



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRICULTURA NO
TRÓPICO ÚMIDO



MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO ABACAXIZEIRO 'TURIAÇU' CULTIVADO
NO MUNICÍPIO DE ITACOATIARA-AM.

CIBELLE AZAMORA DOS SANTOS

MANAUS, AMAZONAS
JUNHO, 2023

CIBELLE AZAMORA DOS SANTOS

**MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DO ABACAXIZEIRO 'TURIAÇU' CULTIVADO
NO MUNICÍPIO DE ITACOATIARA-AM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.
Área: Cultura de Tecidos de Plantas

ORIENTADOR: Dr. RICARDO LOPES

**MANAUS, AMAZONAS
JUNHO, 2023**

Folha de Aprovação

Banca Julgadora, abaixo assinada, **aprova** a Dissertação de Mestrado:

Título: Micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro 'Turiaçu' cultivado no município de Itacoatiara - AM

Autora: Cibelle Azamora dos Santos

Banca Julgadora:



Dr. Sidney Alberto do Nascimento Ferreira (Inpa)
(Membro titular)



Dr. André Luis Willerding (Inpa)
(Membro titular)



Dra. Simone da Silva (CBA)
(Membro titular)

Manaus (AM), 23 de junho de 2023.

B333I Santos, Cibelle Azamora Dos ▼

Micropropagação in vitro do abacaxizeiro 'turiçu' cultivado no município de Itacoatiara-Am. / Cibelle Azamora Dos Santos; orientador Ricardo Lopes. - Manaus:[s. 1.], 2023.

2,0 KB

94 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido – PPG-ATU) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Turiçu. 2. Abacaxizeiro. I. Ricardo Lopes. II. Título

CDD 641.647 74

*Á Deus, por ser a razão da
minha vida e sabedoria e à
minha amada filha, Marjorie Luna
ao qual desejo ser sempre exemplo de
superação e fé.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Á Deus por me manter firme e de pé perante todas adversidades da vida. Ele foi o motivo de minha força diária, inteligência e sabedoria durante todo meu trajeto no mestrado.

A FAPEAM pela concessão da bolsa de fomento, por incentivar e apoiar a ciência e o cientista com excelência.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por proporcionar essa experiência de vida através da pesquisa científica.

A Embrapa Amazônia Ocidental pela estrutura, suporte e especialmente por ter funcionários incríveis que contribuíram através de seus conhecimentos e estavam sempre à disposição para me ajudar na realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, por propiciar momentos e transmitir conhecimento através dos professores, pesquisadores e colaboradores.

Ao coordenador do PPG, Dr. Rogério Hanada por não medir esforços para o bem-estar dos acadêmicos, em especial, pelo valioso apoio e atenção acadêmica durante essa jornada, especialmente durante minha gestação.

A todos os colegas do PPG-ATU da turma de 2019/2 por todos os momentos compartilhados através do conhecimentos, experiências e descontração.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Lopes, por ser um excelente profissional ao qual tenho total respeito e admiração. Agradeço profundamente por todo conhecimento compartilhado, amizade, conselhos, paciência e apoio durante todo esse caminho. Obrigada por ter acreditado em mim e no meu potencial. Foi uma honra ser sua orientada!

A analista do laboratório, Pamela Harada, por muitas vezes ter feito por mim o que iria além do seu cargo. Agradeço as caronas (principalmente daquelas em tempo de pandemia), os sorrisos, as broncas e incentivos. Obrigada por tanto, tanto e tanto.

A técnica do laboratório, Rosimar Fernandes, minha Rosinha, agradeço por todo suporte, ajuda, paciência, carinho e amizade durante esse processo. Você é luz!

Aos meus amigos, Eduardo Dias e Daniele Façanha pela amizade que vem sendo cultivada desde iniciação científica e se perdura até dias de hoje. Vocês foram uma das peças fundamentais para esse sonho, com vocês ao meu lado tudo foi mais leve e feliz. Obrigada por existirem e se fazerem presente na minha vida.

À todos meus amigos, pelos sorrisos e motivações, pelos abraços e entusiasmo, sem dúvidas eu agradeço a Deus por ser cercada de bons amigos, especificamente daqueles que permaneceram ao meu lado nos momentos difíceis.

À meu amigo, Victor Nogueira por ser a luz nessa reta final, muito obrigada! Sua ajuda foi essencial, jamais irei esquecer.

Aos meus queridos e amados pais, José Henrique e Marta Azamora por serem apoio nas dificuldades, aconchego nos momentos de tristeza e principalmente por serem minha maior inspiração na vida. Amo muito vocês.

À minha querida irmã-filha, Alícia Azamora, pelos conselhos, apoio e amizade. Por ser a pessoa que muito me incentivou para que eu jamais desistisse, serei eternamente grata a você por tudo, te amo.

Ao meu amado esposo Mailson Carvalho, por me mostrar a cada dia que amor é capaz de tudo. Agradeço imensamente seu companheirismo, incentivo e cuidado diário durante esse percurso, você é sem dúvidas, o amor da minha vida.

À minha filha Marjorie Luna, por ser a luz da minha vida, minha maior alegria e motivação. Antes de sua chegada, nada mais fazia sentido, mas aí você nasceu e me fez renascer como a mãe mais feliz desse mundo. Foi por ti e para ti que finalizo essa etapa, te amo.

Ao meu menino de quatro patas Bruce Wayne, por me ouvir nos momentos difíceis e oferecer seus lambeijos maravilhosos quando por algumas vezes me via chorar, te amo.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na construção deste trabalho, minha sincera gratidão.

Muito obrigada!

*“Olhe lá dentro de você, Simba.
Você é muito mais do que pensa que é”*
Filme – O rei leão

RESUMO

A cultura do abacaxi se destaca como a segunda em valor de produção entre as culturas temporárias no Amazonas, superada apenas pela mandioca. A variedade Turiaçu é a mais produzida e consumida no estado e a maior parte da produção é oriunda de Itacoatiara, que se destaca na 9ª posição em área cultivada e 12ª posição em volume de produção entre os municípios produtores de abacaxi no Brasil. Por outro lado, a produtividade no Amazonas está abaixo dos maiores produtores de abacaxi no Brasil. Uma das possíveis causas para baixa produtividade é a incidência de doenças, incluindo viroses. Entre as formas de controle de doenças recomenda-se o uso de mudas sadias, nesse sentido, tem destaque a produção de mudas micropropagadas *in vitro*. No entanto, não existem protocolos para micropropagação *in vitro* da variedade Turiaçu. Por este motivo, o objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo de micropropagação *in vitro* para o abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivada no Amazonas. Experimentos utilizando gemas apicais e laterais do talo da coroa do fruto foram conduzidos para avaliação de procedimentos de assepsia e o método de micropropagação por estiolamento e multiplicação de brotos. Os explantes foram obtidos a partir de coroas de frutos comerciais da variedade Turiaçu produzidos no município de Itacoatiara, Amazonas e no cultivo *in vitro* utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental. No experimento de assepsia foram avaliadas diferentes concentrações e tempos de imersão do explante em solução de hipoclorito de sódio e avaliadas contaminação, oxidação e sobrevivência dos explantes. No experimento de estabelecimento *in vitro* foram testadas diferentes combinações de concentrações dos reguladores de crescimento ANA e BAP e avaliado o comprimento da parte aérea após 90 dias dos explantes *in vitro*. No experimento de estiolamento, brotações estabelecidas de gemas axilares foram cultivadas por 90 dias em diferentes combinações de concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA e na etapa de regeneração seguimentos nodais de brotos estiolados foram cultivados por 90 dias em meio com diferentes concentrações de BAP. No experimento de enraizamento *in vitro* brotos regenerados foram cultivados durante 45 dias com diferentes concentrações de ANA e avaliadas comprimento da parte aérea, número e comprimento de raízes e peso fresco e seco das brotações. Na aclimatação as mudas provenientes dos tratamentos com diferentes doses de ANA no enraizamento *in vitro* foram cultivadas em casa de vegetação e avaliadas aos 30, 60 e 90 dias para diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento e largura da maior folha, comprimento e largura da 2ª menor folha, comprimento de raiz e teor de clorofila. De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se: a) para assepsia de gemas apicais recomenda-se solução com 0,5% de cloro ativo e para gemas axilares com 1,25% de cloro ativo e 5 min. de imersão na solução asséptica para ambos os tipos de gema; b) para o estabelecimento *in vitro* recomenda-se para gemas apicais meio MS acrescido de $2,3 \mu\text{M L}^{-1}$ de BAP e para gemas axilares meio MS sem reguladores de crescimento; c) para o estiolamento *in vitro* de brotos o

cultivo em meio MS sem reguladores de crescimento; d) para a multiplicação de brotos a partir de seguimentos nodais recomenda-se o cultivo em meio MS acrescido de 18,6 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP, com três subcultivos de 30 dias, condições que proporcionam taxa de multiplicação estimada em 428 brotos regenerados por explante e, e) para o enraizamento *in vitro* de brotos micropropagados recomenda-se o cultivo por 45 dias em meio MS sem reguladores de crescimento.

Palavra-chave: *Ananas comosus*, cultura de tecidos, cultivo *in vitro*

ABSTRACT

The pineapple crop stands out as the second in production value among temporary crops in Amazonas, surpassed only by cassava. The Turiaçu variety is the most produced and consumed in the state and most of the production comes from Itacoatiara, which ranks 9th in cultivated area and 12th in production volume among pineapple-producing municipalities in Brazil. On the other hand, productivity in Amazonas is below the largest pineapple producers in Brazil. One of the possible causes of low productivity is the incidence of diseases, including viruses. Among the forms of disease control, the use of healthy seedlings is recommended, in this sense, the production of micropropagated seedlings *in vitro* is highlighted. However, there are no protocols for *in vitro* micropropagation of the Turiaçu variety. For this reason, the objective of this study was to establish an *in vitro* micropropagation protocol for the Turiaçu pineapple variety grown in Amazonas. Experiments using apical and lateral buds of the fruit crown stalk were conducted to evaluate asepsis procedures and the micropropagation method by estiolation and shoot multiplication. The explants were obtained from commercial fruit crowns of the Turiaçu variety produced in the municipality of Itacoatiara, Amazonas and *in vitro* culture used the MS culture medium (MURASHIGE and SKOOG, 1962). The experiments were carried out at the Laboratory of Plant Tissue Culture of Embrapa Amazônia Ocidental. In the asepsis experiment, different concentrations and immersion times of the explant in sodium hypochlorite solution were evaluated and contamination, oxidation and survival of the explants were evaluated. In the *in vitro* establishment experiment, different combinations of concentrations of the growth regulators ANA and BAP were tested and the length of the aerial part was evaluated after 90 days of the *in vitro* explants. In the stiolation experiment, shoots established from axillary buds were cultivated for 90 days in different combinations of concentrations of the growth regulators BAP and ANA and in the regeneration stage nodal segments of stiolated shoots were cultivated for 90 days in medium with different concentrations of BAP. In the *in vitro* rooting experiment regenerated shoots were cultivated for 45 days with different concentrations of ANA and evaluated for aerial part length, number and length of roots and fresh and dry weight of shoots. In the acclimatization, the seedlings from the treatments with different doses of ANA in the *in vitro* rooting were grown in the greenhouse and evaluated at 30, 60 and 90 days for collar diameter, number of leaves, length and width of the largest leaf, length and width of the 2nd smallest leaf, root length and chlorophyll content. According to the results obtained, it was concluded: a) for asepsis of apical buds, a solution with 0.5% of active chlorine is recommended and for axillary buds with 1.25% of active chlorine and 5 min of immersion in the aseptic solution for both types of buds; b) for *in vitro* establishment, MS medium plus 2.3 μM L⁻¹ of BAP is recommended. b) for *in vitro* establishment, MS medium plus 2.3 μM L⁻¹ of BAP is recommended for apical buds and MS medium without growth regulators is recommended for axillary buds; c) for *in vitro* budding, culture in MS medium without growth regulators is recommended; d) for the multiplication of shoots from nodal

segments, cultivation in MS medium plus 18.6 $\mu\text{M L}^{-1}$ of BAP is recommended, with three subcultures of 30 days, conditions that provide an estimated multiplication rate of 428 regenerated shoots per explant and, e) for the in vitro rooting of micropropagated shoots, cultivation for 45 days in MS medium without growth regulators is recommended.

Keyword: Ananas comosus, tissue culture, in vitro culture.

SUMÁRIO

1. LISTA DE TABELAS	14
2. LISTA DE FIGURAS	17
3. INTRODUÇÃO	20
4. REVISÃO DE LITERATURA	23
4.1 Taxonomia e origem do abacaxizeiro	23
4.2 Aspectos botânicos e morfológicos e adaptação pedoclimática do abacaxizeiro	24
4.3 Melhoramento genético do abacaxizeiro	28
4.4 Variedade Turiaçu cultivada no Amazonas.....	29
4.5 Micropropagação do abacaxizeiro	34
4.5.1 Técnica de estiolamento de brotações para micropropagação do abacaxizeiro	35
5. OBJETIVOS	38
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
6.1 Local de coleta e desenvolvimento da pesquisa.....	39
6.2 Assepsia de gemas axilares e ápices caulinares.....	39
6.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gemas axilares e ápices caulinares	44
6.4 Estiolamento e regeneração de brotações.....	46
6.5 Enraizamento de brotos <i>in vitro</i> e aclimação de plântulas obtidas por micropropagação	51
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÕES	89
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies e variedades botânicas do gênero <i>Ananas</i>	23
Tabela 2. Estudos utilizando a técnica de estiolamento para multiplicação <i>in vitro</i> de abacaxizeiros.....	37
Tabela 3. Tratamentos para a assepsia de gemas e ápices utilizando três concentrações de hipoclorito comercial e dois tempos de imersão. Manaus – Amazonas, 2023.....	40
Tabela 4. Dose dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) avaliadas na fase de estabelecimento <i>in vitro</i> de gemas apicais e axilares extraídas do talo de frutos de abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivada no Amazonas. Manaus, Amazonas, 2023. ..	44
Tabela 5. Tratamentos utilizados para o estiolamento <i>in vitro</i> de brotações do abacaxi Turiaçu. Manaus, Amazonas, 2023.	47
Tabela 6. Tratamentos utilizados na regeneração <i>in vitro</i> de brotações do abacaxi Turiaçu. Manaus, Amazonas, 2023.	50
Tabela 7. Doses do regulador de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) avaliadas para o enraizamento <i>in vitro</i> de mudas micropropagadas do abacaxizeiro variedade Turiaçu. Manaus, Amazonas, 2023.	52
Tabela 8. Resumo da análise de variância para percentual de explantes contaminados em função do tipo de explante (gema apical e gema axilar do talo da coroa do fruto), concentração de hipoclorito de sódio na solução asséptica (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) e tempo de imersão do explante na solução asséptica (5 min. e 10 min.). Manaus, Amazonas, 2023.	57
Tabela 9. Médias para percentual de explantes contaminados com diferentes concentrações da solução de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) usada na assepsia de gemas apicais e gemas axilares isoladas do talo de coroas do fruto de abacaxi da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, após 45 dias da inoculação <i>in vitro</i> . Manaus, Amazonas, 2023.	58
Tabela 10. Resumo da análise de variância para oxidação (%) <i>in vitro</i> de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos do abacaxizeiro variedade Turiaçu em função da concentração (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) e do tempo de imersão (5min e 10 min) em solução asséptica de hipoclorito de sódio. Manaus, Amazonas, 2022.	60
Tabela 11. Médias de oxidação de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxi da variedade Turiaçu cultivado no Amazonas submetidas a assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Manaus, Amazonas, 2022.....	60
Tabela 12. Percentual de gemas axilares dormentes após tratamento asséptico com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,25% e 2,5%). Manaus, Amazonas, 2022.....	61
Tabela 13. Resumo da análise de variância para percentual de explantes sobreviventes em função do tipo de explante (gema apical e gema axilar do	

talo da coroa do fruto), concentração de hipoclorito de sódio na solução asséptica (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) e tempo de imersão do explante na solução asséptica (5 min. e 10 min.). Manaus, Amazonas, 2023.	62
Tabela 14. Média para percentual de gemas apicais e gemas axilares sobreviventes após tratamento asséptico com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) aos 45 dias após a inoculação <i>in vitro</i> . Manaus – Amazonas, 2023.	63
Tabela 15. Médias para comprimento (cm) de gemas apicais após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em combinações com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Manaus, Amazonas, 2023.	65
Tabela 16. Médias para comprimento (cm) de gemas axilares após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> em combinações com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Manaus, Amazonas, 2023.	66
Tabela 17. Efeito dos reguladores de crescimento Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) no comprimento do broto principal de explantes do abacaxizeiro variedade Turiaçu após 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Manaus, Amazonas, 2023.	67
Tabela 18. Médias do comprimento do broto principal (CBPR) no estiolamento <i>in vitro</i> do abacaxizeiro variedade Turiaçu aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftalenoacético (ANA). Manaus, Amazonas, 2023.	68
Tabela 19. Médias das variáveis número de brotos estiolados (NBE), número de nós na unidade experimental (NNU), formação de calo (CALO) e formação de raiz normal (RZ) avaliadas em explantes de abacaxizeiro variedade Turiaçu submetidas ao estiolamento <i>in vitro</i> com diferentes doses de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido naftalenoacético (ANA). Manaus, Amazonas, 2023.	70
Tabela 20. Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis número de brotos estiolados (NBE), número de nós na unidade experimental (NNU), comprimento do broto principal (CBP), formação de calo (CALO) e formação de raiz normal (RZ) em experimento de estiolamento <i>in vitro</i> de brotos de abacaxizeiro variedade Turiaçu. Manaus-Amazonas, 2023.	71
Tabela 21. Resumo da análise de variância para a taxa de multiplicação de brotos regenerados a partir de seguimentos nodais extraídos de brotos estiolados cultivados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) em avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias após o isolamento dos explantes. Manaus, Amazonas, 2023.	73
Tabela 22. Médias para taxa acumulada de multiplicação de brotos regenerados (TAMB) a partir de seguimentos nodais extraídos de brotos estiolados cultivados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP). Manaus, Amazonas, 2023.	77

- Tabela 23.** Média das características comprimento de raízes normais (CR), número de raízes normais (NRN) e número de raízes anormais (NRAN) avaliadas em mudas do abacaxizeiro variedade Turiaçu micropropagadas *in vitro* em cinco doses de ácido naftaleno acético (ANA) após 45 dias de cultivo *in vitro*. Manaus, Amazonas, 2023.79
- Tabela 24.** Resumo da análise de variância para massa fresca (MF) e massa seca (MS) de mudas de abacaxizeiro variedade Turiaçu enraizadas, após 45 dias de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de ANA. Manaus, Amazonas, 2023.....80
- Tabela 25.** Média das variáveis massa fresca (MF) e massa seca (MS) de mudas de abacaxizeiro variedade Turiaçu enraizadas, após 45 dias de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de ANA. Manaus, Amazonas, 2023.81
- Tabela 26.** Resumo da análise de variância para as variáveis diâmetro do coleto (DC), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CFMA), largura da maior folha (LFMA), comprimento da menor folha (CFME), largura da menor folha (LFME), comprimento de raiz (CR) e teor de clorofila (CLOR), avaliadas em plantas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu produzidas com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) após 90 dias de aclimação. Manaus, Amazonas, 2023.....84
- Tabela 27.** Médias e estatísticas descritivas das variáveis diâmetro do coleto (DC), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CFMA), largura da maior folha (LFMA), comprimento da menor folha (CFME), largura da menor folha (LFME), comprimento de raiz (CR) e teor de clorofila (CLOR), avaliadas em plantas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu produzidas com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA), aos 90 dias aclimatadas. Manaus, Amazonas, 2023.85

2. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Abacaxizeiro. Morfologia da planta. (Fonte: Reinhardt e Cunha, 2006). ...25
- Figura 2.** Disposição das folhas no abacaxizeiro. (Fonte: Souza; Reinhardt, 2009).26
- Figura 3.** Inflorescência do abacaxi Turiaçu-AM. (Fonte: Autora).....27
- Figura 4.** Abacaxizeiro variedade Turiaçu-AM. (Fonte: Autora).....29
- Figura 5.** Folhas de muda tipo filhote da variedade Turiaçu-AM. (Fonte: Autora)30
- Figura 6.** Abacaxizeiro Turiaçu em casa de vegetação (A) e pesagem do fruto maduro (B) cultivado na Embrapa Amazônia Ocidental. (Fonte: Erivan Lima).31
- Figura 7.** Abacaxizeiro Turiaçu em Itacoatiara-AM com cochonilha. (Fonte: Autora).32
- Figura 8.** Procedimentos realizados para a assepsia de ápices caulinares e gemas axilares. Mudanças do tipo coroa (A), desfolhagem das mudas (B), talo da coroa exposto (C), assepsia dos talos com álcool 70% (D), individualização dos explantes (E) e assepsia dos explantes (Fonte: Autora).....41
- Figura 9.** Procedimento realizado na assepsia e estabelecimento ápices caulinares e gemas axilares. Individualização das gemas (A). Assepsia das gemas com hipoclorito comercial a 1,25 % (cloro ativo) por 10 minutos de imersão (B). Redução do ápice da muda do tipo coroa (C). Ápice reduzido a aproximadamente 1 centímetro de comprimento para assepsia (D). Assepsia dos ápices com hipoclorito a 5 % (cloro ativo) por 5 minutos de imersão (E). Redução do ápice para inoculação utilizando lupa (F). (Fonte: Pamela Harada).42
- Figura 10.** Demonstração dos parâmetros de avaliação no desenvolvimento de gemas apicais e gemas axilares aos 90 dias de cultivo *in vitro*. Presença de calo (A), medição da parte aérea (B), medição da raiz (C), aspecto raiz normal (D) e aspecto raiz anormal (E). (Fonte: Autora).....45
- Figura 11.** Demonstração da brotação antes da redução em câmara de fluxo laminar (A) e brotação reduzida e inserida em meio contendo reguladores de crescimento para o estiolamento *in vitro* (B). (Fonte: Autora).48
- Figura 12.** Variáveis do experimento de estiolamento de brotações *in vitro*. Identificação e contagem dos nós (A e C), calo (B), pilosidade nas raízes (D) medição da haste das brotações (E). (Fonte: Autora)49
- Figura 13.** Variáveis do experimento de enraizamento *in vitro*. Comprimento de parte aérea e comprimento de raiz normal (A), aspecto de raiz anormal (B) massa fresca (C) e massa seca (D) da unidade experimental. (Fonte: Autora).....53
- Figura 14.** Distribuição das repetições para aclimatização e secagem. (Fonte: Autora).....54
- Figura 15.** Avaliação aos 90 dias de aclimação de mudas micropropagadas *in vitro* de abacaxi variedade Turiaçu cultivado no Amazonas. Diâmetro do

coleto (A), comprimento e largura da maior folha da roseta (B e C), comprimento e largura da segunda menor folha da roseta (D e E), comprimento de raiz (F) medição de clorofila (G) (Fonte: Autora).....	56
Figura 16. Gemas axilares com a presença de contaminantes, fungos ou bactérias. (Fonte: Autora).	59
Figura 17. Valores percentuais de contaminação, oxidação, dormência e sobrevivência final de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxizeiro variedade Turiaçu submetidas a assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Valores para cada tipo de resposta do explante que são seguidos pela mesma letra nas diferentes concentrações da solução de hipoclorito não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (Fonte: Autora).	64
Figura 18. Seguintos nodais inoculados <i>in vitro</i> após fase de estiolamento dos brotos, condição no dia do isolamento e inoculação do explante (A), sete dias (B) e 30 dias (C) após a inoculação. (Fonte: Autora).....	72
Figura 19. Taxa de multiplicação de brotos a partir do cultivo de seguintos nodais extraídos de brotos estiolados cultivados em diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) em avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias após o isolamento dos explantes. Médias dentro de cada concentração de BAP seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade (Fonte: Autora).	74
Figura 20. Equações de regressão para número médio de brotos regenerados em função da dose do regulador de crescimento Benzilaminopurina (BAP) em avaliações aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação <i>in vitro</i> de seguimento nodais extraídos de brotos estiolados de abacaxizeiro variedade Turiaçu gerados a partir de gemas axilares extraída da coroa do fruto. Médias obtidas em unidades experimentais com quatro seguintos nodais. (Fonte: Autora).	75
Figura 21. Equações de regressão para taxa acumulada de multiplicação de brotos (TAMB) em função da dose do regulador de crescimento Benzilaminopurina (BAP) após a inoculação <i>in vitro</i> de seguimento nodais extraídos de brotos estiolados de abacaxizeiro variedade Turiaçu gerados a partir de gemas axilares extraída da coroa do fruto. (Fonte: Autora). ...	78
Figura 22. Equações de regressão para massa fresca (A) e massa seca (B) de plântulas de abacaxizeiro variedade Turiaçu produzidas <i>in vitro</i> em função da concentração do regulador de crescimento ANA na fase de enraizamento das plântulas (Fonte: Autora).....	82
Figura 23. Variáveis diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento da maior folha, largura da maior folha, comprimento da menor folha e largura da menor folha de mudas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu, aos 30, 60 e 90 dias de aclimação. Médias de diferentes períodos seguidas de mesma letra minúsculas, dentro da mesma concentração, não diferem estatisticamente entre si (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).	87
Figura 24. Aclimação em casa de vegetação de mudas do abacaxizeiro variedade Turiaçu obtidas por micropropagação <i>in vitro</i> usando. Dia do transplante	

para casa de vegetação (A); 30 dias (B), 60 dias (C) e 90 dias após o
transplante (D). (Fonte: Autora).....88

3. INTRODUÇÃO

Em 2021 a produção mundial de abacaxi foi de 28,6 milhões de toneladas, destacando-se a Ásia com mais de 13 milhões de toneladas, seguida pelas Américas (10,2 milhões toneladas), África (5.2 milhões toneladas) e Oceania (113 mil toneladas) (FAOSTAT, 2021). O Brasil é o 4º maior produtor de abacaxi no mundo com 63.589 mil ha destinado a cultura e cerca de 2,3 milhões de toneladas de fruto colhidos em 2021, atrás da Costa Rica (2,9 milhões de toneladas), Indonésia (2,8 milhões de toneladas) e Filipinas (2,8 milhões de toneladas) (FAOSTAT, 2021). De acordo com estatísticas do IBGE (2021), no Brasil as regiões Norte, Nordeste e Sudeste são as maiores produtoras e, nessas regiões, destacam-se, respectivamente, os estados do Pará (361.027 mil toneladas), Paraíba (263.370 mil toneladas) e Minas Gerais (156.139 mil toneladas) como maiores produtores.

