

CAPÍTULO 15

Propagação Clonal in Vitro de Abacaxizeiros: Metodologias e Aplicações para a Obtenção de Mudanças em Larga Escala

*Frederico Henrique da Silva Costa
Jonny Everson Scherwinski-Pereira*

1. Introdução

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma frutífera de clima tropical pertencente à família Bromeliaceae de destacada expressão econômica e social em todo o mundo. Seu cultivo é considerado uma atividade absorvedora de mão-de-obra no meio rural e geradora de emprego e renda. O fruto, utilizado tanto para o consumo in natura quanto na industrialização, representa uma fonte das vitaminas A, B e C, de cálcio, fósforo e ferro (SRIPAORAYA et al., 2003). No panorama nacional, o abacaxizeiro é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros, sendo Minas Gerais, Pará e Paraíba os maiores produtores, respondendo em conjunto por mais de 50% da produção (ABACAXI, 2007).

Naturalmente, a propagação do abacaxizeiro pode ser realizada por meio de sementes, obtidas do cruzamento de plantas férteis, ou ainda, por meio de brotações (tipo coroa, filhote, filhote-rebentão) formadas a partir do desenvolvimento de gemas axilares pré-existentes na axila da folha de diferentes partes da planta-mãe. Entretanto, as cultivares comerciais normalmente não produzem sementes, e estas quando ocorrem apresentam germinação baixa e irregular (MANICA, 1999) e promovem variabilidade genética do estande estabelecido, o que certamente influencia negativamente nos tratamentos culturais e produção de frutos. Já o sistema de propagação convencional, a partir de brotações retiradas da planta-mãe, além de não garantir a sanidade ao material multiplicado, causa a disseminação de doenças importantes como a fusariose (*Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*) e apresenta baixo rendimento de mudas, sendo necessário um tempo relativamente longo para conseguir obtê-las em grande quantidade (cerca de 15 a 20 meses) (MANICA, 1999).

Como consequência destes fatos, tem-se observado nos últimos anos o desenvolvimento e adoção de técnicas de propagação mais eficientes, as quais

têm possibilitado produzir mudas de qualidade e em quantidade bem superior ao método convencional (GOTTARDI et al., 2002).

Entre as tecnologias aprimoradas, a técnica de micropropagação ou propagação *in vitro* é certamente a mais adequada. As principais vantagens desse método, comparado aos meios tradicionais de propagação, são a multiplicação massal de genótipos selecionados de abacaxizeiro com elevada pureza genética e fitossanitária, em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, sem interrupção sazonal, além de rápida disponibilização e validação de novos genótipos obtidos por programas de melhoramento genético. Soma-se a isso, a facilidade no transporte das mudas a longas distâncias, além da maior uniformidade nos tratos culturais e na produção (MANICA, 1999; GOTTARDI et al., 2002).

Apesar de suas vantagens e por ser uma tecnologia que exige a utilização de mão-de-obra especializada e uma estrutura laboratorial mais elaborada, seus custos ainda são bem superiores aos métodos de propagação convencionais, principalmente quando se considera a grande quantidade de mudas necessárias para plantio (60 mil ou mais por hectare), resultante das elevadas densidades de plantas por área empregadas para a cultura (FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003). Dessa forma, o uso deste tipo de propágulo como fonte direta de mudas para renovação ou formação de novas lavouras ainda é considerado restrito e de baixa expressividade entre os produtores, sendo estas plantas produzidas em laboratório, normalmente usadas como plantas matrizes para a produção de mudas em plantios comerciais. Em decorrência dessas limitações, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de reduzir os custos de produção, utilizando-se fontes alternativas de luz como a solar ou natural (SILVA, 2006) e empregando-se biorreatores (ESCALONA et al., 1999; TEIXEIRA, 2006), além de substituintes alternativos como agentes solidificantes do meio de cultura (PASQUAL et al., 1998; SÁ, 2001; TEIXEIRA et al., 2001; COSTA et al., 2007).

