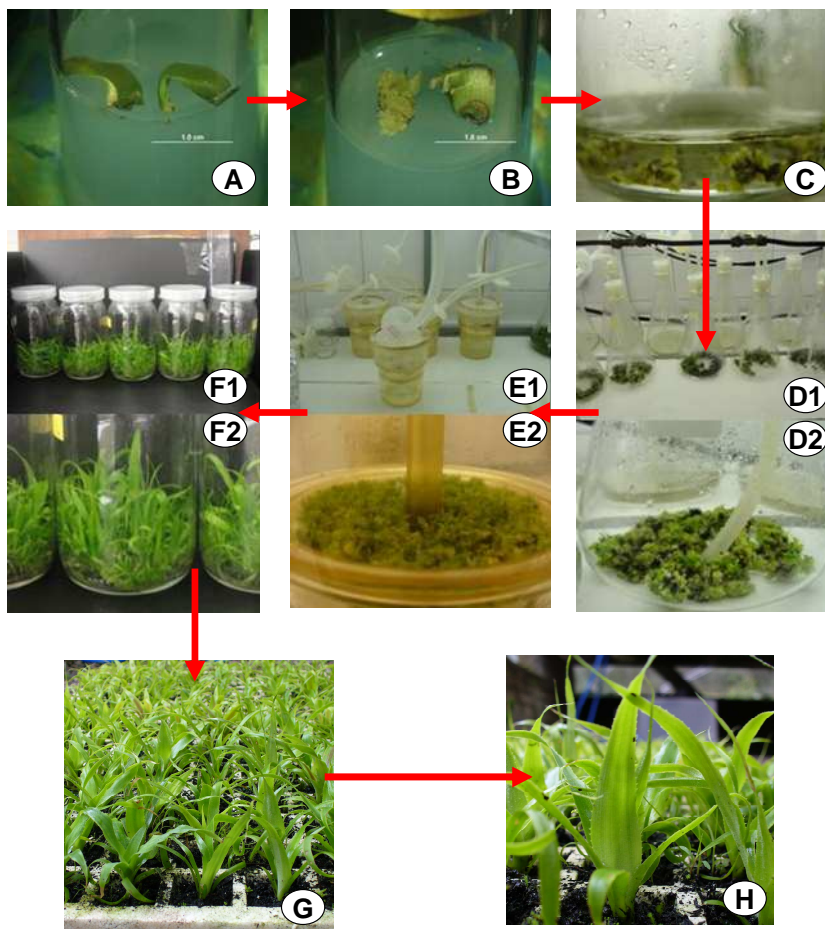


Figura 8. Protocolo de micropropagação de abacaxizeiro de alta eficiência baseado em culturas nodulares e biorreatores de imersão temporária. A – Inoculação de bases foliares de abacaxizeiro; B – Culturas nodulares induzidas em meio de cultura com combinação 2 μ M de ANA e 8 μ M de 2-iP; C – Fase intermediária entre as fase de indução e multiplicação de culturas nodulares; D1 – Multiplicação de culturas nodulares em biorreatores de imersão temporária em frascos duplos; D2 – Detalhe de culturas nodulares em multiplicação em frascos duplos; E1 – Regeneração de microbrotos em biorreator de imersão temporária RITA[®]; E2 – Detalhe de microbrotos em aparato RITA[®]; F1 – Fase de alongamento de brotos em frascos de imersão permanente; F2 – Detalhe de brotos alongados de abacaxizeiro; G – Fase de aclimatização de brotos; H – Detalhe de plântula em desenvolvimento em bandeja de aclimatização.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amin, M. N; Rahman, M. M; Rahman, K. W; Ahmed, R; Hossain, M. S; Ahmed, M. B. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L) Merr; cv. Giant Kew]. Inter. J. Botany, v.1, p.128-132, 2005.
- Alves, G. M; Dal Vesco L. L; Guerra M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. Sci. Hort. 110, 204-207, 2006
- Alves, G. M; Guerra, M. P. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. J. Bromeliad Soc., v.51, n.5, p.202-212, 2001.
- Be, L. V; Debergh, P. C. Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*). South African J. Bot., 72: 191-194, 2006.
- Coppens D'Eeckenbrugge, G; Duval, M. F. The Domestication of Pineapple: Context and Hypotheses. Issue No. 16, Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science July, 2009.
- Dal Vesco, L. L; Guerra, M. P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. Scientia Horticulturae ^{JCR}, v. 125, p. 748-755, 2010.
- Dal Vesco, L. L. Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da mata atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): bases para a conservação e propagação massal. Dissertação (Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, SC. 70p, 2010.
- Dolgov, S. V; Shushkova, T. V; Firsov, A. P. Pineapple (*Ananas comosus* Merr.) regeneration from leaf explants. In: Drew, R. A., ed. Proc. of the Int. Symp. on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. Acta Hort. 461:439-444; 1998.
- Escalona, M; Lorenzo, J. C; Gonzalez, B. L; Daquinta, M; Gonzalez, J. L; Desjardins, Y; Borroto, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. Plant