O Amazonas é o terceiro maior estado produtor de abacaxi da região Norte, com 2.389 mil hectares cultivados e 41.357 mil toneladas produzidas, com destaque para o município de Itacoatiara que é o maior produtor do estado (IBGE, 2021). Em Itacoatiara a produção de abacaxi está concentrada nas localidades de Novo Remanso e Vila do Engenho, onde predomina o uso da variedade Turiaçu, muito apreciada e consumida pela população do Amazonas (GARCIA *et al.*, 2013). Recentemente, o abacaxi produzido nessa região passou a ser identificado com Indicação Geográfica “Novo Remanso” pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2020).

A variedade Turiaçu é cultivada no Amazonas há décadas e possui características peculiares, como elevada doçura e a baixa acidez de polpa e tolerância ou resistência à doença fusariose (*Fusarium guttiforme*), um dos maiores problemas da abacaxicultura nacional (GARCIA *et al.*, 2013). Devido à gravidade da fusariose para a abacaxicultura brasileira, os programas de melhoramento genético desenvolvidos no país têm entre seus principais objetivos o desenvolvimento de cultivares resistente a doença. Estima-se ser possível aumentar de 20% a 30% a produtividade da abacaxicultura nacional com o uso de cultivares de alta produtividade e resistentes a fusariose (COPPENS D’EECKENBRUGGE *et al.*, 2018). Até o presente momento não houve relatos da fusariose nos plantios comerciais da variedade de abacaxizeiro Turiaçu no Amazonas. No entanto, o principal problema

fitossanitário nos cultivos da variedade Turiaçu na região é o vírus PMWaV (*Pineapple mealybug wilt-associated virus*), agente causal da Murcha do abacaxizeiro, que está entre os principais fatores responsáveis pela redução de produtividade e, conseqüentemente, do lucro dos cultivos de abacaxizeiro no Amazonas.

O uso de mudas não contaminadas é uma das principais estratégias para o controle do vírus PMWaV no abacaxizeiro, o que pode ser conseguido pelo controle de origem, obtendo mudas de plantios não contaminados, por métodos e tratamentos de mudas e também por técnicas de micropropagação *in vitro*. As técnicas de micropropagação *in vitro* se destacam pela alta qualidade sanitária das mudas produzidas e pela capacidade de produção de mudas em larga escala em pequeno espaço e em tempo relativamente curto (COPPENS D'EECKENBRUGGE *et al.*, 2018). Contudo, para que a multiplicação *in vitro* seja realizada de forma eficiente é necessário o desenvolvimento de protocolos que atendam necessidades específicas da espécie ou genótipo de interesse. Diferentes métodos podem ser explorados para micropropagação do abacaxizeiro, os quais podem utilizar meio líquido ou meio semissólido, biorreatores, diferentes composições do meio de cultura, com variação na composição de nutrientes minerais, fontes de carbono, vitaminas, tipos e concentrações de reguladores de crescimento, tipo de explante, condições de cultivo (recipiente, luz, temperatura e etc.), entre outros (REINHARDT *et al.* 2018).

Além das condições de cultivo *in vitro*, é também fundamental estabelecer procedimentos de assepsia dos explantes, sendo este, uma das etapas mais importantes dos protocolos, pois seu sucesso garante a eliminação de contaminantes como fungos e bactérias (ANDRADE, 2002). A produção comercial de mudas de abacaxizeiro por micropropagação *in vitro* é regulamentada pela Instrução normativa 43/2013 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2022a), que dispõe sobre o registro das plantas matrizes usadas para obtenção do material propagativo, tipo de explante para propagação *in vitro*, método de micropropagação, número de subcultivos, entre outras especificações.

Na literatura são encontrados diversos protocolos para micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro, os quais utilizam como explantes, principalmente, gemas axilares (gemas laterais) extraídas do talo das mudas (filhote, rebentão ou coroa), no entanto, também são utilizadas gemas apicais (protocolos para limpeza viral) e segmentos de folhas (usadas em protocolos de multiplicação via embriogênese e

organogênese). As principais técnicas de micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro são a multiplicação de brotações e o estiolamento de brotos com repicagem de entrenós (Kiss *et al.*, 1995).

Apesar da importância econômica e social do abacaxizeiro variedade Turiaçu, do potencial da micropropagação *in vitro* na produção de mudas de alta qualidade sanitária e do impacto dessa qualidade no aumento da produtividade dos plantios comerciais, não existem protocolos de micropropagação recomendados para a variedade. Nesse contexto, buscou-se nessa pesquisa desenvolver um protocolo para micropropagação *in vitro* da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Taxonomia e origem do abacaxizeiro

O abacaxizeiro pertence ao reino Plantae, classe Lilipsida, ordem Poales, família Bromeliaceae e gênero *Ananas*. O nome “abacaxi” tem origem indígena, oriundo de “iuaka’ti” que quer dizer *fruta cheirosa*, característica sensorial associada ao fruto quando maduro, sendo conhecida popularmente como abacaxi (no português brasileiro), piña (Espanhol) e pineapple (Inglês) (SOUZA *et al.*, 2017).

No gênero *Ananas*, o mais importante da família Bromeliaceae, destacam-se duas espécies: *Ananas comosus* (L.) Merrill e *Ananas macrodontes* Morren. A espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill é composta por cinco variedades botânicas: *A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *microstachys*, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *paraguayensis* (Coppens D’EECKENBRUGGE; LEAL, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies e variedades botânicas do gênero *Ananas*.

Espécie	Variedade	Importância	Incidência	Principais características
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill	<i>A. comosus</i> var. <i>ananassoides</i>	Ornamental	Silvestre	Suporta seca; folhas largas; espinhos agressivos; fruto pequeno.
	<i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i>	Ornamental/Cerca viva	Cultivada	Folhas compridas; largas com espinhos grandes; inflorescência rosa brilhante.
	<i>A. comosus</i> var. <i>erectifolius</i>	Extração de fibras	Cultivada	Plantas de porte médio; fruto pequeno e não comestível.
	<i>A. comosus</i> var. <i>paraguayensis</i>	Ornamental	Silvestre	Folhas largas com alguns espinhos invertidos.
	<i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i>	Comestível	Cultivada	Frutos doces, com polpa de coloração branca à amarela
<i>Ananas macrodontes</i> Morren	----	Ornamental/Cerca viva	Cultivada	Ausência de coroa e rebentões.

Fonte: Coppens d’Eeckengrugge *et al.*, 2018.

De acordo com revisão de Crestani *et al.* (2010), o centro de origem das espécies do gênero *Ananas* pode ter sido o Brasil Central ou o Paraguai, de onde se disseminou para outras regiões do mundo. O Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero *Ananas*, todas as espécies do gênero são encontradas no país, em forma silvestre ou cultivada, com ocorrência em praticamente todas as suas regiões, e com grande variabilidade genética, mas a espécie *A. comosus* (L.) Merrill é a mais conhecida e de maior importância econômica devido ao elevado consumo do fruto fresco, uso como planta ornamental e produção de fibras (SOUZA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2012; MANETTI *et al.*, 2009; FERREIRA; CABRAL, 1993).

Duval *et al.* (1997) relataram grande diversidade genética encontrada em coletas de material silvestre e cultivado do gênero *Ananas* na bacia amazônica brasileira, incluindo os estados do Amapá, Acre, Amazonas (Rios Negro, Solimões) e norte do Mato Grosso. Os autores também realizaram coletas na Guiana Francesa e Sul do Brasil. Em todas as regiões de coleta foram encontradas variedades de *A. comosus*, demonstrando ampla variabilidade genética existente para a espécie, contudo, com maior variabilidade encontrada nas coletas no Acre, na Bacia Amazônica e na Guiana Francesa do que no Sul do Brasil.

4.2 Aspectos botânicos e morfológicos e adaptação pedoclimática do abacaxizeiro

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, perene e herbácea, adaptada a climas tropicais onde as temperaturas variam de 22 a 32 °C e a solos ácidos (pH de 4,5 a 5,5), bem drenados e de textura média ou arenosa, que facilitem o crescimento de suas raízes que, de modo geral, variam de 15 a 20 centímetros de comprimento. A cultura também é muito exigente em luz e umidade, necessitando de 6 a 8 horas de exposição solar e ambientes com umidade relativa do ar em torno de 70% (COPPENS D'ECKENGRUGGE *et al.*, 2018; REINHARDT *et al.*, 2000).

O caule do abacaxizeiro, também chamado de talo, é curto e apresenta espessura grossa. O talo é a parte da planta que fica diretamente inserida no solo, onde ocorre o desenvolvimento radicular, apresenta gemas axilares que posteriormente darão origem à mudas do tipo rebentão e filhote-rebentão (Figura 1). Acima do talo está localizado o pedúnculo, responsável por sustentar a inflorescência e posteriormente o fruto, no qual também são produzidas gemas axilares que dão

origem as mudas chamadas de filhote. Acima do fruto é gerada uma muda chamada de coroa, que normalmente acompanha o fruto na comercialização (REINHARDT; CUNHA, 2006; REINHARDT *et al.*, 2000).

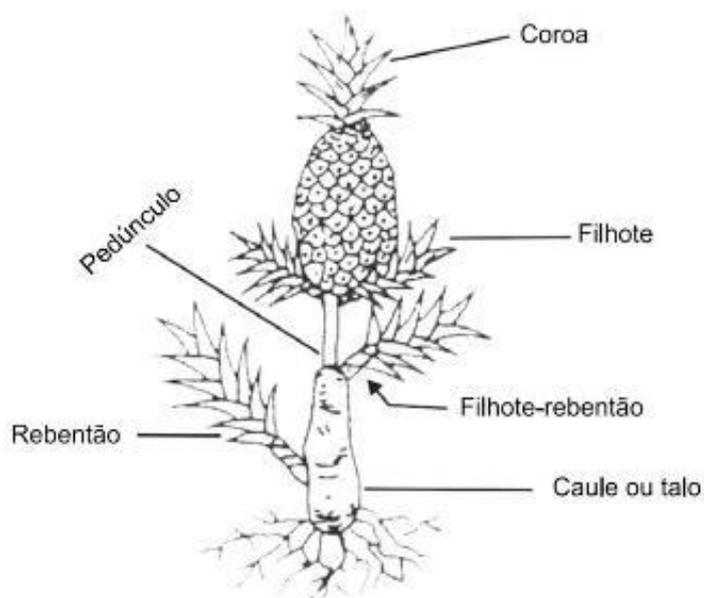


Figura 1. Abacaxizeiro. Morfologia da planta. (Fonte: Reinhardt e Cunha, 2006).

As folhas do abacaxizeiro são classificadas de A, B, C, D, E e F (Figura 2), conforme sua posição na planta e formato, partindo da mais velha (em posição externa) a mais nova (em posição interna) na muda. As folhas D são metabolicamente as mais jovens e a mais ativas entre as folhas adultas, por isso são normalmente utilizadas para análise do estado nutricional e do crescimento vegetativo da planta (SILVA *et al.*, 2004; REINHARDT *et al.*, 2000).

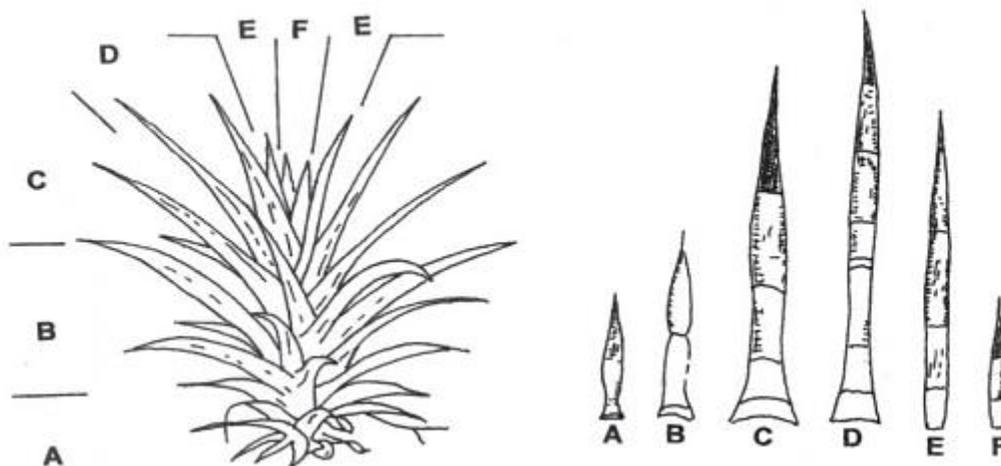


Figura 2. Disposição das folhas no abacaxizeiro. (Fonte: Souza; Reinhardt, 2009).

A floração do abacaxizeiro pode ser natural ou induzida artificialmente, entretanto, em plantios comerciais para produção de fruto a indução floral artificial é adotada com o intuito de uniformizar e padronizar a frutificação. O carbureto de cálcio e o ethefon (ácido 2-cloroetilfosfônico) são os principais produtos adotados para indução floral no abacaxizeiro (GONDIM; AZEVEDO, 2002; REINHARDT *et al.*, 2017) e, de modo geral, o efeito da indução é observado de 40 a 50 dias após a aplicação do produto.

De acordo com as descrições apresentadas por Reinhardt *et al.* (2000) e Souza *et al.* (2017), o fruto abacaxi é do tipo sincarpo, formado por múltiplas bagas, as quais são geradas a partir do agrupamento de 100 a 200 flores individuais dispostas em espiral ao redor do pedúnculo (eixo central). Nas variedades cultivadas para produção de frutos para consumo, estes raramente apresentam sementes. No ápice do fruto é formada uma coroa de folhas em forma de roseta, as quais são originadas das gemas axilares da parte terminal do caule e se desenvolvem durante a formação do fruto (Figura 3).



Figura 3. Inflorescência do abacaxi Turiaçu-AM. (Fonte: Autora).

Naturalmente, a reprodução do abacaxizeiro pode ser realizada de forma sexuada, com fecundação e produção de sementes, ou assexuada (vegetativa), a partir de mudas produzidas pela planta. A reprodução sexuada apresenta grande importância para os programas de melhoramento genético, sendo explorada em cruzamentos intra e interespecíficos na geração de população segregantes. A produção de frutos em plantas oriundas de sementes demora mais do que nas plantas obtidas por propagação vegetativa, aproximadamente, três anos e meio após a germinação das sementes, com variação desse tempo em função da variedade e das condições ambientais (COPPENS D'EECKENGRUGGE *et al.*, 2018).

Devido a precocidade e uniformidade, os plantios comerciais são estabelecidos usando mudas produzidas em diferentes partes da planta-matriz, como as do tipo rebentão, filhote-rebentão e filhote (Figura 2), as quais são colhidas após atingirem o tamanho de aproximadamente 20 a 30 centímetros (REINHARDT; CUNHA, 2006). O desenvolvimento da planta pode ser dividido em três fases: **vegetativa**, com início no plantio que se estende até a floração da planta (seja ela natural ou induzida), com média em 12 meses dependendo do manejo e da variedade; **reprodutiva** que corre entre a floração e a colheita do fruto, com duração de 5 a 6 meses, e **propagativa**, que sobrepõe a fase anterior e vai da indução floral até a colheita das mudas, variando de 4 a 10 meses para a produção de mudas do tipo filhote, a mais utilizada nos plantios comerciais (SILVA *et al.*, 2004). Com o uso da indução floral, o ciclo completo da

cultura varia de 16 a 18 meses, sendo influenciado por fatores como genótipo, clima, tratos culturais, tamanho e peso de mudas utilizadas no plantio (SANCHES; MATOS, 2013).

A densidade do plantio do abacaxizeiro para produção de frutos comestíveis está diretamente relacionada aos rendimentos e custos de produção. O espaçamento entre as plantas depende de alguns fatores, como a variedade utilizada, o destino da produção e o nível tecnológico do produtor. Os principais espaçamentos recomendados para plantios comerciais são em fileiras simples com 0,9 ou 1,0 m entre linhas e 0,3 m entre plantas na linha, resultando em 37.030 plantas ha⁻¹ e 33.333 plantas ha⁻¹, respectivamente, e, em fileira dupla com 1,0 m ou 1,2 m entre fileira x 0,40 m entre linhas na fileira x 0,40 m entre plantas na linha, resultando em 47.619 plantas ha⁻¹ e 31.250 plantas ha⁻¹, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2017).

As cultivares Smooth Cayenne e Pérola são as mais plantadas no país, a primeira produzida principalmente para exportação e a segunda para o mercado interno (ARAÚJO *et al.*, 2012). No entanto, a cultivar Smooth Cayenne é gravemente afetada pelo vírus causal da Murcha do abacaxizeiro, doença severa e que causa altos impactos negativos na produção e qualidade do fruto.

4.3 Melhoramento genético do abacaxizeiro

Os programas de melhoramento genético do abacaxizeiro comestível, em geral, têm como objetivo desenvolver cultivares com alta produtividade, adaptadas as condições climáticas locais, com frutos de alta qualidade e adequados ao mercado (indústria ou consumo *in natura*), resistentes ou tolerantes as principais pragas e doenças, como a fusariose (*Fusarium guttiforme*) e a murcha do abacaxizeiro (CABRAL; D'EECKENGRUGGE *et al.*, 2002; REINHARDT *et al.*, 2000).

No Brasil, as principais pesquisas voltadas para o melhoramento genético do abacaxizeiro são conduzidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), ambos com cultivares já lançadas no mercado. No site do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2023b) existem 24 cultivares de abacaxizeiro registradas.

Além das cultivares registradas pelos programas de melhoramento genético, existem também no Brasil diversas variedades locais e populações silvestres de

abacaxi (CABRAL; COPPENS D'EECKENBRÜGGE, 2002). No Amazonas, predomina nos cultivos comerciais uma variedade local, denominada pelos produtores de Turiaçu.

4.4 Variedade Turiaçu cultivada no Amazonas

Relatos indicam que o abacaxi cultivado no Amazonas denominado de Turiaçu (Figura 4) recebe esse nome devido ao local de origem do material, município de nome Turiaçu, Maranhão, de onde foi trazido pelos produtores pioneiros da cultura no estado, há quase 100 anos (GARCIA *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2012).

No Amazonas, desde sua introdução a variedade é cultivada para fins comerciais nas localidades de Novo Remanso e Vila do Engenho no município de Itacoatiara e também no município de Careiro da Várzea (QUEIROZ *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2013), sendo essas localidades as principais produtoras de abacaxi do estado.



Figura 4. Abacaxizeiro variedade Turiaçu-AM. (Fonte: Autora).

Recentemente o abacaxi produzido no distrito de Novo Remanso, município de Itacoatiara-AM, recebeu o selo de Indicação Geográfica (IG) na categoria Indicação de Procedência (IP) (Revista da Propriedade Industrial, nº 2579, julho de 2020), reconhecendo as particularidades e as qualidades do abacaxi produzido nessa localidade.

Estudos sobre a variedade Turiaçu cultivada no Amazonas são escassos, faltam informações relacionadas à botânica, morfologia e manejo, entre outras. Autores como Garcia *et al.* (2013) e Melo *et al.* (2013) apresentam algumas informações relacionadas as características da planta e dos plantios comerciais da variedade Turiaçu. Garcia *et al.* (2013) realizaram análise foliar de plantas de sete diferentes áreas produtoras no estado, destacaram o desequilíbrio entre os níveis dos nutrientes absorvidos pelas plantas e relataram sintomas relacionados a deficiência de potássio e cobre, elementos estes essenciais para o bom desenvolvimento do abacaxizeiro.

As plantas da variedade Turiaçu apresentam em média 34,8 folhas de coloração verde-escuro, com folha D apresentando comprimento médio de 101,9 cm e largura média de 5,9 cm, e presença de espinhos ao longo das bordas do limbo foliar (Figura 5) (GARCIA *et al.*, 2013).



Figura 5. Folhas de muda tipo filhote da variedade Turiaçu-AM. (Fonte: Autora)

A taxa de floração natural do abacaxizeiro Turiaçu cultivado no Amazonas é considerada baixa, isto pode estar relacionado ao clima, temperatura e latitude da região, por isso, em plantios comerciais é necessário realizar a indução floral para obter alta taxa e uniformidade na floração das plantas (MELO *et al.*, 2013). Segundo

Garcia *et al.* (2013), no Amazonas, o carbureto de cálcio em estado líquido é o indutor utilizado com maior frequência pelos produtores para a indução floral na variedade Turiaçu. De acordo com Melo *et al.* (2013), com a aplicação da solução com 100 g carbureto de cálcio para cada 15 litros de água é obtida floração de mais de 98% das plantas.

O fruto da variedade Turiaçu cultivado no Amazonas, quando maduro, apresenta casca de coloração amarelada, média de 11 centímetros de diâmetro, peso médio (sem coroa) de 1,65 kg, valor superior ao peso médio de frutos produzidos em cultivos da variedade no Maranhão, 1,38 kg. O abacaxi Turiaçu destaca-se não apenas pela doçura e coloração da polpa do fruto, mas também pela baixa acidez (ácido cítrico 0,35) e alta concentração de sólidos solúveis totais chegando a cerca de 16,5 ° Brix (GARCIA *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2012) (Figura 6).



Figura 6. Abacaxizeiro Turiaçu em casa de vegetação (A) e pesagem do fruto maduro (B) cultivado na Embrapa Amazônia Ocidental. (Fonte: Erivan Lima).

Entretanto, as principais pragas e doenças que afetam a abacaxicultura no país ocorrem também no Amazonas, como ácaro alaranjado (*Dolichotetranychus floridanus*), broca do fruto (*Strymon megarus*) e murcha do abacaxizeiro, doença associada à cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*) que consiste em um dos maiores

problemas da abacaxicultura no estado (GARCIA *et al.*, 2013). Na figura 7, nota-se a presença desses pequenos insetos transmissores do vírus causal da murcha do abacaxizeiro na bainha da folha de uma planta adulta em uma área de plantio em Novo Remanso.



Figura 7. Abacaxizeiro Turiaçu em Itacoatiara-AM com cochonilha. (Fonte: Autora).