O objetivo deste capítulo é abordar aspectos e procedimentos básicos aplicados à obtenção de material propagativo de abacaxizeiro com elevado padrão genético e sanitário. No entanto, não se tentará esgotar o assunto, pois conforme as facilidades disponíveis para se aplicar a técnica, juntamente com a criatividade individual e experiência adquirida, adaptações e/ou inovações podem ser possíveis.

2. Micropropagação de Abacaxizeiro

Os primeiros trabalhos com a micropropagação do abacaxizeiro foram realizados por Aghion e Beauchesne (1960). Desde então, vários estudos e protocolos foram publicados sobre o assunto, o que tem possibilitado a intensificação de uso desta técnica em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil.

De maneira geral, a obtenção massal de mudas de abacaxizeiro por meio da técnica de micropropagação envolve basicamente a produção de múltiplas brotações axilares, originadas de gemas pré-existentes na axila de cada folha, em meio de cultura e sob condições ambientais apropriadas.

Para isso, o processo de micropropagação é constituído basicamente por cinco fases distintas: a) seleção de matrizes; b) coleta de material vegetal e estabelecimento in vitro; c) multiplicação/proliferação de brotações axilares; d) alongamento e enraizamento in vitro; e) aclimatização. Porém, o sucesso para a obtenção de grande quantidade de mudas micropropagadas depende de fatores como a cultivar, a condição genética e sanitária do material vegetal fonte de explantes (matrizes), a constituição dos meios de cultura nas diferentes etapas do cultivo in vitro e as condições do ambiente de cultivo in vitro e ex vitro (aclimatização).

2.1. Seleção das Matrizes

A escolha das plantas matrizes, das quais é obtido o material vegetal fonte de explantes primários, constitui a primeira etapa da micropropagação do abacaxizeiro. É nesta etapa que o genótipo, planta modelo ou planta-mãe que se quer clonar é escolhido. Ainda nesta etapa, os estados fisiológico, nutricional e sanitário das matrizes, bem como as características de produção (precocidade, tamanho, forma, qualidade dos frutos, etc.), devem ser considerados, pois poderão exercer influência negativa nas etapas posteriores da micropropagação, bem como no desempenho das plantas no campo.

O ideal é dispor sempre de matrizes elites selecionadas em bancos ativos de germoplasma (BAG), ou melhor, coleções de trabalho, em que normalmente já se conhecem os dados de produção dos genótipos e/ou cultivares. Plantios comerciais, em que se observam plantas em boas condições sanitárias, também podem servir como fonte de propágulos, muito embora as plantas mantidas neste ambiente estejam expostas a condições ambientais naturais o que pode ocasionar maiores níveis de contaminação no momento do estabelecimento in vitro. Nesse contexto, Teixeira (2006) afirma que no caso do abacaxi a manutenção das matrizes em ambiente protegido é indesejável, uma vez que a melhor fonte de explante são as brotações laterais da planta obtidas em campo.

2.2. Coleta de Material Vegetal, Tipo de Explantes e Estabelecimento in Vitro

2.2.1. Coleta de Material Vegetal e Tipo de Explantes

Em abacaxizeiro, o material vegetal, fonte de explantes, é obtido a partir de brotações (mudas) formadas de gemas pré-existentes na axila das folhas de várias partes das plantas matrizes selecionadas. Tais mudas recebem diferentes denominações dependendo da parte da planta onde ocorrem, podendo ser do tipo: coroa (brotação do ápice do fruto), filhote (brotação do pedúnculo, a haste que sustenta o fruto), filhote-rebentão (brotação da região de inserção do pedúnculo no caule ou talo), rebento-lateral e rebento-enraizado ou rebentão (brotação do caule) (Fig. 1) (MANICA, 1999; REINHARDT et al.,

2000). Entretanto, apesar da diversidade de tipos de mudas, a sua utilização é limitada ao baixo rendimento de propágulos produzidos por planta, dependendo do genótipo e condições de manejo da cultura. Aliado a estes fatores, tem-se o fato da muda do tipo coroa permanecer aderida aos frutos no momento da comercialização, com exceção daqueles destinados à indústria, ao passo que os rebentos apresentam variações no tamanho, o que pode ocasionar florescimento irregular (SRIPAORAYA et al., 2003).