- cell, Reports, 18: 743-748, 1999.
- Feuser, S. Micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores moleculares. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, SC. 70p, 2000.
- Firozabady, E; Moy, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40: 67-74, 2004.
- Geigenberger, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 247–256, 2003.
- Guerra, M. P; Dal Vesco, L. L; Pescador, R; Schuelter A. R; Nodari R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1557-1563, 1999.
- Guerra, M. P; Dal Vesco, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press-Springer, v.589, pp.47-66, 2010.
- Hamasaki, R. M; Purgatto, E; Mercier, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (4): 273-281, 2005.
- Koh, Y. C; Davies Jr, F. T. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. *Sci. Hort.* 70, 301-307, 1997.
- Mercier, H; Kerbauy, G. B. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered brazilian bromeliads from atlantic rain forest canopy. *Selbyana* 16 (2), 147-149, 1995.
- Mercier, H; Souza B. M; Kraus, J. E; Hamasaki, R. M; Sotta, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves on pineapple culture *in vitro*. *Braz. J. Plant Physiol.* 15:107-112, 2003.
- Morel, G. M; Wetmore, R. H. Tissue culture of monocotyledons *Am. J. Bot.*, 38:138-140, 1951.

- Murashige, T; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, v.15, p.473-497, 1962.
- Pasqual, M; Moreira, M. A; Anjos Sobrinho, A. dos. *Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.
- Rech Filho, A; Dal Vesco, L. L; Guerra, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic Forest. *Cien. Rural* 39 (3), 909-912, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008005000088.
- Rech Filho, A; Dal Vesco, L. L; Nodari, R. O; Lischka, R. W; Müller, C. V; Guerra M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiv. Cons.* 4, 1799-1808, 2005.
- Silva, A. B. da; Pasqual, M; Teixeira, J. B; De Araújo, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(9): 1257-1260, 2007.
- Sokal, R. R; Rolf, F. J. *Biometry*. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 776p, 1969.
- Sripaoraya, S; Marchant, R; Power, J. B; Davey, M. R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol.*, Plant 39, 450—454, 2003.
- Steinmacher, D. A; Cangahualainocente, G. C; Clement, C. R; Guerra, M. P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro cellular and Developmental Biology Plant*, v. 43, n. 2, p. 124-132, 2007.
- Steinmacher, D. A; Guerra, M. P; Saare-Surminski, K; Lieberei, R. Temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, in press.
- Teixeira, J; Cruz, A. R. R; Ferreira, F. R; Cabral, J. R. *Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi*. *Biotecnologia ciência e*

Desenvolvimento, Brasília, v.3, p.42-47, 2001.

Teng, W. L. An alternative propagation method of *Ananas comosus* through nodule culture. Plant Cell Rep. 16, 454-457, 1997.

Wakasa, K; Koga, Y; Kudo, M. Differentiation from in vitro culture of *Ananas comosus*. Jap. J. Breed. 28:113-121, 1978.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho gerou-se informações relevantes para a espécie *A. comosus* var. *comosus*, tanto no aspecto histórico, por meio do primeiro capítulo, como no aspecto biotecnológico, nos capítulos 2 e 3. Com o desenvolvimento das duas temáticas torna-se possível produzir em um pequeno espaço de tempo, área reduzida e baixo custo, um grande número de mudas de genótipos de interesse, bem como estabelecer estratégias eficientes para a conservação e melhoramento genético de genótipos adaptados ao sul do Brasil.

O protocolo de micropropagação de abacaxizeiro baseado em culturas nodulares e em biorreatores de imersão temporária apresenta eficiência regenerativa muito maior que protocolos de organogênese convencional. Necessitando porém, de refinamentos pontuais, dentre esses, dois são mais evidentes. O primeiro está na passagem da fase de indução para a fase de multiplicação, quando se faz necessário o cultivo das bases foliares induzidas, contendo culturas nodulares e microbrotos, em SIP com combinação $2\mu\text{M}$ de ANA mais $2\mu\text{M}$ de BAP para após 4 semanas selecionar apenas culturas nodulares, que só então poderão iniciar a fase de multiplicação. Espera-se que em breve seja possível a entrada imediata das culturas nodulares induzidas para a fase de multiplicação, para isso é necessário testar novos tratamentos que inibam a formação de microbrotos no processo de indução de culturas nodulares. O outro ponto está na fase de alongamento de microbrotos. Essa etapa foi estudada apenas em sistema de imersão permanente, no qual se considerou aptos à fase de aclimatização apenas brotos maiores que 4 cm. Desta forma, deixa-se de utilizar uma porção considerável de culturas vegetais. Acredita-se que seja possível aumentar consideravelmente a eficiência regenerativa do protocolo através da utilização dessa porção de culturas vegetais descartadas, seja pela aclimatização de brotos menores (como a partir de 2 cm, demonstrado pelo segundo experimento do item aclimatização), ou pela utilização de diferentes metodologias para a fase de crescimento que possibilite maior sincronia no desenvolvimento dos microbrotos.

Na caracterização genética foi possível adaptar um sistema adequado de extração de DNA, porém o polimorfismo apresentado pelos sete iniciadores genotipados não foi suficiente para estimar a diversidade genética da coleção de germoplasma de abacaxizeiro do CCA/UFSC. Para tornar possível o estudo da diversidade desse grupo de

plantas deve-se aumentar o número de genótipos caracterizados, e o número de iniciadores.