A cochonilha é uma praga que se alimenta da seiva do abacaxizeiro e se aloja nas bases foliares (Figura 7) e raízes. Todavia, quando há expansão da praga, esta pode ser encontrada nos frutos, mudas e coroas, e nestas áreas a cochonilha injeta o vírus (PMWaV) presente em sua saliva e que causa a murcha do abacaxizeiro. Em campo, a manifestação dos sintomas da doença pode facilmente ser notada, no entanto, existe também a possibilidade de plantas infectadas e sem sintomas serem utilizadas como fonte de mudas para novas áreas de plantios, dificultando a execução das medidas de controle da doença (GARCIA *et al.*, 2013; SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2004).

A murcha do abacaxizeiro foi descrita pela primeira vez no Havaí em 1910 e essa associação com as cochonilhas foi identificada pela primeira vez em 1925 (GREEN *et al.*, 2020). A doença é tão grave que pode impedir o desenvolvimento normal do fruto ou até causar a morte da planta antes mesmo de ter ocorrido à frutificação (SANTA-CECÍLIA *et al.*, 2004).

Os sintomas visíveis na planta são: coloração avermelhada nas folhas mais internas e enrolamento interno das margens das folhas com a ponta das folhas necrosadas e secas (DEY *et al.*, 2018). Muitas vezes os sintomas da infecção nas plantas são confundidos com sintomas provocados pelo déficit hídrico, tendo em vista que os sintomas são mais aparentes no período de seca. O controle da murcha do abacaxizeiro pode ser realizado pela integração de medidas, como o uso de inseticidas contra a cochonilha, devidamente registrados para a cultura (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA), e o uso de mudas sadias.

Apesar do bom retorno obtido atualmente pelos produtores com o cultivo da variedade Turiaçu no Amazonas, como a multiplicação vegetativa vem sendo feita há muitos anos, é possível que o acúmulo de patógenos não sintomáticos, especificamente, com vírus PMWaV esteja reduzindo o potencial genético da variedade, portanto, limitando a produtividade e qualidade dos frutos e reduzindo o lucro do produtor. Nesse contexto, devem ser buscadas alternativas para produção de mudas da variedade Turiaçu com garantia de qualidade sanitária, contribuindo dessa forma para aumentar a produtividade e a qualidade dos frutos, conseqüentemente, o lucro do produtor. A limpeza viral em abacaxizeiro pode ser realizada por hidrotermoterapia (LOPEZ, 2018) e pelo cultivo *in vitro* de meristema apical (CONCEIÇÃO, 2014). Mudas obtidas por estratégias de limpeza clonal, após devidamente indexadas (mudas livres de vírus), são utilizadas no estabelecimento de campos de matrizes para produção de mudas convencionais. O próprio produtor pode adquirir mudas micropropagadas *in vitro*, que passaram pelo processo de limpeza viral e indexação, para multiplicação e plantio em maior escala usando as mudas tipo filhote, assim, reduzindo o custo das mudas.

Apesar do custo das mudas micropropagadas ser inicialmente mais elevado do que o das mudas tipo filhote, é possível que os ganhos com aumento da produtividade e qualidade do fruto justifiquem o uso desse tipo de muda, principalmente se as mudas foram utilizadas para estabelecer campo de multiplicação para produção de mudas do tipo filhote. Para que o uso de mudas micropropagadas seja avaliado, antes é necessário um protocolo eficiente de micropropagação *in vitro* para a variedade Turiaçu. Além da produção de mudas sadias, um protocolo eficiente de micropropagação da variedade Turiaçu poderá ser utilizado na clonagem em larga

escala de plantas identificadas como superiores dentro da variedade, considerando que pode existir variação genética dentro do material de plantio. De maneira geral, com um protocolo de micropropagação *in vitro* eficiente será possível produzir mudas sadias em tempo e espaço reduzido e em qualquer época desejável.

4.5 Micropropagação do abacaxizeiro

A micropropagação *in vitro* tem contribuído para programas de melhoramento genético do abacaxizeiro na multiplicação em larga escala de genótipos selecionados e também na limpeza de genótipos cultivados produzindo mudas isentas de pragas e doenças. O primeiro estudo sobre a micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro foi desenvolvido por Aghion e Beauchesne em 1960, desde então protocolos estão sendo desenvolvidos ou otimizados para diversas variedades do gênero *Ananas* (SANTOS *et al.*, 2015; ZURANDA *et al.*, 2011; BARBOZA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2002). O desenvolvimento de protocolos deve considerar fatores como genótipo, tipo de explante e composição do meio de cultura.

O comportamento morfogênico de espécies cultivadas *in vitro* em sua maioria são diferentes, devido ao fator genótipo, isto demonstra a necessidade de protocolos específicos. Na micropropagação do abacaxizeiro a literatura científica mostra que o genótipo apresenta grande influência no comportamento *in vitro*, por exemplo, Silva *et al.* (2016) avaliaram a viabilidade e o potencial de propagação de 66 genótipos de quatro variedades botânicas, no entanto, observaram que após quatro subcultivos, houve diferença não apenas entre as variedades botânicas, mas também nos genótipos de uma mesma variedade.

Na micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro utiliza-se, com maior frequência, gemas axilares, devido sua grande disponibilidade nas mudas. Contudo, quando o objetivo é a limpeza viral, deve ser utilizado o meristema apical, embora este apresente lento desenvolvimento *in vitro*. Uma vez estabelecido o explante *in vitro*, a micropropagação pode ser realizada por organogênese direta com multiplicação de brotos. Para tornar o processo de micropropagação mais rápido, Kiss *et al.* (1995) propuseram a técnica de estiolamento de *in vitro*.

O meio de cultura e os reguladores de crescimento também apresentam grande influência nas respostas morfogenéticas na micropropagação do abacaxizeiro. Em

geral, o meio de cultura proposto por Murashige e Skoog (1962) e os reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) são os mais utilizados nos protocolos recomendados para a micropropagação *in vitro* de abacaxizeiros. O ANA é uma auxina que promove alongamento celular e crescimento vegetal e o BAP é uma citocinina que promove a divisão celular, ambos associados ou não, favorecem o crescimento e a multiplicação de brotações (OLIVEIRA-CAUDURO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2008).

Contudo, o uso de auxinas e citocininas no meio de cultura, bem como, doses e número de subcultivos precisam ser adequadas, pois podem contribuir para ocorrência de modificações genéticas no DNA das plantas cultivadas *in vitro* (Variação somaclonal) (KOHPAI; FARAHANI; NOORMOHAMMADI, 2017).

4.5.1 Técnica de estiolamento de brotações para micropropagação do abacaxizeiro

A técnica de micropropagação do abacaxizeiro pelo estiolamento de brotações consiste em induzir o alongamento dos entrenós dos brotos na ausência de luz e, na sequência, a produção de brotos a partir dos nós dos brotos estiolados. As brotações mantidas no escuro fazem com que os entrenós do abacaxizeiro se alonguem, separando os nós, que na presença de luz continuariam próximos, esta característica de distanciamento entre os nós, favorece a formação de gemas axilares e facilita a individualização das brotações regeneradas (BARBOSA; CALDAS, 2001). Além da ausência de luz, alguns reguladores de crescimento, como as auxinas podem contribuir para o estiolamento *in vitro* de brotações, assim como as citocininas podem garantir melhor resposta na regeneração (CARVALHO *et al.*, 2009).

O broto submetido ao estiolamento geralmente é obtido a partir de uma gema axilar cultivada *in vitro*. Considerando que uma planta pode produzir mais de uma dezena de mudas e que de cada muda podem ser extraídas dezenas de gemas axilares, um grande número de mudas pode ser produzido a partir de uma única planta matriz pela micropropagação *in vitro* pelo método do estiolamento de brotos. Kiss *et al.* (1995), autores do método, relataram a possibilidade de produzir até 80.000 plantas regeneradas em um ano a partir de uma única planta matriz.

Uma das grandes vantagens da micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro pelo método do estiolamento é que são evitadas lesões nas regiões de regeneração a partir

das quais serão formados novos brotos, diminuindo ou eliminando a formação de massa calosa, dessa forma, reduzindo a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal e geração de variabilidade genética, evitando assim a ocorrência de características indesejadas nas plantas geradas (SOUZA *et al.*, 2019). Além disto, o método de estiolamento é capaz de reduzir para aproximadamente três meses o processo de micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro, conseqüentemente, proporcionar economia de reagentes usados no meio cultura e de mão de obra na manipulação do material cultivado (CARVALHO *et al.*, 2009).

A técnica de estiolamento de brotos para micropropagação *in vitro* de abacaxizeiros já foi empregado para diversas cultivares e variedades botânicas de *Ananas comosus*. Os estudos realizados mostram condições genótipos específicas para aplicação da técnica de estiolamento de brotos para a micropropagação de abacaxizeiros, com variação na necessidade de adição e na concentração de reguladores de crescimento (Tabela 2).

Diante do potencial do método do estiolamento de brotações para micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro, e de que não existem relatos da aplicação deste com a variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, são necessários estudos que permitam otimizar um protocolo eficiente para uso do método nesta variedade.

Tabela 2. Estudos utilizando a técnica de estiolamento para multiplicação in vitro de abacaxizeiros.

AUTORES	CULTIVAR	EXPLANTE	MEIO	ESTIOLAMENTO	REGENERAÇÃO
KISS <i>et al.</i> 1995	Cayenne Oriental e Espanhola Roja	Brotações	³ MS ⁴ N6	ANA (10 µM)	Cinetina e ⁵ BA (20 µM e 25 µM)
PRAXEDES <i>et al.</i> 2001	Cv. Pérola	Brotações	MS	Sem regulador de crescimento	-
BARBOZA; CALDAS, 2001	Híbrido (¹ PE x ² SC – 52)	Brotações	MS	ANA (10 µM)	BAP (8,8 µM)
MOREIRA <i>et al.</i> 2003	Cv. Pérola	Brotações	MS	Sem regulador de crescimento	ANA (1,8 mg/L ¹) + BAP (8.8 µM)
CARVALHO <i>et al.</i> 2005	Ornamental (var. <i>bracteatus</i>)	Brotações	MS	Sem regulador de crescimento	BAP (13,32 µM)
CARVALHO <i>et al.</i> , 2009	Ornamental (var. <i>erectifolius</i>)	Brotações	MS	ANA (10 µM)	BAP (4,44 µM)
ARAÚJO <i>et al.</i> 2012b	Cv. Vitória	Brotações	MS	Sem regulador de crescimento	Sem regulador de crescimento
SOUZA <i>et al.</i> 2019	Variedades silvestres	Brotações	MS	ANA (0, 54 µM) + BA (0,89 µM)	ANA (0, 54 µM) + BA (0,89 µM)

¹PE= Pérolera; ²SC= Smoorh Cayenne; ³Murashige; Skoog, 1962; ⁴CHU *et al.*, 1975; ⁵6-benzil-adenina.

5. OBJETIVOS

Geral:

Estabelecer um protocolo de micropropagação *in vitro* para variedade de abacaxizeiro Turiaçu cultivada no Amazonas.

Específicos:

- Analisar a eficiência do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempos de imersão na assepsia de gemas apicais e axilares da coroa do fruto.
- Avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) no estabelecimento, estiolamento e regeneração de brotações.
- Avaliar a taxa de sobrevivência e desenvolvimento de mudas micropropagadas *in vitro* na fase de aclimação em casa de vegetação.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Local de coleta e desenvolvimento da pesquisa

As mudas do tipo coroa utilizadas nos experimentos foram coletadas em cultivo comercial do abacaxizeiro variedade Turiaçu 03°09'08.1"S 59°07'41.9"W na Fazenda Santa Eliza, comunidade Vila do Engenho no município de Itacoatiara, a cerca de 270 km de distância de Manaus. As coroas foram coletadas de frutos maduros, no ponto de colheita comercial, de plantas matrizes sem sintomas visíveis do vírus causal da murcha do abacaxizeiro. No total foram utilizadas 300 coroas, 150 coletadas em outubro de 2020, as quais foram utilizadas no experimento de assepsia (experimento 1) e 150 em maio de 2021 para o experimento de estabelecimento *in vitro* (experimento 2). Nos experimentos: estiolamento de brotações (experimento 3), enraizamento *in vitro* (experimento 4) e aclimatização de mudas micropropagadas (experimento 5) foram utilizadas mudas estabelecidas em *in vitro* de experimentos anteriores.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas na Embrapa Amazônia Ocidental, localizado na rodovia AM 010, km 29, Manaus-AM, local onde foi conduzido toda a pesquisa.

6.2 Assepsia de gemas axilares e ápices caulinares

Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (tipo de gema) x 2 (tempo de imersão) x 3 (concentração de hipoclorito de sódio), totalizando doze tratamentos (Tabela 3), com três repetições cada tratamento. A unidade experimental foi representada por oito explantes (gema apicais ou axilares), os quais foram individualmente cultivados em tubos de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm e contendo 10 mL de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais minerais e vitaminas formulados por Murashige e Skoog (1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e Phytigel® (2,4 g L⁻¹), com pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem por 15 minutos à 121 °C. A aleatoriedade dos

tratamentos foi obtida a partir de sorteio realizado no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Tabela 3. Tratamentos para a assepsia de gemas e ápices utilizando três concentrações de hipoclorito comercial e dois tempos de imersão. Manaus, Amazonas, 2023.

Explante	Tempo de imersão na solução (minutos)	Concentração de cloro ativo na solução de hipoclorito de sódio (%)		
		0,5%	1,25%	2,5%
Gema apical	5	T1	T2	T3
	10	T4	T5	T6
Gema axilar	5	T7	T8	T9
	10	T10	T11	T12

Obtenção, assepsia e inoculação *in vitro* dos explantes

As mudas do tipo coroa foram recebidas no laboratório no dia da colheita dos frutos e, no dia seguinte, foi estabelecido o experimento. O primeiro procedimento foi lavar as mudas em água corrente para a retirada de resíduos superficiais como poeira e areia vindos da área de plantio ou do transporte. Na sequência, com o auxílio de um facão e luvas de algodão, ocorreu à redução das folhas e desfolhagem das mudas de forma manual, deixando o talo da coroa completamente exposto (Figura 8).

Em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar, os talos foram imersos por 1 minuto em álcool etílico na concentração de 70% (v/v) (Figura 8, D). Após o tempo de imersão na solução alcoólica, os talos foram lavados por três vezes consecutivas com água destilada (autoclavada) para a eliminação total do asséptico.

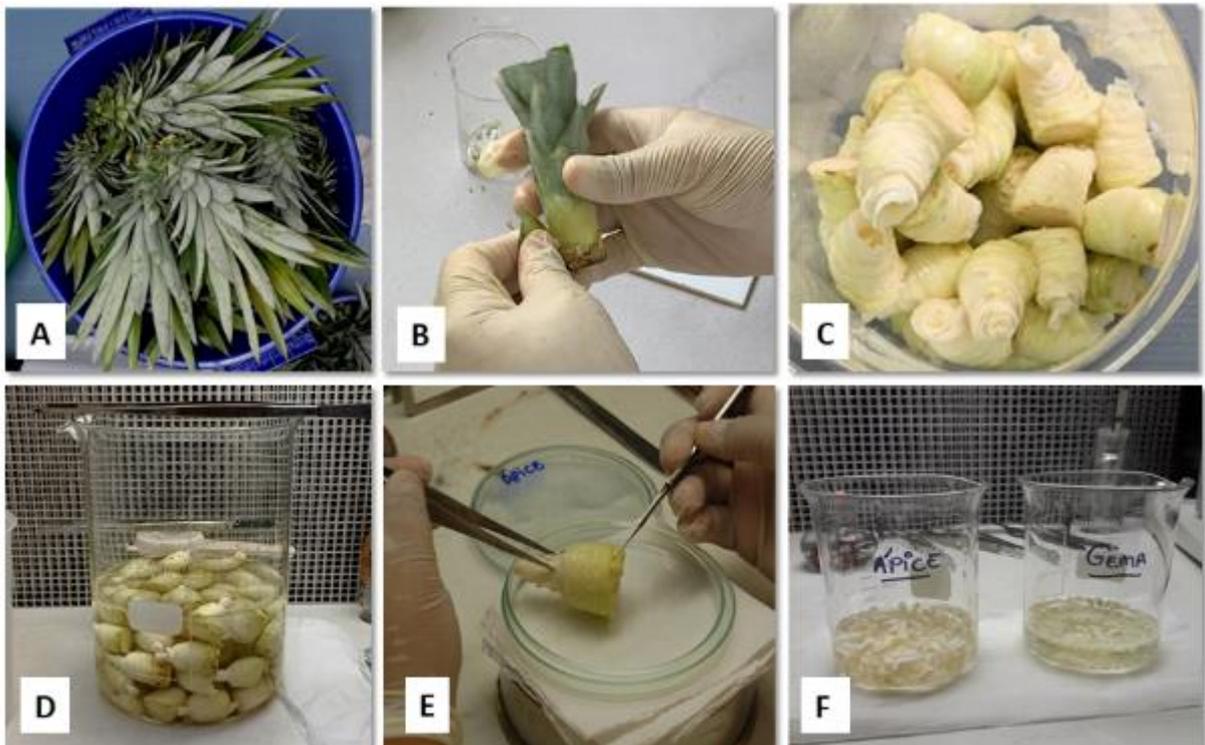


Figura 8. Procedimentos realizados para a assepsia de ápices caulinares e gemas axilares. Mudas do tipo coroa (A), desfolhagem das mudas (B), talo da coroa exposto (C), assepsia dos talos com álcool 70% (D), individualização dos explantes (E) e assepsia dos explantes (Fonte: Autora).

As gemas axilares foram extraídas do talo usando pinça e bisturi, sendo submetidas logo em seguida ao tratamento de assepsia conforme definido nos tratamentos experimentais. Em seguida, foi extraído o ápice caulinar do talo, procedimento realizado em duas etapas de redução do explante. Na primeira etapa a porção superior do talo contendo o ápice caulinar foi reduzida para aproximadamente 1 centímetro de comprimento, condição em que este tipo de explante foi submetido ao tratamento de assepsia, conforme definido nos tratamentos experimentais (Figura 9, D). Na segunda etapa, com auxílio de lupa, os explantes contendo o ápice caulinar foram reduzidos novamente para aproximadamente 2 mm (Figura 9, F), mantendo a gema apical intacta com alguns primórdios foliares, condição em que foram inoculados no meio de cultura. Após o tratamento na solução asséptica, antes da inoculação *in vitro*, tanto as gemas axilares como os ápices caulinares foram submetidos a três lavagens com água destilada para eliminação de resíduos do hipoclorito de sódio.

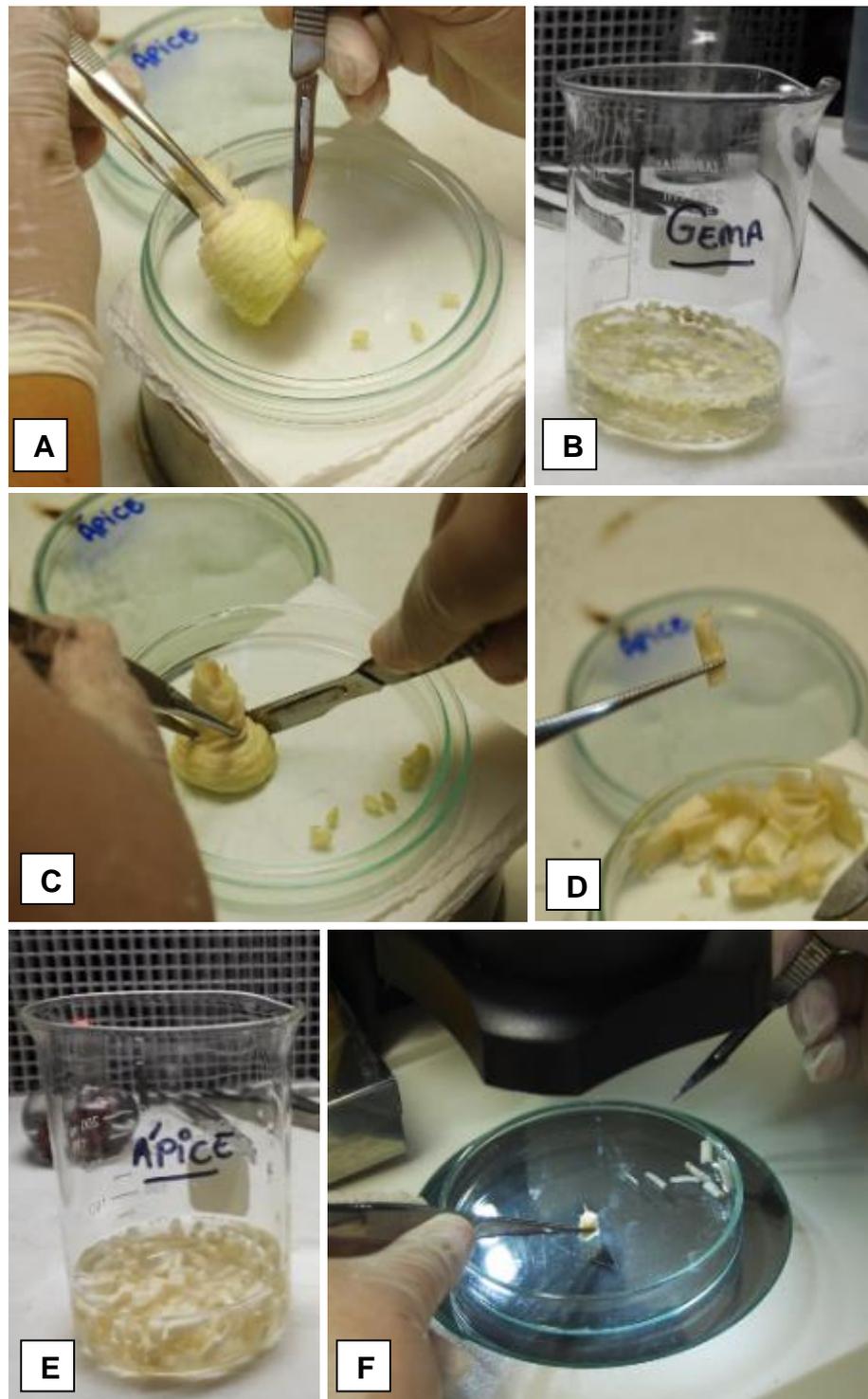


Figura 9. Procedimento realizado na assepsia e estabelecimento ápices caulinares e gemas axilares. Individualização das gemas (A). Assepsia das gemas com hipoclorito comercial a 1,25 % (cloro ativo) por 10 minutos de imersão (B). Redução do ápice da muda do tipo coroa (C). Ápice reduzido a aproximadamente 1 centímetro de comprimento para assepsia (D). Assepsia dos ápices com hipoclorito a 5 % (cloro ativo) por 5 minutos de imersão (E). Redução do ápice para inoculação utilizando lupa (F). (Fonte: Pamela Harada).

Manutenção e avaliação da cultura após a inoculação dos explantes *in vitro*

As culturas foram mantidas em sala de cultivo em ambiente com temperatura (27 ± 1 °C) umidade (60-70%) e fotoperíodo (16 horas de luz) controlados. Aos 45 dias após a inoculação foi avaliado o percentual de explantes contaminados (presença de fungos ou bactérias), oxidados e dormentes. Explantes dormentes são aqueles que apesar de não apresentarem características de tecidos oxidados (coloração escura), permanecem na mesma condição em que foram inoculados, sem intumescimento ou crescimento visível. O percentual de explantes sobreviventes e aptos para o processo de micropropagação foi obtido pela eliminação dos explantes contaminados, oxidados e dormentes.

Análise estatística

Os dados de todas as variáveis foram submetidos a verificação das pressuposições da análise de variância (ANOVA): aditividade do modelo (Teste de Tukey), independência dos erros (Teste de Durbin Watson), distribuição normal dos erros (Teste de Shapiro-Wilk), Homogeneidade de variâncias (Teste de Bartlett). As variáveis que atenderam as pressuposições foram submetidas à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para variável explantes dormentes, que não atendeu as pressuposições da análise de variância com dados originais nem com transformação dos dados, procedeu-se com análises não paramétricas com teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) para a verificação dos efeitos dos tratamentos e teste de comparação múltipla de médias de Bonferroni ($p < 0,05$). A análise de variância e teste de Tukey foram realizadas no programa RBIO (BHERING, 2017) e os teste de Kruskal Wallis e Bonferroni ($p < 0,05$) no software Action Stat (Estatcamp, 2014).