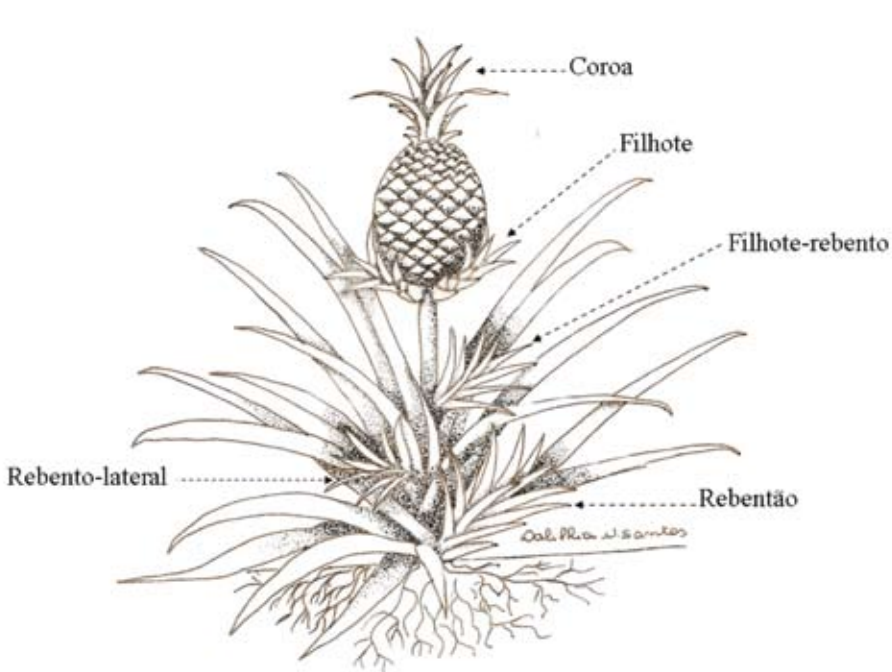


Ilustração: Dalilhia Nazaré dos Santos

Fig. 1. Planta matriz de abacaxizeiro evidenciando os tipos de mudas utilizadas para propagação e micropropagação.

Entre os tipos de mudas existentes, alguns autores têm recomendado as do tipo filhote por possibilitarem maior percentagem de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* das gemas axilares que as advindas da coroa (DREW, 1980 citado por MANICA, 1999). Nesse mesmo sentido, Damião Filho et al. (1993) afirmam que gemas axilares provenientes de mudas tipo coroa apresentam desenvolvimento mais lento comparado àquelas oriundas de mudas aderidas à planta matriz, o que se deve ao seu tamanho reduzido.

Do mesmo modo, Teixeira et al. (2001) e Teixeira (2006) indicam as mudas tipo filhote e filhote-rebentão como as mais apropriadas para obter explantes, devendo essas apresentarem um comprimento mínimo de 20 cm. Segundo esses autores, em virtude dessas mudas estarem mais distantes do solo, a infestação por contaminantes é menor, o que permite um maior sucesso no estabelecimento *in vitro* de gemas axilares livre de contaminantes. Nesse sentido, Sá (2001), avaliando gemas axilares provenientes de mudas tipo

rebutão (15 a 20 cm e 50 cm), constatou maior sobrevivência (50%) para as mudas maiores (50 cm), as quais proveram gemas de 3,5 mm.