6.3 Estabelecimento *in vitro* de gemas axilares e ápices caulinares

Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (fontes de explante) x 3 (concentrações de BAP) x 3 (concentrações de ANA), totalizando 18 tratamentos (Tabela 4) com 12 repetições cada tratamento. A unidade experimental foi representada por um tubo de ensaio com dimensões de 150 mm x 25 mm, contendo 10 mL de meio de cultura e um explante (gema ou ápice). O meio de cultura utilizado neste experimento foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido das concentrações de reguladores de crescimento conforme definido nos tratamentos, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e Phytigel® (2,4 g L⁻¹) e o pH foi ajustado para 5,8, seguido de autoclavagem por 15 minutos à 121°C.

A aleatoriedade dos tratamentos foi obtida a partir de sorteio realizado no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Tabela 4. Dose dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) avaliadas na fase de estabelecimento *in vitro* de gemas apicais e axilares extraídas do talo de frutos de abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivada no Amazonas. Manaus, Amazonas, 2023.

Explante	ANA (µM L ⁻¹)	BAP (µM L ⁻¹)		
		0,0	2,3	4,2
Gema apical	0,0	T1	T2	T3
	2,5	T4	T5	T6
	5,6	T7	T8	T9
Gema axilar	0,0	T10	T11	T12
	2,5	T13	T14	T15
	5,6	T16	T17	T18

Obtenção, assepsia e inoculação *in vitro* dos explantes

Os explantes foram obtidos do talo de coroas de frutos conforme procedimentos descritos no experimento 1. Na assepsia dos explantes os procedimentos adotados foram baseados nos resultados do experimento de assepsia (Experimento 1). Para assepsia das gemas apicais foi utilizada solução de hipoclorito de sódio com 0,5 % de

cloro ativo e 5 minutos de imersão dos explantes na solução e, para gemas axilares, solução com 1,25 % de cloro ativo e 10 minutos de imersão.

Manutenção e avaliação da cultura após a inoculação dos explantes *in vitro*

O experimento foi mantido por 90 dias em sala de cultivo em ambiente com temperatura (27 ± 1 °C) umidade (60-70%) e fotoperíodo (16 horas de luz) controlados. Durante o período de cultivo foi realizado o acompanhamento quinzenal do experimento com eliminação das parcelas que apresentaram explantes contaminados e ou oxidados. Após os 90 dias de cultivo, os explantes sobreviventes foram avaliados visualmente, quanto à formação de raiz, aspecto da raiz (normal ou anormal) e presença de calo, fazendo registro como dado binário para presença ou ausência. As raízes foram classificadas como anormais quando foram espessas e curtas. O comprimento da parte aérea foi medido pela distância entre a base do explante e a ponta da folha mais alta, medida com régua, em centímetros (Figura 10).

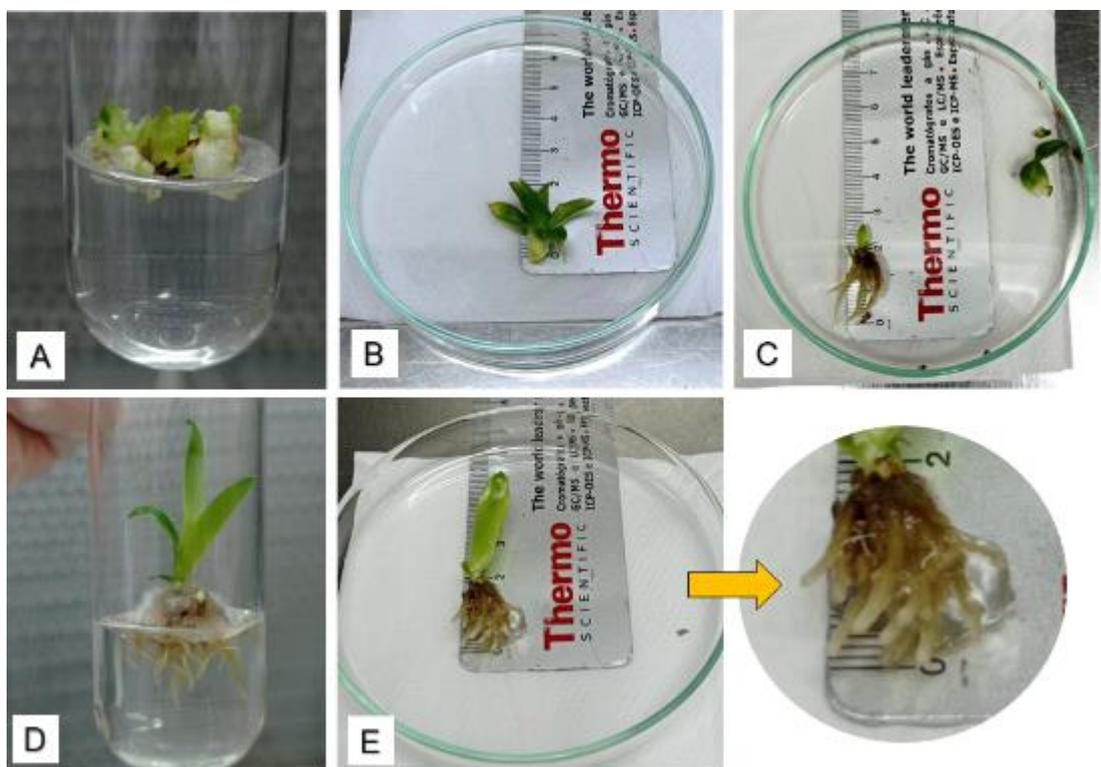


Figura 10. Demonstração dos parâmetros de avaliação no desenvolvimento de gemas apicais e gemas axilares aos 90 dias de cultivo *in vitro*. Presença de calo (A), medição da parte aérea (B), medição da raiz (C), aspecto raiz normal (D) e aspecto raiz anormal (E). (Fonte: Autora).

Análises estatísticas

A variável altura da parte aérea não apresentou distribuição normal dos resíduos dos dados experimentais (Teste de Shapiro Wilk, $p < 0,05$), bem como, as variâncias dos tratamentos não foram homogêneas (Teste de Bartlett, $p < 0,05$), possíveis transformações de dados foram avaliadas, mas as pressuposições para análise de variância não foram atendidas, dessa forma, os dados foram analisados por estatísticas não paramétricas. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar a hipótese de que existe diferença para CPA entre os tratamentos e teste múltiplo de Bonferoni ($p < 0,05$) usado para comparar as médias dos tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas no software Action Stat (ESTATCAMP, 2014).

6.4 Estiolamento e regeneração de brotações

Dois experimentos foram conduzidos, no primeiro foram avaliados os tratamentos para o estiolamento de brotos e, no segundo, a regeneração dos brotos produzidos.

6.4.1 Estiolamento de brotos

Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (concentrações de BAP) x 3 (concentrações de ANA), totalizando 9 tratamentos com 6 repetições para cada tratamento. A unidade experimental foi representada por um broto cultivado em um tubo de ensaio com dimensões de 25 mm de diâmetro e 150 mm de comprimento contendo 10 mL de meio de cultura. O meio de cultura usado foi o MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) e Phytigel® ($2,4 \text{ g L}^{-1}$) e acrescido dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) conforme estabelecido no delineamento experimental (Tabela 5). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 (antes da autoclavagem, a 121° C por

15 minutos). A aleatoriedade das unidades experimentais foi realizada pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Tabela 5. Tratamentos utilizados para o estiolamento *in vitro* de brotações do abacaxi Turiaçu. Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)	ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)		
	0,0	2,5	5,6
0,0	T1	T2	T3
2,3	T4	T5	T6
4,2	T7	T8	T9

Obtenção e inoculação *in vitro* dos explantes

No experimento foram utilizadas 100 brotações produzidas no experimento anterior, as quais foram obtidas de gemas axilares, dois a três meses após estabelecimento dos explantes *in vitro*, quando apresentavam aproximadamente 3 centímetros de altura. Como os explantes já estavam em condições de cultivo asséptico não foi necessário realizar a assepsia dos explantes.

Em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de materiais estéreis as brotações foram reduzidas para aproximadamente 1,0 cm, assim como, as folhas foram retiradas restando apenas o talo (Figura 11). Posteriormente a redução e excisão das folhas, os brotos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) e Phytigel® ($2,4 \text{ g L}^{-1}$) e acrescido dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) conforme estabelecido no delineamento experimental. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 (antes da autoclavagem, a 121° C por 15 minutos). Após a transferência do broto para o meio de estiolamento, o tubo de ensaio foi vedado com papel alumínio e envolto com plástico filme PVC.



Figura 11. Demonstração da brotação antes da redução em câmara de fluxo laminar (A) e brotação reduzida e inserida em meio contendo reguladores de crescimento para o estiolamento *in vitro* (B). (Fonte: Autora).

Manutenção e avaliação da cultura após a inoculação dos explantes *in vitro*

Os tubos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento por 90 dias na ausência de luz, com temperatura (27 ± 1 °C) umidade (60-70%) e fotoperíodo (16 horas de luz) controlados. A cada 30 dias foi realizado um subcultivo transferindo o explante para novo frasco com as mesmas dimensões, quantidade e composição do meio de cultura, conforme estabelecido no delineamento experimental. A transferência dos brotos foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar e aos 90 dias foram avaliadas as variáveis: comprimento do broto principal (cm) e número de nós por broto (Figura 12).

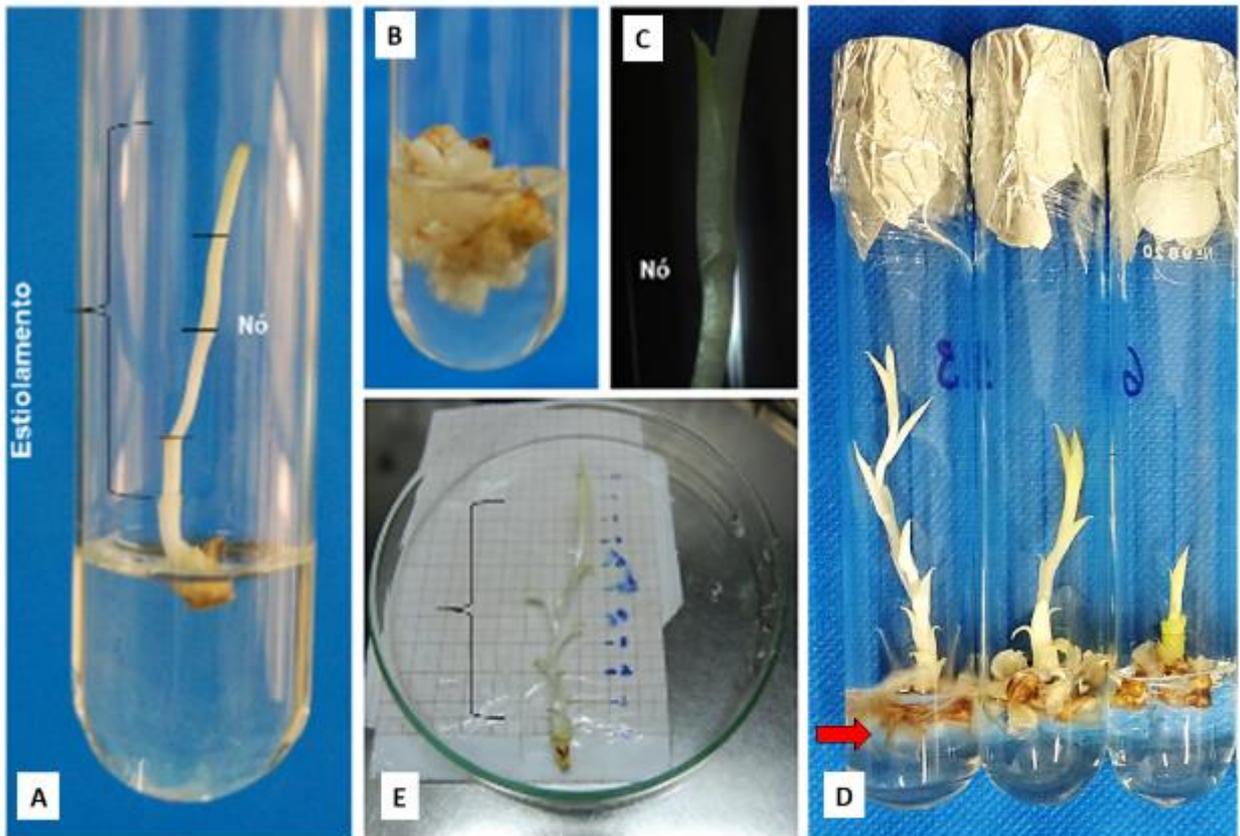


Figura 12. Variáveis do experimento de estiolamento de brotações *in vitro*. Identificação e contagem dos nós (A e C), calo (B), pilosidade nas raízes (D) medição da haste das brotações (E). (Fonte: Autora)

Além dos materiais estéreis foi utilizado papel milimetrado (Figura 12, E) para a medição do estiolamento dos brotos em câmara de fluxo laminar. Na transferência dos explantes para subcultivos subsequentes foi também avaliada a presença de calos e de pilosidade nas raízes.

Análise estatística

Os dados de todas as variáveis foram submetidos a verificação das pressuposições da análise de variância (ANOVA): aditividade do modelo (Teste de Tukey), independência dos erros (Teste de Durbin Watson), distribuição normal dos erros (Teste de Shapiro-Wilk), Homogeneidade de variâncias (Teste de Bartlett). As variáveis que atenderam as pressuposições foram submetidas à ANOVA e as médias

foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As variáveis número de brotos estiolados, número de nós por broto, formação de calo e formação de raiz não atenderam aos pressupostos da ANOVA com dados originais nem com dados transformados, assim, os dados foram submetidos às análises não paramétricas, com verificação dos efeitos dos tratamentos pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e médias comparadas pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni ($p < 0,05$). A análise de variância e teste de Tukey foram realizadas no programa RBIO (BHERING, 2017) e os teste de Kruskal Wallis e Bonferroni ($p < 0,05$) no software Action Stat (ESTATCAMP, 2014).

6.4.2 Regeneração de brotos

Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com cinco concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (Tabela 6) e seis repetições para cada tratamento. A unidade experimental foi representada por quatro brotos cultivados em um frasco de vidro com dimensões de 10,5 cm de altura x 6,8 cm de diâmetro inferior x 6,3 cm de diâmetro de boca, contendo 30 mL de meio de cultura. O meio utilizado foi o MS suplementado com BAP, conforme definido no delineamento experimental, sacarose (30g L^{-1}) e Phytigel® ($2,4\text{ g L}^{-1}$). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C por 15 minutos. A aleatoriedade das parcelas foi realizada pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Tabela 6. Tratamentos utilizados na regeneração *in vitro* de brotações do abacaxi Turiçu. Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)				
0,0	6,8	13,0	20,0	27,0
T1	T2	T3	T4	T5

Obtenção e inoculação *in vitro* dos explantes

Em câmara de fluxo laminar, após as brotações completarem 90 dias na fase de estiolamento, os nós dos brotos estiolados foram individualizados e dispostos em sentido horizontal sob o meio de cultura nos frascos de cultivo, que posteriormente foi fechado com tampa de rosca de polipropileno e vedado com filme PVC.

Manutenção e avaliação da cultura após a inoculação dos explantes *in vitro*

O experimento nesta fase foi mantido em sala de cultivo em ambiente com temperatura (27 ± 1 °C) umidade (60-70%) e fotoperíodo (16 horas de luz) controlados, durante 90 dias com subcultivos realizados a cada 30 dias. Nos subcultivos ocorriam a transferência dos nós para meio de cultura fresco de mesma composição. Ao completar 90 dias de incubação foram avaliados o número de brotos regenerados.

Análises estatísticas

Os dados obtidos da taxa de multiplicação obtida nos diferentes subcultivos foram submetidos à análise de variância e teste de médias (Tukey, $p < 0,05$) e análise de regressão polinomial. As análises estatísticas foram realizadas no programa RBIO (Bhering, 2017).

6.5 Enraizamento de brotos *in vitro* e aclimação de plântulas obtidas por micropropagação

Dois experimentos foram conduzidos, no primeiro foram avaliados tratamentos para o enraizamento de brotos produzidos *in vitro* e, no segundo, a aclimação em casa de vegetação das plântulas enraizadas produzidas *in vitro*.

6.5.1 Enraizamento *in vitro*

Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco doses de Ácido Naftalenoacético (ANA) com oito repetições cada tratamento (Tabela 7). A unidade experimental foi representada por um frasco de vidro (10,5 cm de altura; 6,8 cm de diâmetro inferior e boca com 6,3 cm de diâmetro, capacidade aproximada de 220 mL) com 4 brotações, contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), acrescido ANA, conforme tratamentos experimentais, e suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e Phytigel® (2,4 g L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,8, seguido de autoclavagem por 15 minutos à 121°C.

O sorteio das parcelas de ambos experimentos foi dado através do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Tabela 7. Doses do regulador de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) avaliadas para o enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas do abacaxizeiro variedade Turiaçu. Manaus, Amazonas, 2023.

ANA (µM L ⁻¹)				
0,0	5,6	10,8	16,2	21,5
T1	T2	T3	T4	T5

Obtenção e inoculação *in vitro* dos explantes

Foram selecionadas 160 brotações com aproximadamente 3 centímetro de altura. Em câmara de fluxo laminar e com o uso de materiais estéreis (pinças, placas de petri e cabo de bisturi) as brotações foram individualizadas e o comprimento da parte aérea foi padronizado para aproximadamente 1,5 cm. Posteriormente, as brotações foram inoculadas nos tratamentos de enraizamento. Após a inoculação das brotações, os frascos foram fechados com tampas de polipropileno e vedados com filme PVC.

Manutenção e avaliação da cultura após a inoculação dos explantes *in vitro*

O experimento foi mantido por 45 dias em sala de cultivo em ambiente controlado com temperatura de 27 ± 1 °C, umidade de 60% a 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz. No final do período de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea do broto, comprimento de raízes normais, número de raízes normais, número de raízes anormais, massa fresca, massa seca dos brotos e percentual de brotos enraizados (Figura 13).

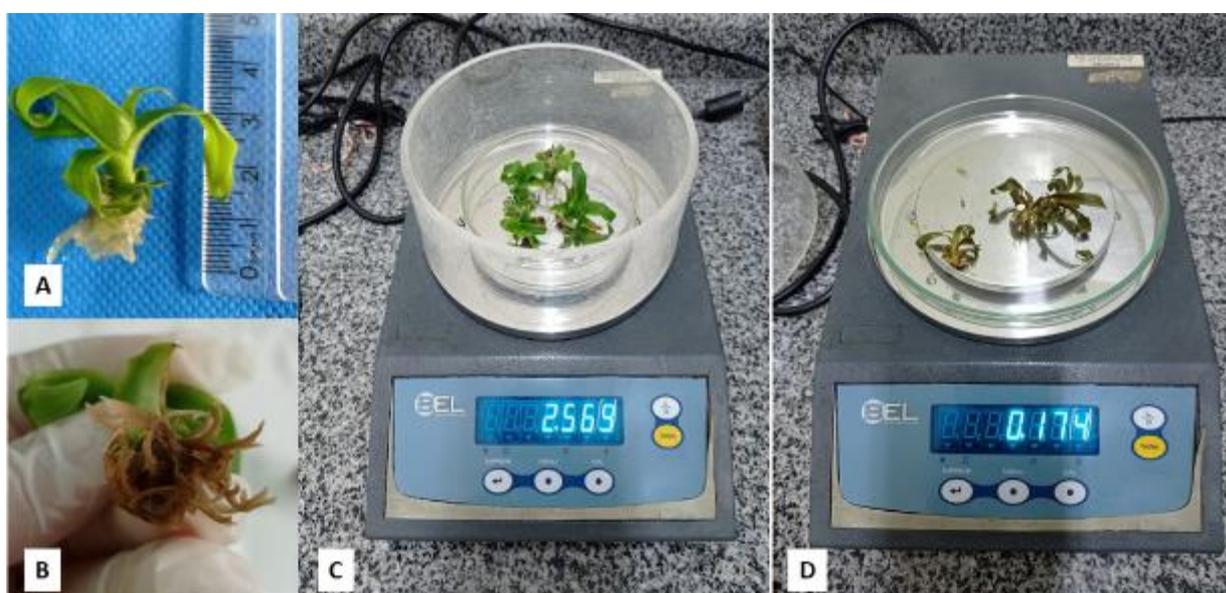


Figura 13. Variáveis do experimento de enraizamento *in vitro*. Comprimento de parte aérea e comprimento de raiz normal (A), aspecto de raiz anormal (B) massa fresca (C) e massa seca (D) da unidade experimental. (Fonte: Autora).

As medidas foram tomadas em todos os brotos da unidade experimental, com exceção da massa seca, avaliada apenas nas parcelas experimentais das repetições cinco a oito. As unidades experimentais referentes as repetições um a quatro foram utilizadas no experimento de aclimação de mudas (Figura 14). Para obter a massa seca, os brotos foram colocados em estufa com circulação forçada de ar em temperatura de 50 °C por 72 horas, quando as amostras já apresentavam peso constante.

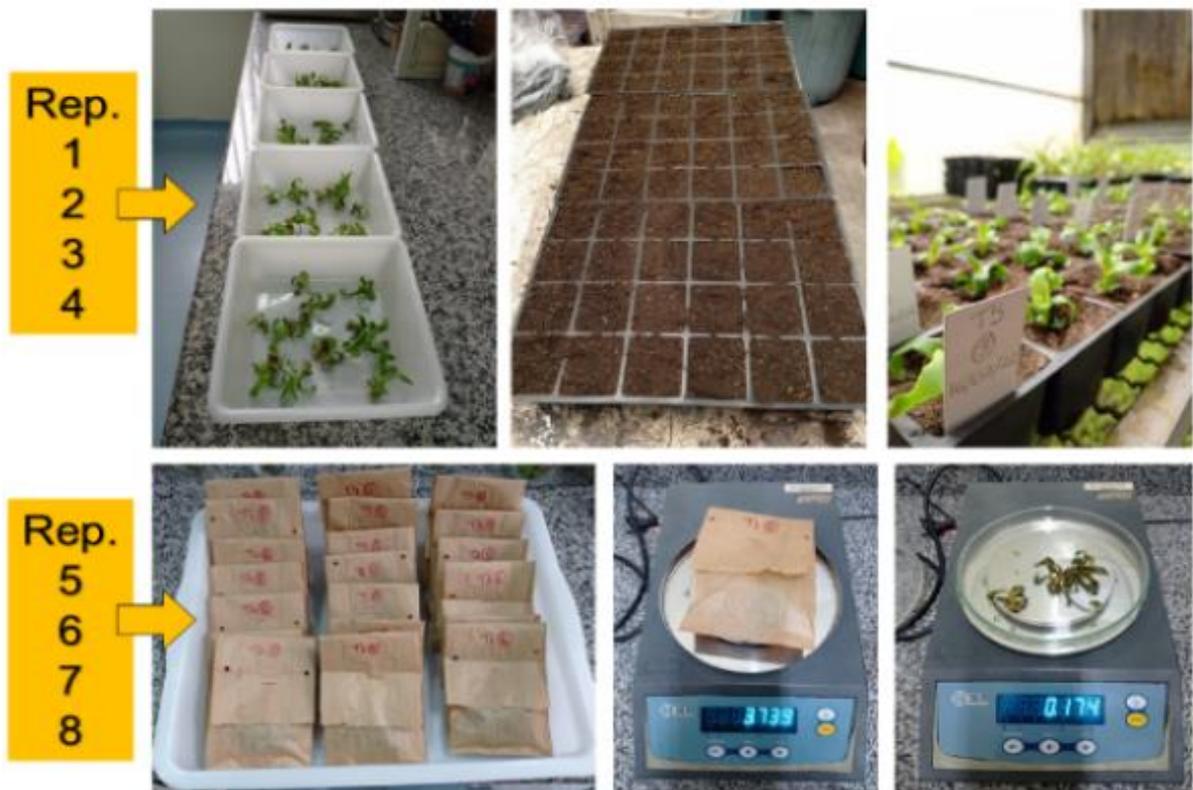


Figura 14. Distribuição das repetições para aclimatização e secagem. (Fonte: Autora).

Análises estatísticas

Os dados das variáveis que atenderam aos pressupostos para análise de variância foram submetidos à ANOVA para verificação de efeito dos tratamentos (teste F, $p < 0,05$) e ao teste Tukey ($p < 0,5$) para comparação das médias, assim como, foram realizadas análises de regressão polinomial. No caso das variáveis que não atenderam as pressuposições da ANOVA, os dados foram submetidos a análises não paramétricas com verificação dos efeitos dos tratamentos pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e médias comparadas pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni ($p < 0,05$). A análise de variância, teste de Tukey e análises de regressão foram realizadas no programa RBIO (BHERING, 2017). Os testes de Kruskal Wallis e Bonferroni ($p < 0,05$) no software Action Stat (ESTATCAMP, 2014).

6.6.2 Aclimatização em casa de vegetação de plantas micropropagadas *in vitro*

Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos, correspondentes as doses de ANA usadas na fase de enraizamento *in vitro*,) e quatro repetições. As mudas foram aclimatizadas em estufa (modelo Poly Venlo da Van Der Hoeven) em bandejas plásticas com 24 células (dimensões: externa 396 mm x 266 mm, boca 59 mm x 59 mm, profundidade 56 mm, volume 162 cm³) preenchidas com substrato comercial Vivatto Plus®. A unidade experimental foi composta por quatro plantas cultivadas individualmente em células sequenciais na bandeja. O sorteio das parcelas foi realizado a partir do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Plantio, manutenção das plantas na estufa e avaliações

Antes do plantio na estufa as plântulas enraizadas *in vitro* passaram por um período de pré-aclimação. As plântulas foram retiradas dos frascos e as raízes lavadas sob água corrente para eliminação do meio de cultura, em seguida, permaneceram por 24 h em bandeja plástica com as raízes imersas em água em sala com temperatura ambiente até o plantio das mudas na estufa.

Durante a aclimação a estufa foi mantida com temperatura de 27±1 °C e irrigação automática com microaspersão durante 1 minuto a cada 5 horas. A adubação foliar das mudas foi realizada semanalmente durante todo o período de aclimação com fertilizante líquido Ouro verde® (20 mL L⁻¹) + Adesil® (3 mL L⁻¹).

As avaliações do experimento ocorreram no período de 30, 60 e 90 dias após o plantio na estufa. Aos 30 e 60 dias (utilizando paquímetro digital) foram avaliados: diâmetro do coleto, comprimento e largura da maior folha e comprimento e largura da 2ª menor folha. Para a variável número de folhas foi realizado a contagem a partir da visualização em cada planta. Aos 90 dias foram acrescentados na avaliação as variáveis comprimento da raiz (medida obtida com auxílio de régua, da base da muda até a maior raiz) e o teor de clorofila das folhas, avaliado com medidor portátil de clorofila (SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter) (Figura 15).

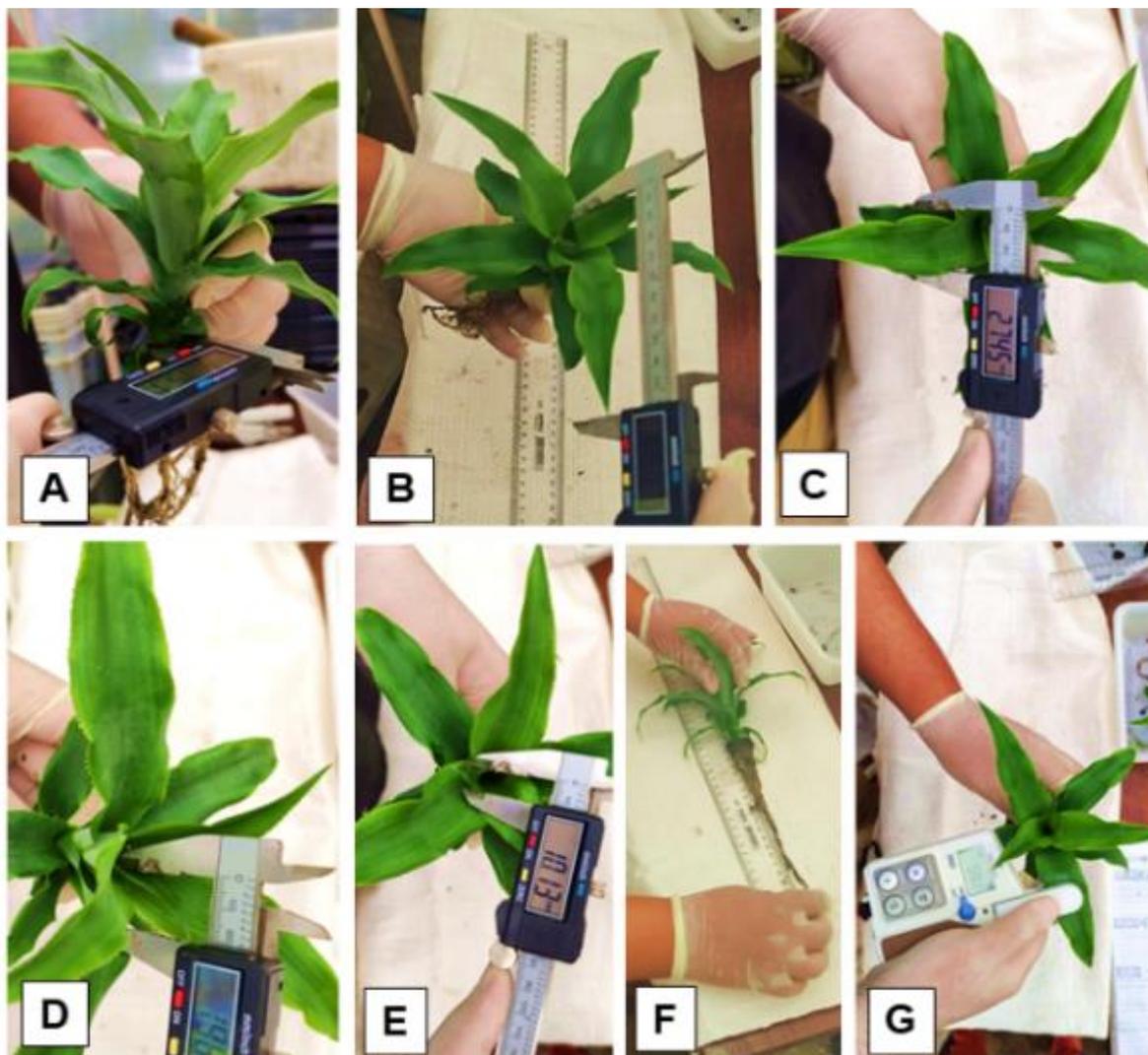


Figura 15. Avaliação aos 90 dias de aclimação de mudas micropropagadas *in vitro* de abacaxi variedade Turiaçu cultivado no Amazonas. Diâmetro do coleto (A), comprimento e largura da maior folha da roseta (B e C), comprimento e largura da segunda menor folha da roseta (D e E), comprimento de raiz (F) medição de clorofila (G) (Fonte: Autora).

Análises estatísticas

Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e teste de Tukey, as que não atenderam as pressuposições para ANOVA com dados originais foram analisadas com dados transformados, os quais atenderam as pressuposições da ANOVA. As análises foram realizadas no programa Rbio (BHERING, 2017).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Assepsia de gemas axilares e gemas caulinares

Na análise de variância (Tabela 8) para percentual de explantes contaminados foram verificados efeitos significativos para tipo de explante (E) e concentração do hipoclorito de sódio na solução asséptica (C) e não significativo para tempo de imersão do explante na solução asséptica (T). Além dos efeitos principais, duas interações foram significativas, E x C e C x T, assim, procedeu-se com os devidos desdobramentos para comparação das médias das concentrações de hipoclorito e dos tempos de imersão para cada tipo de gema separadamente.

Tabela 8. Resumo da análise de variância para percentual de explantes contaminados em função do tipo de explante (gema apical e gema axilar do talo da coroa do fruto), concentração de hipoclorito de sódio na solução asséptica (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) e tempo de imersão do explante na solução asséptica (5 min. e 10 min.). Manaus, Amazonas, 2023.

Fonte de Variação	GL	QM	F	Probabilidade
Explante (E)	1	5625,0	24,5	0,0000 **
Tempo (T)	1	17,4	0,1	0,7859 ns
Concentração (C)	2	1319,4	5,7	0,0092 **
E x T	1	156,3	0,7	0,4180 ns
E x C	2	1093,8	4,8	0,0182 **
T x C	2	850,7	3,7	0,0398 *
E x T x C	2	364,6	1,6	0,2257 ns
Resíduo	24	230,0		

Coeficiente de variação = 78%

* e **, respectivamente, significativo a 1% e 5 % de probabilidade, e ns = não significativo

Na comparação do tipo de gema dentro de cada concentração do hipoclorito de sódio, as médias para contaminação de gemas axilares foram superiores às verificadas para gemas apicais nas concentrações 0,5% e 1,25% de cloro ativo e não diferiram na concentração de 2,5% (Tabela 9). A maior taxa de contaminação das gemas axilares em relação as gemas apicais quando utilizadas as concentrações inferiores de hipoclorito de sódio pode estar relacionada a localização do explante, tendo em vista que os ápices estão em um ambiente mais protegido na planta do que as gemas axilares.

Tabela 9. Médias para percentual de explantes contaminados com diferentes concentrações da solução de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) usada na assepsia de gemas apicais e gemas axilares isoladas do talo de coroas do fruto de abacaxi da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, após 45 dias da inoculação *in vitro*. Manaus, Amazonas, 2023.

Explante	Concentração de hipoclorito de sódio (cloro ativo)		
	0,5 %	1,25 %	2,5 %
Gema apical	6,25 b A	10,41 b A	4,17 a A
Gema axilar	52,08 a A	31,25 a AB	12,50 a B

Médias seguidas de letra maiúscula na linha (concentração da solução de hipoclorito) e letra minúscula na coluna (tipo de gema) não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para a gema apical as médias do percentual de explantes contaminados nas três concentrações de hipoclorito avaliadas não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 9). Nenhuma das combinações de concentração da solução de hipoclorito de sódio e tempo de imersão dos explantes na solução promoveu a oxidação de gemas apicais, todos os explantes não contaminados permaneceram vivos, entumecidos e ou crescidos. Considerando os resultados obtidos, para assepsia de gemas apicais isoladas do talo da coroa de frutos de abacaxizeiro Turiaçu recomenda-se o uso da solução de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo e 5 minutos de imersão do explante na solução.

Para a gema axilar foi observado 52,08% de explantes contaminados quando usada na assepsia a solução de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo, valor estatisticamente superior ao verificada com 2,5% de cloro ativo (12,5%) (Tabela 9). O percentual de gemas axilares contaminadas na assepsia com solução de hipoclorito de sódio com 1,25% de cloro ativo foi de 31,25%, o qual não diferiu estatisticamente das médias de contaminação verificadas nas concentrações de 0,5% e 1,25% (cloro ativo. Albim *et al.* (2005) relata taxas de contaminação de até 32% em gemas axilares de curauá utilizando assepsia com hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo, valor similar ao verificado para gemas axilares tratadas com 1,25% de hipoclorito de sódio no presente estudo (31,25%).



Figura 16. Gemas axilares com a presença de contaminantes, fungos ou bactérias. (Fonte: Autora).

Biennu *et al.* (2017) avaliaram o uso do hipoclorito de sódio com diferentes concentrações de cloro ativo na assepsia *in vitro* de gemas axilares das cultivares de abacaxizeiros comestíveis Smooth Cayenne e Pão de açúcar. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, para a cv. Smooth Cayenne a melhor concentração foi de 1,2 % de cloro ativo com 5 minutos de imersão e, para a cultivar Pão de açúcar, foi a concentração de 0,8 % de cloro ativo com 15 minutos imersão do explante na solução asséptica. Os resultados indicam que existe variação na resposta de genótipos em relação a concentração da solução asséptica e do tempo de imersão, contudo, os valores encontrados na literatura estão na faixa das melhores concentrações e tempo de imersão encontrados neste estudo para as gemas axilares do abacaxizeiro variedade Turiaçu.

O efeito da concentração de hipoclorito de sódio na solução asséptica foi significativo para percentual de gemas axilares oxidadas, sem efeito estatisticamente significativo do tempo de imersão e da interação da concentração com o tempo de imersão (Tabela 10).

Tabela 10. Resumo da análise de variância para oxidação (%) *in vitro* de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos do abacaxizeiro variedade Turiaçu em função da concentração (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) e do tempo de imersão (5min e 10 min) em solução asséptica de hipoclorito de sódio. Manaus, Amazonas, 2022.

Fonte de Variação	GL	QM	F	Probabilidade
Concentração (C)	2	1640,7	18,9	0,0002 **
Tempo (T)	1	78,1	0,9	0,3615 ns
C x T	2	26,1	0,3	0,7462 ns
Resíduo	12	86,8		
Coeficiente de variação = 63,89%				

** e ns, respectivamente, significativo e não significativo a 5% de probabilidade

O percentual de gemas axilares oxidadas na assepsia com solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo foi de 33,33%, valor estatisticamente superior aos verificados quando usadas as soluções com concentrações inferiores, 8,33% para com 1,25% de cloro ativo 2,08% com 0,5% (Tabela 11).

Tabela 11. Médias de oxidação de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxi da variedade Turiaçu cultivado no Amazonas submetidas a assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Manaus, Amazonas, 2022.

Concentração de cloro ativo na solução de hipoclorito de sódio (%)	Oxidação de gemas axilares (%)
2,50	33,33 a
1,25	8,33 b
0,50	2,08 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Albim *et al.* (2005) relatam taxas bem mais elevadas de oxidação nos tratamentos testados com solução de hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo em gemas axilares de curauá roxo. Assim como Piza *et al.* (2001), que apesar de obterem mais de 97% de eliminação dos contaminantes, também relatam elevada perda por oxidação de explantes com o tratamento asséptico. Os resultados demonstram a importância de determinar quais as melhores condições para assepsia para genótipos específicos, visto que resultados diferentes são obtidos para diferentes genótipos.

As condições do material coletado também podem interferir na resposta aos tratamentos de assepsia, tanto devido a diversidade de fungos e bactérias presentes

na amostra como devido a suas condições fisiológicas ou mesmo diferenças morfológicas entre diferentes espécies ou cultivares de abacaxizeiros. As condições ambientais também podem ter influência na contaminação, observações empíricas indicam que coletas em dias chuvosos geralmente tem maior percentual de contaminação de explantes.

Além da oxidação, também foram verificados explantes classificados como dormentes nos tratamentos de assepsia com gemas axilares. O percentual de explantes dormentes observado na assepsia com solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo foi superior aos verificadas nas concentrações inferiores em ambos os tempos de imersão na solução asséptica (Tabela 12).

Tabela 12. Percentual de gemas axilares dormentes após tratamento asséptico com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,25% e 2,5%). Manaus, Amazonas, 2022.

Concentração de cloro ativo na solução de hipoclorito de sódio (%)	Tempo de imersão		Média
	5 minutos	10 minutos	
0,5	0 b A	0,0 b A	0,0 b
1,25	0 b A	4,2 b A	2,1 b
2,5	37,5 a A	37,5 a A	37,5 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (concentrações de hipoclorito de sódio) e mesma letra maiúscula na linha (tempos de imersão na solução) não diferem estatisticamente entre si pelo teste não paramétrico de comparação múltipla de médias de Bonferroni ($p < 0,05$).

Independente da concentração da solução de hipoclorito de sódio não foram verificadas diferenças significativas entre as médias para o percentual de gemas dormentes entre tempos de imersão, ou seja, o tempo de imersão do explante na solução asséptica não teve efeito significativo na variável. Com relação a concentração da solução asséptica dentro de cada tempo de imersão testado, nas concentrações de 0,5% e 1,25% de cloro ativo as médias para percentual de explantes dormentes não deferiam estatisticamente, independentemente do tempo de imersão do explante na solução asséptica (Tabela 12), destacando-se que com 5 minutos de imersão nenhuma gema permaneceu dormente, e, com 10 minutos de imersão apenas na concentração com 1,25% de cloro ativo foram observadas gemas dormentes. O percentual de gemas dormentes na concentração mais elevada de cloro

ativo (2,5 %) foi estatisticamente superior as médias observadas com 0,5% e 1,25% de cloro ativo.

Para explantes sobreviventes, ou seja, excluídos os explantes contaminados, oxidados e dormentes, foram identificados efeitos significativos para tipo de explante e para a interação explante x concentração de hipoclorito de sódio no percentual de explantes sobreviventes (Tabela 13). O tempo de imersão na solução asséptica não apresentou efeito significativo isolado ou em interações com as demais fontes de variação para percentual de explantes sobreviventes.

Tabela 13. Resumo da análise de variância para percentual de explantes sobreviventes em função do tipo de explante (gema apical e gema axilar do talo da coroa do fruto), concentração de hipoclorito de sódio na solução asséptica (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) e tempo de imersão do explante na solução asséptica (5 min. e 10 min.). Manaus, Amazonas, 2023.

Fonte de Variação	GL	QM	F	Probabilidade
Explante (E)	1	23129,3	82,0	0,0000**
Tempo (T)	1	212,7	0,8	0,3939ns
Concentração (C)	2	677,1	2,4	0,1122ns
E*T	1	525,2	1,9	0,1851ns
E*C	2	1319,4	4,7	0,0193**
T*C	2	329,9	1,2	0,3277ns
E*T*C	2	69,4	0,2	0,7838ns
Resíduo	24	282,1		

** e ns, respectivamente, significativo e não significativo a 5% de probabilidade

A sobrevivência das gemas apicais foi superior as das gemas axilares nas três concentrações testadas da solução de hipoclorito de sódio (Tabela 14). Para gemas apicais não houve diferença significativa para o percentual de explantes sobreviventes obtidos nas diferentes concentrações da solução de hipoclorito de sódio. Para gemas axilares o percentual de explantes sobreviventes no tratamento com 1,25% de cloro ativo foi superior ao obtido com 2,5% de cloro ativo e não diferiu significativamente da média obtida com 0,5 % de cloro ativo. O percentual de explantes sobreviventes no tratamento usando a maior concentração de cloro ativo (2,5 %) não diferiu estatisticamente da média obtida com a menor concentração de cloro ativo (0,5 %)

Tabela 14. Média para percentual de gemas apicais e gemas axilares sobreviventes após tratamento asséptico com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,25% e 2,5% de cloro ativo) aos 45 dias após a inoculação *in vitro*. Manaus – Amazonas, 2023.

Concentração de hipoclorito de sódio (% de cloro ativo)	Gema apical	Gema axilar
0,5	93,8 a A	45,8 ab B
1,25	89,6 a A	58,3 a B
2,5	95,8 a A	22,9 b B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha (tipo de explante) e letra minúscula na coluna (concentração da solução asséptica) não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para assepsia de gemas axilares, como o tempo de imersão do explante na solução asséptica não teve efeito significativo na sobrevivência dos explantes, pode-se optar pelo tratamento com menor tempo de imersão, ou seja, 5 minutos. Já para concluir sobre a melhor concentração da solução asséptica para assepsia desse tipo de explante, deve-se considerar os resultados obtidos para as diferentes variáveis (Figura 18). O tratamento asséptico com solução de hipoclorito de sódio com 1,25% de cloro ativo apresentou média para percentual de explantes sobreviventes, superior ou sem diferença estatística significativa das médias obtidas nas demais concentrações, ao mesmo tempo, as médias para percentual de explantes contaminados, oxidados e dormentes foram inferiores ou não diferiram significativamente das médias obtidas com as demais concentrações.

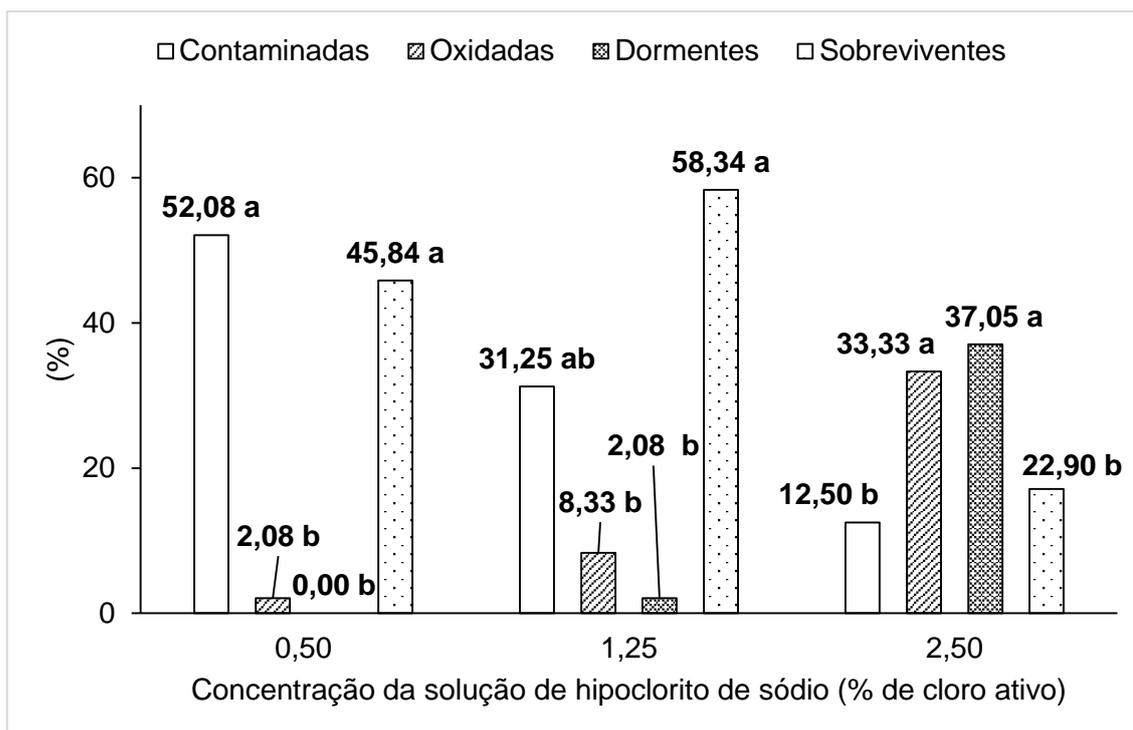


Figura 17. Valores percentuais de contaminação, oxidação, dormência e sobrevivência final de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxizeiro variedade Turiaçu submetidas a assepsia com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Valores para cada tipo de resposta do explante que são seguidos pela mesma letra nas diferentes concentrações da solução de hipoclorito não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (Fonte: Autora).

Considerando os resultados obtidos na assepsia de gemas extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxi da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, para gemas apicais recomenda-se o uso de solução de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo e para gemas axilares com 1,25% de cloro ativo e 5 minutos de imersão na solução asséptica para ambos os tipos de gema.

7.2 Estabelecimento *in vitro* de gemas axilares e apicais

Os efeitos dos reguladores de crescimento ANA e BAP foram significativos sobre o comprimento das gemas apicais (CGAP) após 90 dias de cultivo *in vitro* (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Quando analisadas as médias para CGAP obtidas com diferentes concentrações do regulador de crescimento ANA dentro de cada concentração de BAP, com 0,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP as médias não diferiram

estatisticamente entre si, e, com as concentrações de 2,3 $\mu\text{M L}^{-1}$ e 4,2 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP as médias obtidas com 0,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de ANA foram superiores as obtidas com o uso do regulador de crescimento (Tabela 15). Quando analisado o CGAP nas diferentes concentrações de BAP em combinação com 0,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de ANA, a média obtida com 2,3 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP foi estatisticamente superior as demais. Considerando os resultados obtidos, para o estabelecimento de gemas apicais extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxizeiro variedade Turiaçu não é necessário o uso de ANA e a melhor concentração de BAP foi de 2,3 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP.

Tabela 15. Médias para comprimento (cm) de gemas apicais após 90 dias de cultivo *in vitro* em combinações com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)	ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)		
	0,0	2,5	5,6
0,0	0,86 c A	0,98 a A	1,97 a A
2,3	1,91 a A	0,58 a B	0,58 ab B
4,2	1,54 b A	0,67 a B	0,38 b B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (concentrações de BAP) e maiúscula na linha (concentrações de ANA) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni ($p < 0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados por Sulaiman *et al.* (2020), que obtiveram maior comprimento da parte aérea de plântulas do abacaxizeiro variedade MD2 no tratamento com concentração de 8,8 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP (2,0 mg L^{-1}) e 0,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de ANA. Os autores também relatam que doses maiores de BAP não promoveram o alongamento de parte aérea e que o ANA só teve efeito significativo no comprimento das plântulas quando usado na concentração de 5,6 $\mu\text{M L}^{-1}$ (1,0 mg L^{-1}) e sem a presença de BAP. No presente estudo, com gemas apicais extraídas da coroa do fruto da variedade Turiaçu, mesmo sem a presença de BAP, o ANA não teve efeito significativo no crescimento dos explantes, incluindo a maior concentração avaliada (5,6 $\mu\text{M L}^{-1}$), que corresponde a concentração onde o ANA teve efeito significativo para o crescimento dos explantes na fase de estabelecimento *in vitro* com abacaxizeiro MD2 no estudo de Sulaiman *et al.* (2020).

Assim como para CGAP, os efeitos dos reguladores de crescimento ANA e BAP foram significativos sobre o comprimento das gemas axilares (CGAX) após 90 dias de

cultivo *in vitro* (Teste de Kruskall-Wallis, $p < 0,05$). As médias para CGAX obtidas com diferentes concentrações de ANA não diferiram entre si na ausência de BAP e, quando em combinação com as concentrações de $2,3 \mu\text{M L}^{-1}$ e $4,2 \mu\text{M L}^{-1}$ de BAP, as médias dos tratamentos sem o uso de ANA foram significativamente superior ou não diferiram das verificadas quando usadas as concentrações de $2,5 \mu\text{M L}^{-1}$ e $5,6 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA (Tabela 16). Os resultados indicaram que, assim como verificado para gemas apicais, o uso do ANA não teve efeito no estabelecimento *in vitro* de gemas axilares. Na comparação das médias do CGAX obtidas com diferentes concentrações de BAP em combinação com $0,0 \mu\text{M L}^{-1}$ ANA, as médias obtidas com $0,0 \mu\text{M}$ e $2,3 \mu\text{M}$ de BAP não diferiram estatisticamente entre si e a média com $0,0 \mu\text{M}$ de BAP foi estatisticamente superior à obtida com $4,2 \mu\text{M}$ de BAP. Os resultados indicaram que os reguladores ANA e BAP não tiveram efeito significativo no comprimento de gemas axilares submetidas na fase de estabelecimento *in vitro* dos explantes.

Os resultados obtidos no presente estudo para gemas axilares diferem dos relatados para o abacaxizeiro cultivar Smooth Cayenne por Atawia *et al.* (2016), no qual os melhores resultados em relação ao comprimento da parte área foram obtidos com uso de BAP na concentração de $4,2 \mu\text{M L}^{-1}$ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$). Como já observado em outros estudos e também no presente, a resposta *in vitro* pode ser genótipo específica, o que explica as diferenças encontradas com diferentes genótipos. Considerando os resultados obtidos, para o estabelecimento *in vitro* de gemas axilares extraídas do talo da coroa de frutos do abacaxizeiro variedade Turiaçu não é necessário uso dos reguladores de crescimento ANA e BAP.

Tabela 16. Médias para comprimento (cm) de gemas axilares após 90 dias de cultivo *in vitro* em combinações com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)	ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)		
	0,0	2,5	5,6
0,0	2,82 a A	2,52 a A	2,89 a A
2,3	1,77 ab A	1,61 b A	0,89 b B
4,2	2,21 b A	0,91 c B	0,93 b B

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna (concentração de BAP) e maiúscula na linha (concentração de ANA) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni ($p < 0,05$).

Considerando os resultados obtidos no estabelecimento *in vitro* de gemas apicais e gemas axilares extraído da coroa de frutos do abacaxi da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, para gemas apicais recomenda-se apenas a adição de BAP na concentração de 2,3 $\mu\text{M L}^{-1}$ e para gemas axilares não há necessidade de acrescentar os reguladores BAP e ANA ao meio de cultura para esta fase.

7.3 Estiolamento e regeneração *in vitro* de brotos

7.3.1 Estiolamento de brotos

Apenas o regulador de crescimento BAP teve efeito significativo no comprimento do broto principal dos explantes submetidos ao estiolamento *in vitro*, tanto ANA quando a interação entre BAP e ANA não tiveram efeito significativo (Tabela 17). Considerando esses resultados, as médias entre as diferentes concentrações de BAP foram comparadas sem a necessidade de desdobramento nas diferentes concentrações de ANA.

Tabela 17. Resumo da análise de variância para comprimento do broto principal (cm) de explantes do abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, submetidos ao estiolamento *in vitro* durante 90 dias, em meio de cultura com diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftaleno Acético (ANA). Manaus, Amazonas, 2023.

Variáveis	GL	QM	F	Probabilidade
BAP	2	23,77	4,46	0,02 **
ANA	2	7,58	1,42	0,25 ns
BAP x ANA	4	10,42	1,95	0,12 ns
Resíduo	45	5,33		
Total	53			

CV = 70.08 %

** e ns, respectivamente, significativo e não significativo a 5 % de probabilidade.

A média para comprimento do broto principal obtida na ausência do regulador de crescimento BAP (4,6 cm) foi estatisticamente superior à obtida com uso da maior concentração (2,4 cm) e não diferiu da média obtida com a concentração intermediária (2,9 cm) (Tabela 18). Portanto, os resultados indicaram que para obter maior comprimento do broto principal do explante na indução do estiolamento *in vitro* não é necessário o uso dos reguladores de crescimento BAP e ANA. Com a maior

concentração de BAP ($4,2 \mu\text{M L}^{-1}$) foi verificado efeito inibidor no alongamento dos brotos, visto que a média foi significativamente inferior à obtida sem o uso do regulador de crescimento.

Tabela 18. Médias do comprimento do broto principal (CBPR) no estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro variedade Turiaçu aos 90 dias de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftalenoacético (ANA). Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)	CBPR (cm)	ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)	CBPR (cm)
0,0	4,6 a	0,0	2,6 a
2,3	2,9 ab	2,5	3,9 a
4,2	2,4 b	5,6	3,4 a

Médias seguida de letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

As auxinas e citocininas sintéticas são de uso comum no cultivo *in vitro* e os reguladores ANA e BAP aparecem na literatura como sendo os mais utilizados na micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro. No entanto, para estiolamento *in vitro* de brotos da variedade Turiaçu, os resultados indicaram que o uso dos reguladores de crescimento ANA e BAP pode ser dispensado, visto que ANA não apresentou efeito significativo no comprimento do broto e, para BAP, na ausência do regulador a média foi superior ou não diferiu dos tratamentos usando o regulador.

Assim como verificado no presente estudo com a variedade Turiaçu, em estudo com abacaxizeiro ornamental (*A. comosus* var. *erectifolius*), Carvalho *et al.* (2009) relataram redução no comprimento do broto com o uso de ANA e concluíram que os melhores resultados são obtidos sem o uso do regulador de crescimento. Resultados encontrados por Praxedes *et al.* (2001) sobre o efeito de diferentes doses de ANA ($0 \mu\text{M L}^{-1}$, $5 \mu\text{M L}^{-1}$, $10 \mu\text{M L}^{-1}$ e $15 \mu\text{M L}^{-1}$) no estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro cv. Pérola mostraram que entre nas concentrações mais baixas não houve diferença estatística para comprimento do broto, e que na maior concentração avaliada ($15 \mu\text{M L}^{-1}$) ocorreu redução drástica na característica, o que indica que em alta concentração o regulador tem efeito inibidor da alongação do broto para essa cultivar. No presente estudo, com o abacaxizeiro variedade Turiaçu, as médias para comprimento do broto não diferiram estatisticamente entre si, contudo, as concentrações avaliadas foram menores do que as testadas por Praxedes *et al.* (2001).

Para a variável número de brotos estiolados (NBE) não houve diferenças estatísticas entre as médias obtidas com diferentes concentrações de BAP,

independente da combinação com concentrações de ANA (Tabela 19). As médias para NBE obtidas com diferentes concentrações de ANA não diferiram estatisticamente entre si na ausência e na concentração mais alta do regulador BAP ($4,2 \mu\text{M L}^{-1}$). Na concentração intermediária de BAP ($2,3 \mu\text{M L}^{-1}$), as médias com $0,0 \mu\text{M L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA não diferiram estatisticamente entre si, mas apenas a média obtida sem o uso de ANA foi estatisticamente superior à obtida com a maior concentração do regulador de crescimento ($5,6 \mu\text{M L}^{-1}$). Assim, para obter o maior número de brotos estiolados não é necessário o uso dos reguladores ANA e BAP. O número de nós por unidade experimental (NNU) também não foi influenciado pelo uso dos reguladores de crescimento ANA e BAP nas concentrações utilizadas, uma vez que não foi verificada diferença estatística entre as médias dos tratamentos.

De acordo com os resultados, tanto para NBE como para NNU não é necessário acrescentar os reguladores de crescimento ANA e BAP ao meio de cultura MS. Como não houve diferença estatística entre as médias dos diferentes tratamentos, considerando a média geral, foram obtidos 1,1 brotos estiolados por broto inoculado e 2,3 nós por broto estiolado.

Em estudo com abacaxizeiro cultivar Pérola, Moreira *et al.* (2003) relataram efeito significativo dos reguladores de crescimento ANA e BAP no número de brotos estiolados, independente do período de permanência dos explantes na ausência de luz (20, 40 e 80 dias). Os autores concluíram que para a cultivar Pérola a melhor resposta para número de brotos estiolados é obtida com $9,5 \mu\text{M L}^{-1}$ ($1,8 \text{ mg L}^{-1}$) de ANA e $8,8$ ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) de BAP mantendo os explantes por 40 dias no escuro, condições em que foram obtidas 10,26 brotações por explantes estiolado.

Os reguladores de crescimento ANA e BAP também tiveram efeito significativo na formação de calos (Tabela 19), característica indesejada na via de micropropagação estudada. Os tratamentos sem o uso de BAP, independente da concentração de ANA, não proporcionaram a formação de calo, já em todos os demais tratamentos foi verificada a presença da estrutura. Nos tratamentos com ANA nas concentrações de $2,5 \mu\text{M L}^{-1}$ e $5,6 \mu\text{M L}^{-1}$ as médias obtidas $2,3 \mu\text{M L}^{-1}$ e $4,2 \mu\text{M L}^{-1}$ não diferiram entre si e foram superiores a verificada nos tratamentos sem o uso de BAP. Os resultados indicaram que para evitar a formação de calos nos brotos durante o estiolamento os reguladores de crescimento BAP e ANA não devem ser utilizados. A formação de calos em brotos submetidos ao estiolamento em meio com os

reguladores de crescimento ANA e BAP também foi relatada por Moreira *et al.* (2003) com o abacaxizeiro cultivar Pérola.

Tabela 19. Médias das variáveis número de brotos estiolados (NBE), número de nós na unidade experimental (NNU), formação de calo (CALO) e formação de raiz normal (RZ) avaliadas em explantes de abacaxizeiro variedade Turiaçu submetidas ao estiolamento *in vitro* com diferentes doses de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido naftalenoacético (ANA). Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)	ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)		
	0,0	2,5	5,6
NBE			
0,0	1,0 a A	1,3 a A	1,0 a A
2,3	1,5 a A	1,0 a AB	0,8 a B
4,2	1,5 a A	0,7 a A	1,2 a A
NNU			
0,0	1,5 a A	3,5 a A	1,8 a A
2,3	1,5 a A	3,2 a A	3,0 a A
4,2	1,3 a A	2,0 a A	3,0 a A
CALO			
0,0	0,0 b A	0,0 b A	0,0 b A
2,3	0,2 b B	0,8 a A	1,0 a A
4,2	0,8 a A	1,0 a A	1,0 a A
RAIZ			
0,0	1,0 a A	0,2 a B	0,0 a B
2,3	0,0 b A	0,0 a A	0,0 a A
4,2	0,0 b A	0,0 a A	0,0 a A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna (concentração de BAP) e maiúscula na linha (concentração de ANA) não diferem estatisticamente entre si pelo teste não paramétrico de comparação múltipla de médias de Bonferoni ($p < 0,05$).

A formação de raízes nos brotos estiolados também foi influenciada pelos reguladores de crescimento (Tabela 19), embora a formação de raízes tenha sido verificada em apenas dois tratamentos entre os nove avaliados, ambos na ausência de BAP. No tratamento sem o uso dos reguladores de crescimento ANA e BAP, 100% dos brotos estiolados formaram raiz, valor superior ao observado no tratamento com

2,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ de ANA, no qual 20% dos brotos formaram raiz. O regulador de crescimento ANA além de proporcionar alongamento de parte aérea é utilizado no meio de cultura com o objetivo de proporcionar enraizamento de mudas. Contudo, no caso do estiolamento de brotos do abacaxizeiro variedade Turiaçu, apenas um dos tratamentos usando ANA (2,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ e na ausência de BAP) proporcionou a formação de raiz.

No estiolamento de brotos o objetivo é obter o maior número de nós, pois estes são usados na fase seguinte para regeneração de brotos, assim, as variáveis que tenham correlação negativa com o número de nós (NNU) produzidos são desfavoráveis para esta técnica de micropropagação, por outro lado, são favoráveis as que apresentam correlação positiva com a variável. O NNU apresentou correlação positiva, alta e significativa com o comprimento do broto principal (CBP) (Tabela 20), indicando que com o aumento do comprimento do broto principal aumentou o número de nós produzidos. Duas correlações negativas e significativas foram verificadas entre as variáveis, formação de calo (CALO) com formação de raiz (-0,42) e CBP com CALO. Considerando os resultados das correlações, a formação de calos foi desfavorável por apresentar correlação negativa com CBP, que por sua vez apresenta correlação positiva com NNU, variável mais importante na técnica de estiolamento. A formação de raiz apresentou correlação negativa e significativa com a formação de calo, assim, com o aumento da frequência de brotos com raiz ocorreu menor frequência de formação de calo. Como a formação de calo apresentou correlação negativa com CBP, o aumento da frequência de brotos com raiz foi favorável na técnica de micropropagação por estiolamento.

Tabela 20. Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis número de brotos estiolados (NBE), número de nós na unidade experimental (NNU), comprimento do broto principal (CBP), formação de calo (CALO) e formação de raiz normal (RZ) em experimento de estiolamento *in vitro* de brotos de abacaxizeiro variedade Turiaçu. Manaus, Amazonas, 2023.

	NNU	CBP	CALO	RAIZ
NBE	0,23	0,14	-0,07	-0,07
NNU		0,76**	0,07	-0,14
CBP			-0,28*	0,12
CALO				-0,42**

* e **, significativo a 5% e 1% pelo teste t.

FASE 2: Regeneração de brotos.

No momento do isolamento dos segmentos nodais os brotos estiolados apresentavam-se aclorofilados devido ao cultivo na ausência de luz durante a fase de estiolamento. Após o 7º dia da inoculação *in vitro* e mantidos em sala de cultivo com exposição a luminosidade, os explantes já apresentavam coloração esverdeada, e ao completar 30 dias de cultivo, já era possível observar o surgimento de pequenas brotações (Figura 19).

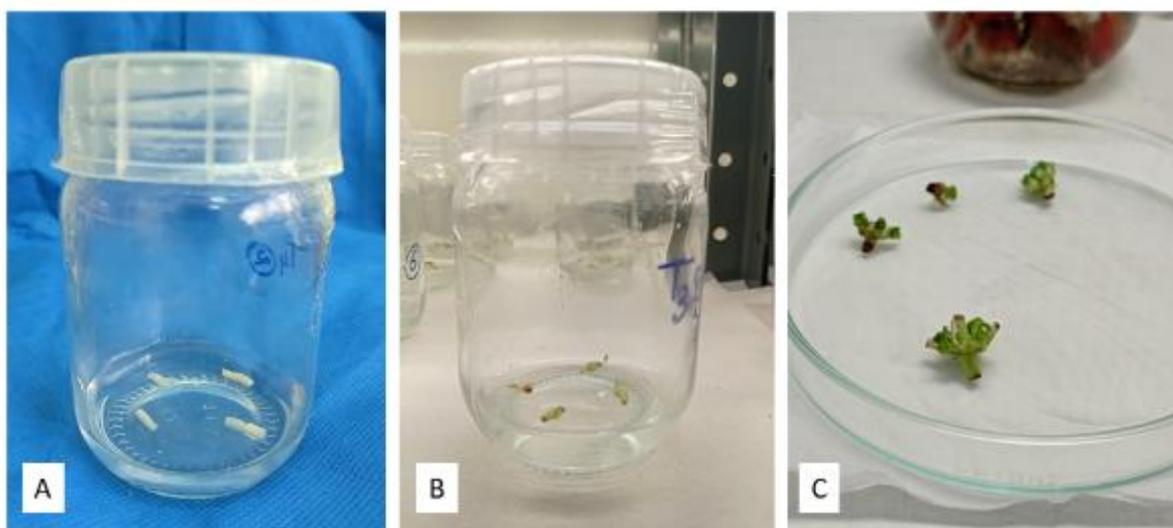


Figura 18. Segumentos nodais inoculados *in vitro* após fase de estiolamento dos brotos, condição no dia do isolamento e inoculação do explante (A), sete dias (B) e 30 dias (C) após a inoculação. (Fonte: Autora).

O regulador de crescimento BAP e o tempo de avaliação (T), bem como, a interação BAP, demonstraram efeito estatisticamente significativo na taxa de multiplicação de brotos a partir dos segumentos nodais cultivados *in vitro* (Tabela 21).

Tabela 21. Resumo da análise de variância para a taxa de multiplicação de brotos regenerados a partir de seguimentos nodais extraídos de brotos estiolados cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) em avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias após o isolamento dos explantes. Manaus, Amazonas, 2023.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
BAP (B)	4	135,96	74,8 **
Tempo (T)	2	616,38	339,2 **
B x T	8	41,13	22,62 **
Resíduo	75	1,82	
CV(%)	19,39		

* e **, significativo a 5% e 1% pelo teste F.

Devido ao efeito da interação ter sido significativo as análises foram realizadas fazendo os devidos desdobramentos, analisando o efeito do tempo dentro de cada nível de BAP e vice-versa. O efeito de tempo foi avaliado comparando os três tempos de avaliação como fatores qualitativos, enquanto o efeito do BAP dentro de cada tempo de cultivo foi análise por regressão polinomial, visto que é uma variável independente quantitativa avaliada com cinco níveis.

Com exceção do tratamento sem a adição de BAP, o número de brotos regenerados aumentou significativamente nos subseqüentes subcultivos, realizados aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação dos explantes *in vitro* (Figura 20). Aos 90 dias a taxa de multiplicação de brotos regenerados nos tratamentos com uso de BAP variou de 11,2 (6,8 $\mu\text{M L}^{-1}$) a 17,0 (27,0 $\mu\text{M L}^{-1}$) brotos por nó.

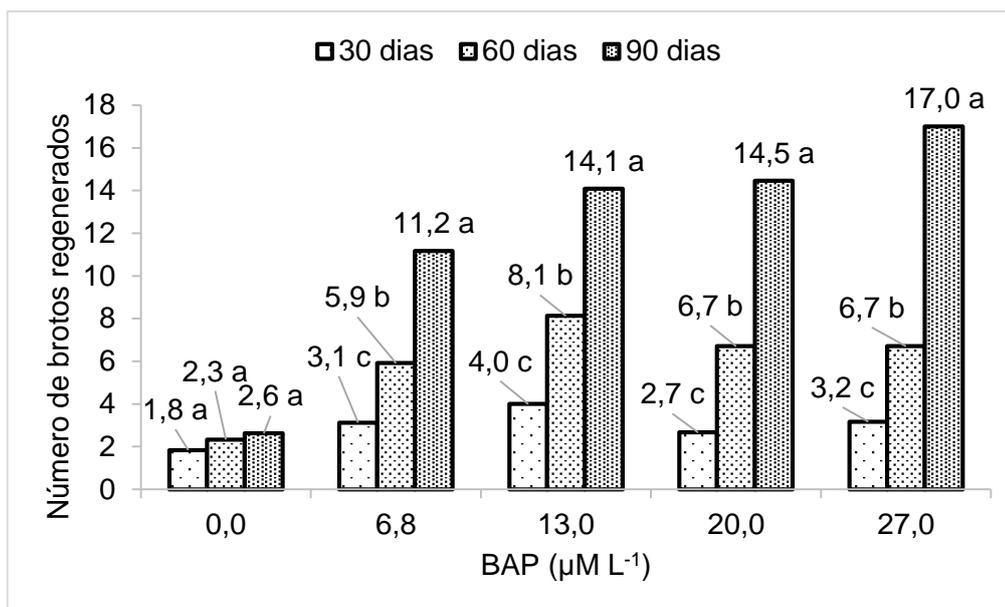


Figura 19. Taxa de multiplicação de brotos a partir do cultivo de seguimentos nodais extraídos de brotos estiolados cultivados em diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) em avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias após o isolamento dos explantes. Médias dentro de cada concentração de BAP seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade (Fonte: Autora).

Nos três períodos de avaliação o modelo quadrático de regressão foi o mais adequado para representar a variação no número de brotos regenerados em função da variação na concentração do regulador de crescimento BAP (Figura 21). Os coeficientes de determinação das equações quadráticas foram de 60,6% aos 30 dias, 91,2% aos 60 dias e 95% aos 90 dias, demonstrando que a porcentagem de explicação da variação pelos modelos aumentou da primeira até a última avaliação (Figura 22). De acordo com as equações, as estimativas de número máximo de brotos regenerados (máxima curvatura da equação) são obtidas com as concentrações de BAP: 16,3 µM L⁻¹ aos 30 dias, 17,6 µM L⁻¹ aos 60 dias e 23,7 µM L⁻¹ aos 90 dias. A partir dos valores da máxima curvatura da equação a estimativa do número de brotos regenerados passa a reduzir com o aumento da concentração do regulador de crescimento, assim, indicando que a concentração passou do valor ótimo para promover a multiplicação de brotos regenerados.

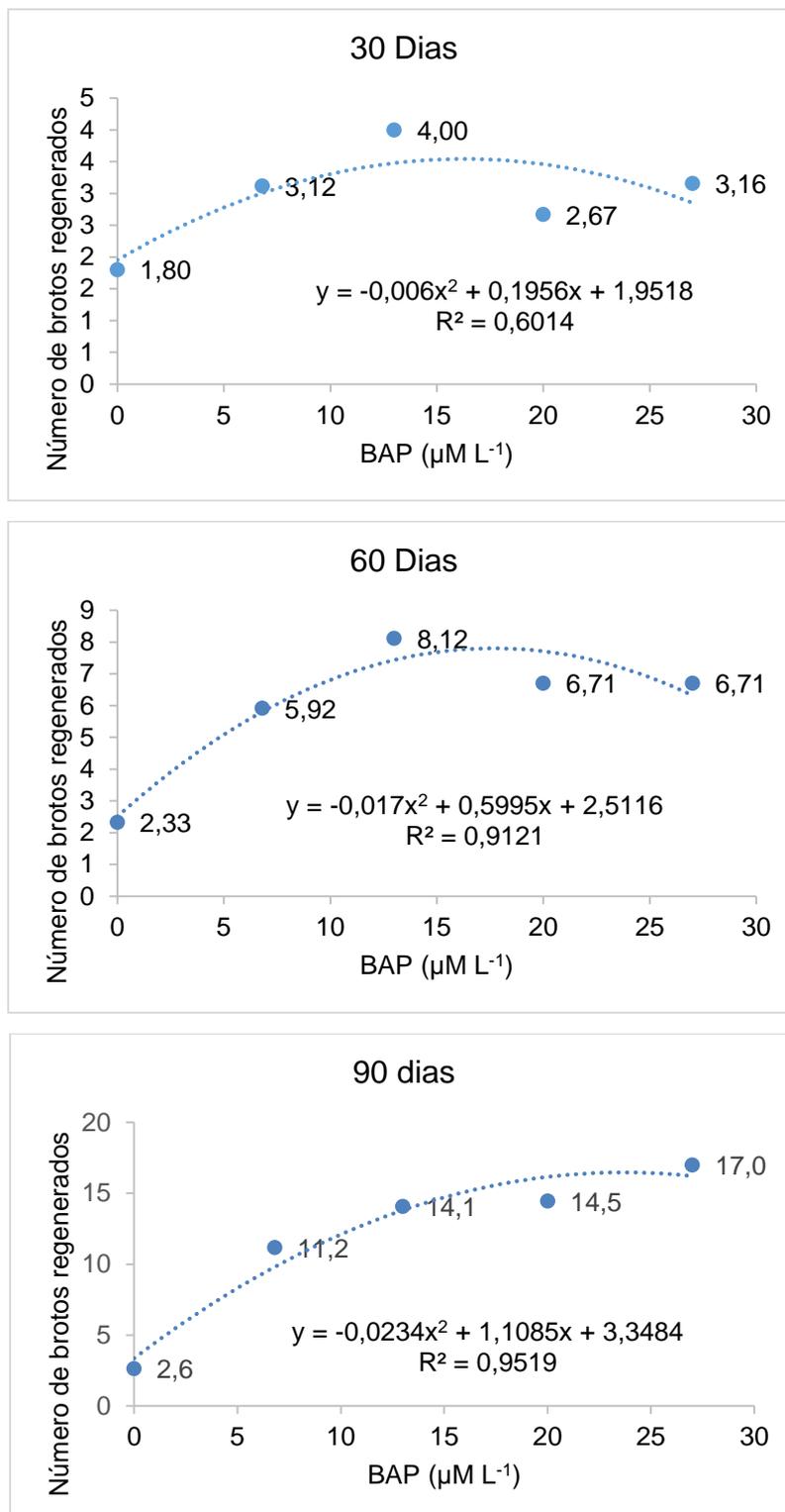


Figura 20. Equações de regressão para número médio de brotos regenerados em função da dose do regulador de crescimento Benzilaminopurina (BAP) em avaliações aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação *in vitro* de seguimento nodais extraídos de brotos estiolados de abacaxizeiro variedade Turiaçu gerados a partir de gemas axilares extraída da coroa do fruto. Médias obtidas em unidades experimentais com quatro seguimentos nodais. (Fonte: Autora).

Usando o método de indução de estiolamento e regeneração *in vitro* de brotos para micropropagação do abacaxizeiro ornamental *Ananas comosus* var. *bracteatus*, Carvalho *et al.* (2005) avaliaram o meio MS com os reguladores de crescimento AIA, ANA e AIB na fase de estiolamento e com BAP na fase de regeneração de brotos. Para a fase de estiolamento os autores concluíram não ser necessário usar nenhum dos reguladores de crescimento avaliados e, para a fase de regeneração concluíram como melhor tratamento o uso do meio MS acrescido de $13,32 \mu\text{M L}^{-1}$ de BAP. Na fase de estiolamento o número de nós por broto estiolado obtido pelos autores variou de 9,8 (sem uso de BAP) a 6,17 ($13,32 \mu\text{M L}^{-1}$), com a média obtida no tratamento sem BAP superior ou sem diferença estatística dos tratamentos com uso do regulador de crescimento. Relativo ao efeito do uso de auxinas na fase de indução do estiolamento o resultado do presente estudo com a variedade Turiaçu corrobora com o obtido por Carvalho *et al.* (2005), contudo, o número de nós obtidos pelos autores (6,2 a 9,8) foi superior ao obtido no presente estudo (2,3).

No estudo de Carvalho *et al.* (2005), aos 30 dias de cultivo *in vitro* de seguimentos nodais extraídos de brotos estiolados *in vitro* do abacaxizeiro ornamental *Ananas comosus* var. *bracteatus* o número de brotos regenerados variou de 0,6 a 1,0, sem diferença entre o tratamento sem BAP e os tratamentos com BAP na concentração de $4,44 \mu\text{M L}^{-1}$, $8,88 \mu\text{M L}^{-1}$ e $13,32 \mu\text{M L}^{-1}$. Os autores obtiveram diferenças significativas apenas aos 45 e 60 dias de cultivo, obtendo neste último período de 0,9 (sem BAP) a 2,0 ($13,32 \mu\text{M L}^{-1}$) brotos regenerados por seguimento nodal. Considerando o número de nós produzidos por broto estiolado (9,80 nós por broto sem uso de BAP aos 60 dias de cultivo) e o número de brotos regenerados por nó (1,13 brotos sem BAP aos 45 dias de cultivo) os autores obtiveram taxa de 11,1 brotos regenerados por broto estiolado ao final de 105 dias, ou ainda, taxa de multiplicação de 17,2 com uso de BAP ($13,32 \mu\text{M L}^{-1}$). Os valores obtidos são muito inferiores aos verificados aos 180 dias (90 de estiolamento e 90 de regeneração) no presente estudo, considerando que foram obtidos com base na média geral dos tratamentos 2,3 nós por broto e taxa média geral de regeneração de brotos acumulada de 341 brotos por nó (média dos tratamentos com uso de diferentes concentrações de BAP, as quais não diferiram entre si) (Tabela 22). Os resultados indicaram melhor resposta do abacaxizeiro variedade Turiaçu ao método de micropropagação usando o estiolamento e regeneração *in vitro* de brotos micropropagados.

A taxa de multiplicação de brotos regenerados acumulada após os três subcultivos (90 dias) variou de 15 a 507 brotos por seguimento nodal, contudo, apenas as médias obtidas com 13 $\mu\text{M L}^{-1}$ e 27 $\mu\text{M L}^{-1}$ foram estatisticamente superiores a obtida sem o uso do regulador (Tabela 22). As médias obtidas com as concentrações de 6,8 $\mu\text{M L}^{-1}$ e 20 $\mu\text{M L}^{-1}$ não diferiram significativamente nem do tratamento sem uso de BAP nem dos demais tratamentos com uso do regulador de crescimento.

Tabela 22. Médias para taxa acumulada de multiplicação de brotos regenerados (TAMB) a partir de seguimentos nodais extraídos de brotos estiolados cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP). Manaus, Amazonas, 2023.

BAP ($\mu\text{M L}^{-1}$)	TAMB*
0,0	14,7 b
6,8	215,6 ab
13,0	507,0 a
20,0	266,0 ab
27,0	375,5 a

* médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de regressão o modelo quadrático demonstrou ser o mais adequado para explicar a variação na taxa acumulada de multiplicação de brotos regenerados em função da concentração do regulador de crescimento BAP (Figura 22). O coeficiente de determinação da equação quadrática foi de 69,6%. De acordo com a equação, a estimativa máxima de taxa acumulada de multiplicação de brotos regenerados (máxima curvatura da equação) é obtida com a concentração de 18,6 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP. A partir do valor da máxima curvatura da equação a estimativa para taxa acumulada de multiplicação de brotos regenerados se reduz com o aumento da concentração do regulador de crescimento, assim, indicando que a concentração passou do valor ótimo para promover a maior multiplicação de brotos. De acordo com a equação de regressão, usando a melhor concentração estimada de BAP (18,6 $\mu\text{M L}^{-1}$), a estimativa para taxa de multiplicação é de 427,8 brotos regenerados por cada seguimento nodal cultivado.

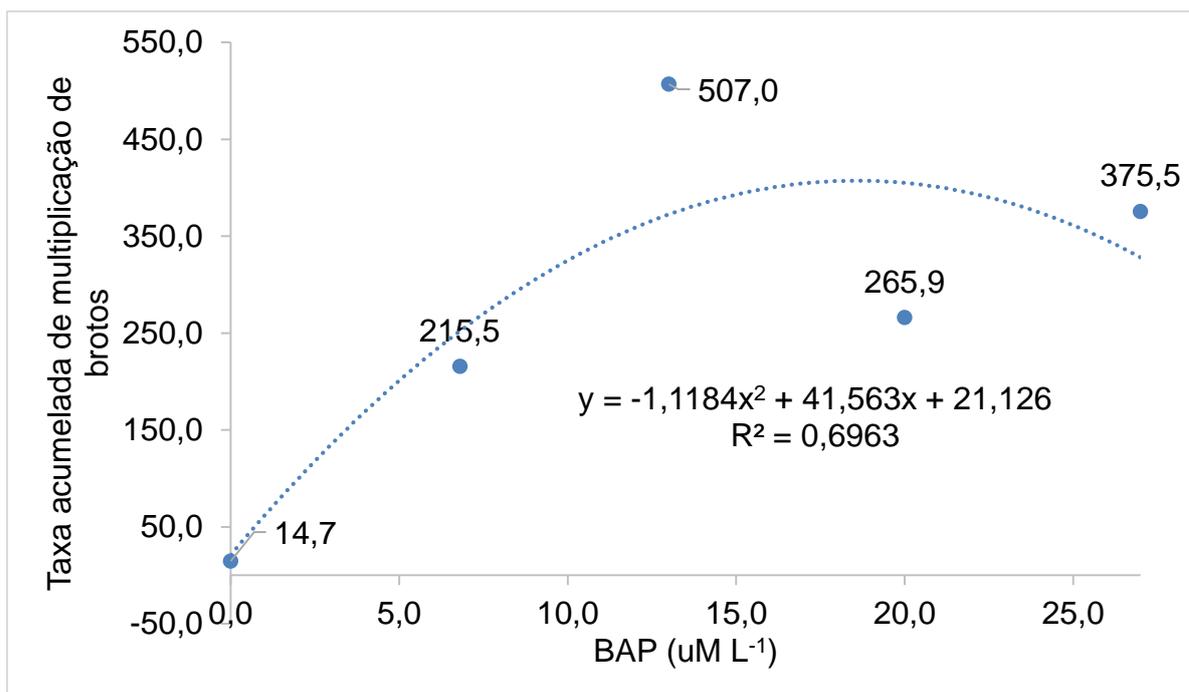


Figura 21. Equações de regressão para taxa acumulada de multiplicação de brotos (TAMB) em função da dose do regulador de crescimento Benzilaminopurina (BAP) após a inoculação *in vitro* de seguimento nodais extraídos de brotos estiolados de abacaxizeiro variedade Turiaçu gerados a partir de gemas axilares extraída da coroa do fruto. (Fonte: Autora).

7.4 Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas

Enraizamento *in vitro* das brotações

Para comprimento da parte aérea (CPA) o efeito de tratamentos não foi significativo ($F_{(GLT = 4, GLR = 35)} = 0,59$; probabilidade = 0,67), ou seja, a concentração de ANA não teve influência sobre a variável. A concentração do ANA teve efeito significativo (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) sobre as variáveis comprimento de raízes normais (CR), número de raízes normais (NRN) e número de raízes anormais (NRA), com diferenças estatísticas significativas (Teste múltiplo de Bonferroni, $p < 0,05$) entre as médias obtidas com diferentes concentrações do regulador (Tabela 23).

Tabela 23. Média das características comprimento de raízes normais (CR), número de raízes normais (NRN) e número de raízes anormais (NRAN) avaliadas em mudas do abacaxizeiro variedade Turiaçu micropropagadas *in vitro* em cinco doses de ácido naftaleno acético (ANA) após 45 dias de cultivo *in vitro*. Manaus, Amazonas, 2023.

ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)	CR	NRN	NRAN
0,0	3,66 a	3,53 a	1,00 a
5,6	1,30 b	0,00 b	0,63 b
10,8	0,39 c	0,38 b	0,38 b
16,2	0,04 d	0,22 b	0,34 b
21,5	0,15 cd	0,31 b	0,00 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo método não paramétrico de comparação múltipla de médias de Bonferroni ao nível de 5% de probabilidade.

A média para CR no tratamento sem o uso de ANA foi superior a todos os tratamentos com uso do regulador, bem como, foi verificada redução de CR com o aumento da concentração de ANA, o que demonstra efeito inibitório do regulador sobre a variável. Os resultados obtidos corroboram com Pasqual *et al.* (2008), onde o comprimento médio de raízes do abacaxizeiro *Ananas comosus* var. *erectifolius* foi superior nos tratamentos em que não foi adicionado regulador de crescimento. Para as variáveis número de raízes normais (NRN) e número de raízes anormais (NRA) as médias do tratamento sem ANA foi superior a todos os que usaram o regulador de crescimento, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os resultados obtidos no presente estudo para número médio de raízes formadas por broto diferem dos obtidos em estudo com o abacaxizeiro cultivar Emepa 1 por Moraes *et al.* (2010), no qual verificou-se que o regulador de crescimento ANA promoveu aumento significativo no número de raízes formadas. Essa diferença pode ser atribuída a resposta diferencial dos genótipos em relação ao efeito do regulador de crescimento na formação de raízes.

No processo de enraizamento é mais favorável o tratamento que promove a formação de maior número de raízes, bem como, o maior crescimento das raízes, o que foi obtido sem o uso de regulador de crescimento ANA. No tratamento sem uso de ANA foi verificado também maior número de raízes anormais (NRAN), contudo, destaca-se que este foi o tratamento que apresentou também maior número de raízes normais. Além disso, nos tratamentos com uso de ANA, o NRAN foi igual ou superior ao NRN, com exceção do tratamento com a maior concentração de ANA, onde apesar de não serem observadas raízes anormais, a média de raízes normais formadas por

broto foi de apenas 0,31. No tratamento com $5,6 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA só foram formadas raízes anormais. Considerando os resultados obtidos, o tratamento sem o regulador de crescimento ANA é o mais favorável para o enraizamento *in vitro* dos brotos produzidos por micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro variedade Turiaçu.

A concentração do regulador de crescimento ANA usado na fase de enraizamento *in vitro* teve efeito significativo (Tabela 24) nas variáveis massa fresca (MF) e massa seca (MS) das plântulas enraizadas indicando diferenças estatísticas entre médias obtidas nas diferentes concentrações do regulador de crescimento.

Tabela 24. Resumo da análise de variância para massa fresca (MF) e massa seca (MS) de mudas de abacaxizeiro variedade Turiaçu enraizadas, após 45 dias de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de ANA. Manaus, Amazonas, 2023.

Fonte de Variação	DF	MF	MS
ANA	4	3,77	0,048
Resíduo	15	0,88	0,008
F		4,29*	5,86**
CV(%)		26,43	28,64

* e **, significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F.

A média para MF do broto enraizado obtida com $10,8 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA foi estatisticamente superior à obtida sem o uso do regulador de crescimento e não diferiu significativamente das médias obtidas nos tratamentos com uso de diferentes concentrações do regulador de crescimento. Ainda para MF, exceto a média obtida com $10,8 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA, as médias dos tratamentos com o uso de ANA não diferiram do tratamento sem o uso do regulador de crescimento. Para MS do broto, as médias obtidas com diferentes concentrações de ANA não diferiram estatisticamente entre si e, exceto a média obtida com $16,2 \mu\text{M L}^{-1}$, todas foram superiores à média obtida sem o uso de ANA.

Tabela 25. Média das variáveis massa fresca (MF) e massa seca (MS) de mudas de abacaxizeiro variedade Turiçu enraizadas, após 45 dias de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de ANA. Manaus, Amazonas, 2023.

ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)	PF (g)	OS (g)
0,0	2,55 b	0,16 b
5,6	4,43 a b	0,37 a
10,8	4,65 a	0,43 a
16,2	2,68 a b	0,27 a b
21,5	3,43 a b	0,36 a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Na análise de regressão, tanto para MF como para MS do broto, o modelo adequado para representar a resposta das variáveis em função do aumento da concentração de ANA foi o polinomial cúbico, no qual os efeitos dos coeficientes de regressão foram significativos e dos desvios de regressão não significativos (Figura 23). As equações de regressão apresentaram altos valores de coeficiente de determinação: 0,88 para MF e 0,90 para MS, o que indica alta precisão para explicar a variação nas variáveis em função da variação na concentração de ANA. De acordo com as curvaturas das regressões, os maiores valores para MF e MS são obtidos próximo da concentração de $5,6 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA, contudo, nessa concentração o número e o comprimento de raízes foi inferior ao tratamento sem uso do regulador, características que devem ser consideradas mais importantes do que biomassa acumulada nessa fase de produção das mudas.

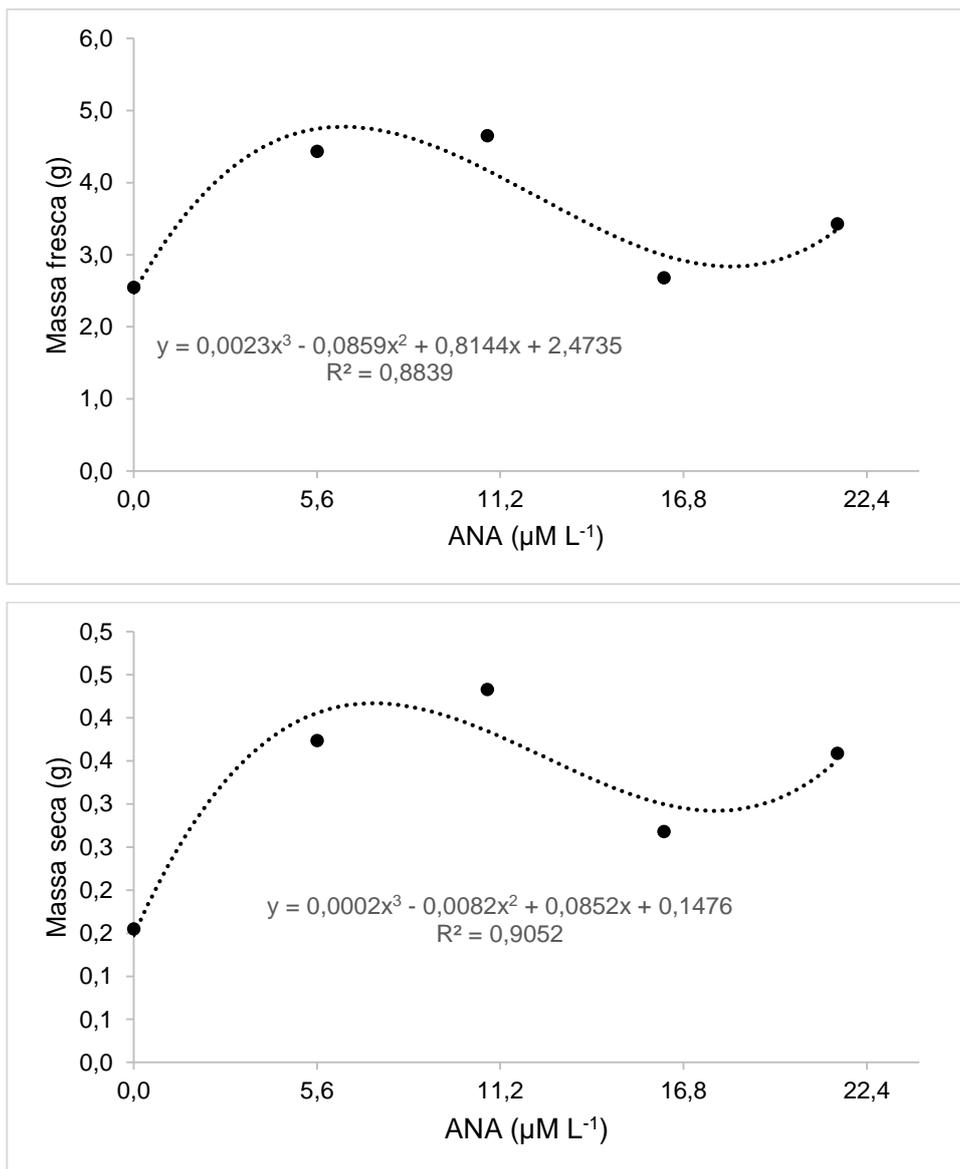


Figura 22. Equações de regressão para massa fresca (A) e massa seca (B) de plântulas de abacaxizeiro variedade Turiçu produzidas *in vitro* em função da concentração do regulador de crescimento ANA na fase de enraizamento das plântulas (Fonte: Autora).

A correlação entre a massa fresca e a massa seca das plântulas foi alta, positiva e significativa (0,86; teste T com $p < 0,05$), o que indica que o aumento na massa fresca está fortemente associado ao aumento na massa seca e que resultados similares são obtidos com as duas variáveis. Por questões práticas e de custo, para avaliar o acúmulo de massa dos brotos durante a fase de enraizamento *in vitro*, pode-se optar pela massa fresca em detrimento da massa seca.

Considerando que o objetivo da fase de enraizamento é a formação de raízes, apesar de menor acúmulo de biomassa nos brotos, o tratamento sem o uso de regulador de crescimento ANA demonstrou ser o mais favorável, pois promoveu formação de maior número de raízes e de maior comprimento de raiz.

7.5 Aclimatação

Do total de 80 mudas utilizadas no experimento de aclimatação apenas três morreram (3%), sendo estas distribuídas em três diferentes parcelas, cada uma de um diferente tratamento ($5,6 \mu\text{M L}^{-1}$, $10,8 \mu\text{M L}^{-1}$ e $21,5 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA). A sobrevivência das mudas foi de 100% em 17 (4 mudas por parcela) das 20 parcelas, nas três demais parcelas experimentais com plantas mortas, ao final do experimento, foram avaliadas três mudas na unidade experimental.

O regulador de crescimento ANA usado na fase de enraizamento das plântulas *in vitro* não teve efeito em nenhuma das variáveis avaliadas na fase de aclimatação das plantas, o que indica que as médias dos tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 26). A variável diâmetro do coleto (DC) não atendeu aos pressupostos para análise de variância e teste F, neste caso, o efeito dos tratamentos foi identificado como não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis (graus de liberdade = 4, probabilidade = 0,11).

Tabela 26. Resumo da análise de variância para as variáveis diâmetro do coleto (DC), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CFMA), largura da maior folha (LFMA), comprimento da menor folha (CFME), largura da menor folha (LFME), comprimento de raiz (CR) e teor de clorofila (CLOR), avaliadas em plantas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu produzidas com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) após 90 dias de aclimação. Manaus, Amazonas, 2023.

Variáveis	Fonte de variação		CV(%)
	Tratamento	Resíduo	
	GL = 4	GL = 15	
NF	0,21 ns	0,87	7,37
CFMA	0,08 ns	1,48	12,28
LFMA ¹ (Transformação = ln(x))	0,02 ns	0,01	27,00
CFME	0,40 ns	1,60	43,55
LFME ¹ (Transformação = Raiz(x))	0,11 ns	0,07	22,95
RAIZ ¹ (Transformação = ln(x))	0,01 ns	0,006	46,29
CLOR	12,02 ns	129,20	19,30

ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. GL = graus de liberdade

¹ Análise de dados transformados.

Apesar de não terem sido identificados efeitos estatisticamente significativos da concentração de ANA, pelos valores do coeficiente de variação é possível verificar que as maiores variações entre as médias foram observadas para as variáveis LFME, (CV = 28%) e DC (CV = 27%), por outro lado, as médias das variáveis CFMA (CV = 1,5%) e NF (CV = 1,7%) apresentaram variação muito baixa (Tabela 27). Aos 90 dias de aclimação as mudas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu apresentaram os seguintes valores médios: 14,3 mm de diâmetro do coleto (DC); 12,7 folhas (NF); 9,9 cm de comprimento e 2,6 cm de largura da maior folha; 2,9 cm de comprimento e 1,3 cm de largura da menor folha; 1,5 cm de comprimento da maior raiz e teor de clorofila de 58,9.

Tabela 27. Médias e estatísticas descritivas das variáveis diâmetro do coleto (DC), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CFMA), largura da maior folha (LFMA), comprimento da menor folha (CFME), largura da menor folha (LFME), comprimento de raiz (CR) e teor de clorofila (CLOR), avaliadas em plantas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu produzidas com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA), aos 90 dias aclimatadas. Manaus, Amazonas, 2023.

ANA ($\mu\text{M L}^{-1}$)	DC (mm)	NF	CFMA (cm)	LFMA (cm)	CFME (cm)	LFME (cm)	RAIZ (cm)	CLOR
0,0	11,7	12,9	9,9	2,3	3,0	1,1	1,7	60,0
5,6	13,4	12,8	9,7	2,4	2,9	1,3	1,4	58,8
10,8	20,5	12,3	10,0	3,2	3,3	1,9	1,2	58,3
16,2	10,7	12,7	10,1	2,2	2,5	0,9	1,6	56,4
21,5	15,5	12,6	9,8	2,8	2,8	1,5	1,4	60,9
Média	14,3	12,7	9,9	2,6	2,9	1,3	1,5	58,9
Desvio Padrão	3,9	0,2	0,1	0,4	0,3	0,4	0,2	1,7
Coef. Variação (%)	27,2	1,7	1,5	16,2	10,9	28,9	11,7	2,9

Coef = Coeficiente

A média para variável NF (12,7) aos 90 dias de aclimação das mudas micropropagadas do abacaxizeiro variedade Turiaçu observada neste estudo foi inferior a relatada por Carvalho *et al.* (2012) aos 83 dias de aclimação de mudas micropropagadas do abacaxizeiro *Ananas comosus* var. *erectifolius*, 18,4 folhas. No entanto, o valor foi similar ao obtido por Gonçalves *et al.* (2018) com mudas micropropagadas do abacaxizeiro cultivar BRS Imperial, 13,8 folhas aos 60 dias de aclimação. A variação nos resultados obtidos pode ser atribuída a efeito do genótipo, bem como, as condições ambientais e a interação genótipo x ambiente. Na questão de ambiente, os estudos foram realizados com diferentes tipos de substrato e de recipientes, assim, na comparação com outros estudos não é possível inferir sobre a importância dos efeitos de genótipo e de ambiente nas diferenças verificadas para número de folhas.

A largura média da maior folha (2,6 cm) das mudas micropropagadas do abacaxizeiro Turiaçu aos 90 dias na fase aclimação foi superior à obtida por Carvalho *et al.* (2012) para mudas micropropagadas do abacaxizeiro ornamental *Ananas comosus* var. *erectifolius* (2,05 cm). O comprimento médio da raiz (14,2 cm) também foi superior à média relatada por Gonçalves *et al.* (2018) para mudas micropropagadas do abacaxizeiro cultivar Imperial (9,4 cm), mesmo sendo a avaliação realizada aos 120 dias de aclimação e usando o mesmo substrato do presente estudo (Vivatto Plus®).

Com relação ao tempo de aclimação, exceto para a variável diâmetro do coleto, independente do tratamento, o efeito não foi significativo nas variáveis, ou seja, as médias apresentadas pelas variáveis aos 30, 60 e 90 dias não diferiram estatisticamente entre si (Figura 24). No caso do DC, a média obtida aos 90 dias foi significativamente superior à média obtida com 30 dias em todos os tratamentos. Quando comparadas as médias obtidas com 90 dias e 60 dias, apenas nos tratamentos com as concentrações $5,6 \mu\text{M L}^{-1}$ e $16,2 \mu\text{M L}^{-1}$ de ANA estas não diferiram estatisticamente entre si. Apesar do efeito não ter sido significativo nas variáveis associadas a número e dimensões de folha, o maior diâmetro do coleto aos 90 dias indica maior vigor das mudas com esse período de aclimação. Ressalta-se que não foi avaliada a biomassa acumulada pelas mudas durante a aclimação, assim como, o comprimento de raízes foi avaliado apenas aos 90 dias.

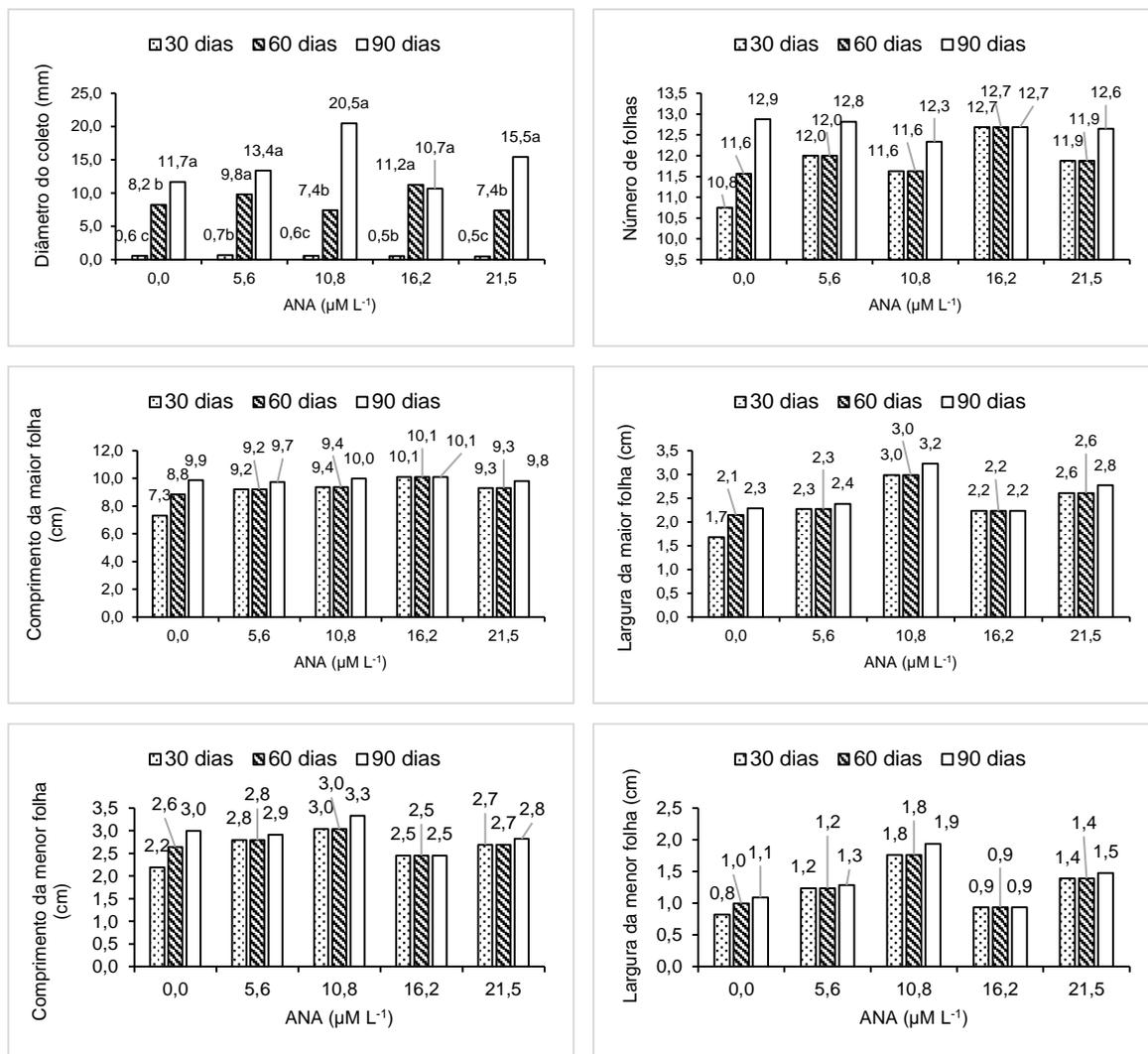


Figura 23. Variáveis diâmetro do coleto, número de folhas, comprimento da maior folha, largura da maior folha, comprimento da menor folha e largura da menor folha de mudas micropropagadas de abacaxizeiro variedade Turiaçu, aos 30, 60 e 90 dias de aclimação. Médias de diferentes períodos seguidas de mesma letra minúsculas, dentro da mesma concentração, não diferem estatisticamente entre si (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Com os resultados obtidos é possível concluir que as condições de aclimação no presente estudo foram adequadas para boa adaptação das mudas micropropagadas do abacaxizeiro variedade Turiaçu ao ambiente *ex vitro* (Figura 25). Contudo, novos estudos com diferentes substratos e ou condições ambientais poderão proporcionar redução de tempo e melhor desenvolvimento na aclimação de mudas micropropagadas do abacaxizeiro variedade Turiaçu.



Figura 24. Acclimação em casa de vegetação de mudas do abacaxizeiro variedade Turiçu obtidas por micropropagação *in vitro* usando. Dia do transplante para casa de vegetação (A); 30 dias (B), 60 dias (C) e 90 dias após o transplante (D). (Fonte: Autora)

8 CONCLUSÕES

Na assepsia de gemas extraídas do talo da coroa de frutos de abacaxi da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, para gemas apicais recomenda-se o uso de solução de hipoclorito de sódio com 0,5% de cloro ativo e para gemas axilares com 1,25% de cloro ativo e 5 minutos de imersão na solução asséptica para ambos os tipos de gema.

No estabelecimento *in vitro* de gemas extraídas da coroa de frutos do abacaxi da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, recomenda-se para gemas apicais meio MS acrescido de $2,3 \mu\text{M L}^{-1}$ de BAP e para gemas axilares apenas o cultivo em meio MS sem uso de reguladores de crescimento por 90 dias.

Para o estiolamento *in vitro* de brotos micropropagados, obtidos de gemas axilares da coroa do fruto do abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, não há necessidade do uso de reguladores de crescimento, apenas do cultivo do explante em meio MS na ausência de luz durante 90 dias. Para a multiplicação por regeneração de brotos a partir de seguimentos nodais produzidos por brotos estiolados oriundos de gemas axilares isoladas da coroa do fruto do abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, recomenda-se o cultivo em meio MS com $18,6 \mu\text{M L}^{-1}$ de BAP, com três subcultivos realizados em intervalos de 30 dias.

O método de estiolamento e regeneração de brotos *in vitro*, usando brotos obtidos de gemas axilares do talo da coroa do fruto, é eficiente para micropropagação da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas, com taxa de multiplicação estimada em 427,8 brotos regenerados por explante com uso de $18,6 \mu\text{M L}^{-1}$ de BAP na fase de regeneração de brotos.

Para o enraizamento *in vitro* de brotos do abacaxizeiro variedade Turiaçu cultivado no Amazonas, recomenda-se o cultivo em meio MS sem acréscimo de reguladores de crescimento por 45 dias.

A aclimação e o desenvolvimento das mudas micropropagadas do abacaxizeiro variedade Turiaçu não é influenciado pelo uso de reguladores de crescimento na fase de enraizamento *in vitro*.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo representa o primeiro esforço no desenvolvimento de protocolos para micropropagação *in vitro* da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas. Embora ainda existam aperfeiçoamentos a serem realizados, os resultados apresentados permitem recomendar procedimentos suficientes para a produção em larga escala de mudas micropropagadas da variedade Turiaçu cultivada no Amazonas. Entre os benefícios das mudas micropropagadas podemos destacar a possibilidade de produção de mudas livres de vírus, com destaque para o vírus causal da murcha do abacaxizeiro (PMWaV), um dos principais problemas sanitários da cultura e que reduz significativamente a produtividade dos plantios. Para este fim é recomendado que a micropropagação seja realizada utilizando como explante as gemas apicais, que estão menos sujeitas a contaminação por vírus. Além disso, a ausência de vírus no material micropropagado precisa ser certificada pela indexação das mudas produzidas, o que não foi realizado no presente estudo.

Na etapa seguinte é necessário que seja avaliado o desempenho em campo das plantas micropropagadas para verificar se estas mantem as características da variedade Turiaçu, o que é esperado, pois o método de propagação utilizado tem pequena probabilidade de gerar mutações, visto que explora a organogênese direta, usa pouco regulador de crescimento e também poucos subcultivos.

Com relação ao custo de produção das mudas micropropagadas, embora não tenha sido estimado no presente estudo, sabe-se que devido à alta densidade de plantio, que no Brasil varia entre 30.000 e 40.000 plantas ha⁻¹, é inviável economicamente para o produtor adquirir mudas micropropagadas para toda sua área de cultivo. O recomendado é que sejam adquiridas mudas micropropagadas para o estabelecimento de campos de multiplicação e usa os filhotes produzidos nesses campos para ampliação da área de plantio. O benefício do uso das mudas micropropagadas dependerá do aumento de produtividade verificado, o que é esperado pela qualidade fisiológica e sanitária das mudas micropropagadas, além de proporcionarem maior uniformidade no plantio, o que facilita a indução do florescimento e a colheita dos frutos.

A micropropagação *in vitro* também poderá ser utilizada para a multiplicação em larga escala de genótipos superiores da variedade Turiaçu cultivada no

Amazonas. Embora ainda não existam estudos sobre variabilidade genética na variedade, pelo longo tempo de cultivo (décadas) e pela extensão da área cultivada, é provável que exista variabilidade genética para ser explorada por seleção.

Entre os estudos que podem contribuir para aperfeiçoamento de protocolos de micropropagação do abacaxizeiro variedade Turiaçu sugerimos estudos com o cultivo em meio líquido, uso de biorretos de imersão temporária e também estudos na fase de aclimação das mudas, avaliando diferentes substratos e condições ambientais.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBIM, E. M. S.; LAMEIRA, O. A.; REIS, I. N. R. S.; PANTOJA, S. S. P. Assepsia e estabelecimento de in vitro de gemas axilares de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) - *Bromeliaceae*. **Revista Ciências Agrária**, Belém, n. 43, p. 17-28, jan./jun. 2005

ATAWIA, A. R.; ABD EL-LATIF, F.M.; EL-GIOUSHY, F.; SHERIF, S. M. Kotb. Studies on Micropropagation of Pineapple (*Ananas comosus* L.). **Middle East Journal of Agriculture**. Volume : 05 | Issue : 02 | April-June | 2016. Page: 224-232.

AGHION, D.; BEAUCHESNE, G. Utilisation de la technique de culture sterile d'organes pour obtenir des clones d'ananas. **Fruits**, Paris, v.15, n.10, p. 464 - 466, 1960.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso 7 de dezembro, 2022.

AMAZONAS. Assembleia Legislativa do Estado do Amazonas. **Lei N. 5.306**, de 6 de novembro de 2020. Declara como Patrimônio Cultural de Natureza Imaterial o Cultivo de Abacaxi de Novo Remanso. Poder Legislativo, Manaus (AM), 6 de nov. de 2020.

ANDRADE, S. R. M. **Princípio da cultura de tecido vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p.

ARAÚJO, J.R.G.; AGUIAR JÚNIOR, R.A.; CHAVES, A.M.S.; REIS, F.O.; Martins, M.R. Abacaxi 'Turiaçu': cultivar tradicional nativo do Maranhão. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n. 4, p. 1270-1276, 2012a.

ARAÚJO, A. G.; LEDO, A. da S.; RIBEIRO, M. M. de J.; ALMEIDA, C. S.; SANTANA, J. G. S. **Propagação in vitro de Abacaxizeiro 'Vitória' a partir de Brotos Estiolados**. In: **Ciclo de palestras sobre cultivo in vitro de plantas**, 3, 2012, Aracaju. Anais. Brasília, DF: Embrapa, 2012b.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação in vitro do híbrido PExSC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 3, p. 417-423, 2001.

BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.185-194, fev. 2006.

BIENVENU, B. T.; ARNAUD, A.; LEIFI, N.; RENÉ, D.; CACAÏ G. T. H.; SERGE, H. S.; Ahanhanzo Corneille. Effects of Two Disinfectants and Two Growth Regulators on in vitro Propagation of Smooth Cayenne and Sugarloaf Cultivars of Pineapple (*Ananas comosus* (L) Mill var. *comosus*). **Journal of Biotechnology Research**, 2017, 3(10): 94-105.

BORGES N. S. S.; CORREIA D.; ROSSETTI A. G. 2003. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 9: 37-44.

BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17: p. 187-190, 2017.

BRASIL, 2022a. RNC - Registro Nacional de Cultivares. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> Acesso: 7 de dezembro de 2022.

BRASIL, 2022b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, nº43, de 17 de setembro de 2013. **Lei nº 10.711**, de 05 de agosto de 2003. Dispõe de normas para a produção e comercialização do abacaxizeiro. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/INN43de17desetembrode2013.pdf>.

BRAGA E. P.; MORAIS J. P.S.; CARVALHO A. C. P. P.; SANTOS M. R. A. 2003. Avaliação dos efeitos do número de explantes, do meio de cultura e do fotoperíodo na multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller). In: 14º CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS. **Anais [...]**. Lavras: UFLA. p.313.

CABRAL, J. R. S.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. O abacaxizeiro. 2002. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: Editora UFV, p. 37-61, 2002.

CARVALHO A. C. P. P.; PINHEIRO M. V. M.; DIAS G. M. G.; MORAIS J. P.S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira** 27: 103-108. 2009.

CARVALHO, A. C. P. P. de; BRAGA, E. P.; SANTOS, M. R. A. dos; MORAIS, J. P. S. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) através da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 11, n.2, p. 121-126, 2005.

CARVALHO, A. C. P. P.; BOMFIM, G. V.; AZAVEDO, B. M.; VIANA, T. V. A.; FURLAN, R. A.; BEZERRA, F. C.; GONDIM, R. S.; OLIVEIRA, K. M. A. S.; VASCONCELOS, D.

V. Aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *erectifolius*). Fortaleza : **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2012.

CONCEIÇÃO, R. L. D. S. D. **Viabilidade, estabilidade genética e limpeza viral de plantas de abacaxizeiro mantidas sob conservação *in vitro* por dez anos.** – Cruz das Almas, 2014.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; JUNGHANS, D. T.; CABRAL, J. R. S. Abacaxizeiro. In: Bruckner, C. H.; Santos, C. E. M. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Editores. - Viçosa: Ed. UFV, 2018.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. 2003. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: Bartholomew, D. P.; Paull, R. E.; Rohrbach, K.G. (Eds.): **The Pineapple: botany, production and uses**. New York, CABI Publishing, 2003. p. 13-32.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F.; DUVAL, M. F. **Germplasm resources of pineapple**. Horticultural Reviews, v. 21. P.133-175. 1997.

DEY, K. K.; VERDE, J. C.; MELZER, M.; BORTH, W.; HU, J. S. Mealybug wilt of pineapple and associated viruses. **Horticulturae** 2018, 4, 52.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae4040052>

DUVAL, M. F.; D'EECKENBRUGGE, C.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S.; BIANCHETTI, L. B. First results from joint Embrapa – Cirad Ananas germplasm collecting Brazil and French Guyana. **Acta Horticulturae**, v. 425, p. 137-144, 1997.

ESTATCAMP (2014) Software Action. Estatcamp — **Consultoria em estatística e qualidade**.

Disponível em: <<http://www.estatcamp.com>>
Acesso em: 01 de janeiro de 2022.

SOUZA, F.V.D.; SANTOS, M.T.; SOUZA, E.H.; CARVALHO, A.C.P.P.; LEDO, C.A.S. *In vitro* nodal segment cultivation of wild accessions of pineapple. **Acta Horticulturae**. 1239. ISHS 2019. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1239.16, 2019.

FAO Stat. **Leading countries in pineapple production worldwide in 2021**.

Disponível em: <www.fao.org/faostat/> Acesso em: 5 de maio de 2023.

GARCIA, M. V. B.; GARCIA, T. B.; MATOS, A. P. DE; JUNGHANS, D. T.; CABRAL, J. R. S. **Situação e perspectivas da abacaxicultura no Amazonas**. In: Simpósio brasileiro da cultura do abacaxi, 5., 2013, Palmas. Produção e qualidade com tecnologia e sustentabilidade: anais. Palmas: Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado do Tocantins, 2013. 1 CD-ROM.

GONÇALVES, J. S.; MUNIZ, N. P.; SOUZA, E. H. de; SOUZA, F. V. D.; SILVA, H. S. A. **Crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos**

suplementados com rizobactérias produtoras de ácido indolacético. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 92, ISSN 1809-5003, abril/2018.

GONDIM, T. M. D. S.; AZEVEDO, F. F. DE. Diferenciação floral do abacaxizeiro cv. SNG-3 em função da idade da planta e da aplicação do carbureto de cálcio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 420-425, agosto 2002.

GREEN, J.C., RWAHNIH, M.A.; OLMEDO-VELARDE, A.; MELZER M. J.; HAMIM, I.; BORTH, W. B; BROWER, T. M.; PAREDE, M.; HU, J. S. Further genomic characterization of pineapple mealybug wilt-associated viruses using high-throughput sequencing. **Tropical plant pathology**. 45, 64–72 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00330-y>

IBGE, 2021. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Produção Agrícola Municipal. Lavouras Temporárias**, tabela 1, 2021. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 5 de maio de 2023.

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO E FLORESTAL SUSTENTÁVEL DO ESTADO DO AMAZONAS - (IDAM). **Abacaxi da Região de Novo Remanso é Destaque como Patrimônio Imaterial do Amazonas**. 2020. Disponível em: <http://www.idam.am.gov.br/abacaxi-da-regiao-de-novo-remansoedestaque-como-patrimonio-imaterial-do-amazonas/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.

KOHPAI F.N.; FARAHANI F.; NOORMOHAMMADI Z. Somaclonal variation in the *in vitro* regenerated pineapple (*Ananas comosus*): Investigation of the cellular characteristics, biochemical specificities and ISSR markers. **Phytologia Balcanica** 23:73–83 (2017).

LOPEZ, K.J.A. **Desenvolvimento de um processo de limpeza clonal de abacaxizeiro para Pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaV) com o uso da hidrotermoterapia**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal do Espírito Santo. 2018. 56p.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n.7, p.1885-1897, 2009.

MELO, M. S. de; GARCIA, M. V. B.; GARCIA, T. B.; MATOS, A. P. de. **Indução floral do abacaxizeiro cv. Turiaçu [*Ananas comosus* (L.) Merrill var. *comosus* Coppens & Leal], no Estado do Amazonas**. In: Simpósio brasileiro da cultura do abacaxi, 5. 2013, Palmas. Produção e qualidade com tecnologia e sustentabilidade: anais. Palmas: Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado do Tocantins, 2013. 1 CD-ROM.

MOHD ALI, M.; HASHIM, N.; ABD AZIZ, S.; LASEKAN, O. Pineapple (Ananas comosus): a comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. **Food Research International**. 137, 109675. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675>.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; BRUNO, R. L. A.; CAZÉ FILHO, J.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 932-936, 2010.

MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G. de; FRAGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y.; LOPES, V. R.; BONA, C. M.; ALCANTARA, G. B.; BIASI, L. A. Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**., Lavras, 12 (2) 53-60, 2016.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 26, n. 1, p. 45-49, jan. 2008.

PRAXEDES, S. C.; SILVA Jr, A. F. da; FIGUEIREDO, F. L. B.; FIGUEIREDO, M. D. L.; CÂMARA, F. A. A.; OLIVEIRA, O. F. De. **Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA**. Caatinga, Mossoró-RN, 14 (1/2):13-15, dez. 2001.

QUEIROZ, J. P.; GARCIA, M. V. B.; CHAVES, F. C. M. **Produção de mudas de abacaxizeiro cv. Turiapu [ananas comosus (L.) Merrill], em Manaus-Am, pela técnica de secionamento do caule e desenvolvimento de plântulas em tubete e canteiro**. In: Simpósio brasileiro da cultura do abacaxi, Palmas. Produção e qualidade com tecnologia e sustentabilidade: anais. Palmas: Secretaria da Agricultura e Pecuária do Estado do Tocantins, 2013.

REINHARDT, D. H. R. C.; BARTHOLOMEW, D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P.; PÁDUA, T. R. P.; JUNGHANS, D. T.; MATOS, A. P. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 40, n. 6: (e-302), 2017.

REINHARDT, D. H. R. C.; BARTHOLOMEW, D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P. DE; PÁDUA, T. R. P. DE; JUNGHANS, D. T.; MATOS, A. P. DE. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, p. e 302, 2018.

REINHARDT, D. H. R. C.; CUNHA, G. A. P. **A propagação de abacaxizeiro**. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica** (Coleção Plantar 52), 2006. 59 p.

REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. **Abacaxi. Produção: Aspectos técnicos**. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). — Brasília: Embrapa, 2000. 77p.

SANCHES, N. F.; MATOS, A. P. **Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed. rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2013. 196 p.– (Coleção 500 Perguntas, 500 Respostas).

SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; Vanda Helena Paes Bueno³, Ernesto Prado⁴. DESENVOLVIMENTO DE *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) EM DUAS CULTIVARES DE ABACAXI. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1015-1020, set. out., 2004.

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

SANTOS, P. B.; BARBOSA, F. S.; VIEIRA, C. F.; CARVALHO, A. C. P. P. Número de explantes, meio de cultura e fotoperíodo na micropropagação de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 4, p. 749-754, 2015.

SILVA, S. E. L.; SOUZA, A. G. C.; BERNI, F. R.; SOUZA, M. G. **A cultura do abacaxizeiro no Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica (21). Manaus-AM. Ago. 2004.

SOUZA, L. F. DA S.; REINHARDT, D. H. **Abacaxizeiro**. In: CRISÓSTOMO, L. A.; NAUMOV, A. (Eds.). *Aduando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil*. Fortaleza: EMBRAPA, 2009. p. 182–205.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. **Genetic variation of the Ananas genus with ornamental potential. Genetic resources and Crop Evolution**, Netherlands, v. 59, n. 7, p. 1357-1376, 2012.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C.F.; LÊDO, C. A. S; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. **Viabilidade e estabilidade genética de germoplasma de abacaxi após 10 anos de conservação *in vitro*. Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais**, Dordrecht, v.127, n.1, p.123-133, 2016.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. DE; PÁDUA, T. R. P. DE; FERREIRA, F. R. **Abacaxi (Ananas comosus)**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 2017. Disponível em: <http://www.iica.int>

SULAIMAN, S.; YUSUF, N.A.; VAWAL, A. Effect of plant growth regulators on *in vitro* culture of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) MD2 variety. **Food Research** 4 (Suppl. 5) (2020) 110 – 114.

VAN DER HOEVEN ESTUFAS AGRÍCOLAS LDTA - Poly Venlo
Disponível em: <https://www.vdh.com.br/polyvenlo.html>
Acesso em: 11 de abril de 2023.

ZURIDA, A. R.; NURUL SHAHNADZ, A. H.; HARTEENI A.; ROOWI, S.; CHE RADZIAH, C. M. Z.; SREERAMANAN, S. A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 10(19), pp. 3859-3866, 2011.