A coleta do material vegetal deve ser realizada de preferência no mesmo dia do estabelecimento in vitro, para evitar a excessiva exposição aos fatores do ambiente e reduzir a possibilidade de contaminação e desidratação. Todavia, Teixeira et al. (2001) afirmam ser possível utilizar mudas do tipo filhote num prazo máximo de 15 dias, desde que armazenadas em local sombreado com 60% e 80% de umidade relativa e 20°C e 30°C. Nessa fase, deve-se considerar também a estação do ano, a qual pode interferir principalmente nas taxas de contaminação do material. Para isso, um correto estudo sobre a época mais favorável pode possibilitar o planejamento da coleta do material em campo, facilitando sobremaneira a organização das etapas do cultivo e de mão-de-obra em laboratório.

Quanto ao tipo de explante, o estabelecimento do cultivo in vitro de abacaxizeiro é realizado a partir de gemas axilares existentes naturalmente em cada axila foliar e ápices caulinares¹, sendo essas gemas preferíveis pela facilidade de obtenção e por existir em maior quantidade nas mudas. O estabelecimento desses explantes, desde que não apresentem contaminação e o meio de cultura utilizado seja apropriado, resultará diretamente na formação de uma planta completa.

2.2.2. Preparo do Material Vegetal e Extração das Gemas Axilares

As mudas obtidas são levadas para o laboratório e, em ambiente externo da sala de recepção de material vegetal, devem ter todas as folhas externas retiradas no sentido da base para o ápice, de modo a obter somente a haste ou talo caulinar, contendo as gemas e/ou o ápice caulinar (Fig. 2). Em seguida, a haste é submetida a uma lavagem com detergente líquido comercial e água corrente e, com auxílio de pinças e bisturis, as gemas axilares contendo segmentos da haste (2 a 5 mm³) são excisadas e posteriormente submetidas a um processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar (Fig. 2). Nesta etapa, o tempo da exposição das gemas ao fluxo de ar da câmara deve ser o menor possível, uma vez que a desidratação pode prejudicar o desenvolvimento posterior das gemas in vitro.

Caso seja de interesse, pode-se também realizar, sob condições de total assepsia (fluxo laminar), a excisão do ápice caulinar, utilizando-se microscópio estereoscópico. Todavia, este tipo de explante tem sido pouco empregado, pois cada muda possui apenas um ápice, além de seu desenvolvimento ser mais lento em virtude do tamanho inferior e susceptibilidade ao ressecamento e/ou necrose. A justificativa para utilizar este tipo de explante está relacionada à limpeza clonal de plantas infectadas por *Fusarium subglutinans*, conforme reportado por Albuquerque et al. (2000). Segundo estes autores, o cultivo in vitro de ápices caulinares de abacaxizeiro medindo aproximadamente 1,0 mm, em meio contendo ácido giberélico (AG₃), possibilitou 100% das plantas

¹Meristema envolto por algumas camadas de primórdios foliares.

regeneradas livres de patógenos, o que foi confirmado pelo teste de indexação. Contudo, o tempo de regeneração das plantas, após o estabelecimento in vitro do ápice, foi de aproximadamente 120 dias.

Ressalta-se ainda que podem ocorrer modificações nos procedimentos acima descritos conforme relatado por Teixeira et al. (2001), que realizaram a assepsia (desinfestação) e retirada das gemas em ambiente de fluxo laminar.

2.2.3. Assepsia e Estabelecimento in Vitro (Transferência dos Explantes para meio de Cultura)

Uma vez que o cultivo in vitro é realizado sob condições de total assepsia, todos os explantes devem passar por um processo de desinfestação, antes de serem introduzidos em meio de cultura. Com esse intuito, realiza-se sob condições de câmara de fluxo laminar uma fase de assepsia, que consiste em eliminar os microrganismos (fungos e bactérias) presentes superficialmente nos tecidos do explante. Para isso, os explantes já excisados (gemas axilares contendo pequeno segmento da haste) são submetidos a um processo de desinfestação², que consiste da imersão em álcool 70% por alguns segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio a 1,00%-1,25% de cloro ativo, contendo algumas gotas do detergente Tween 20, por 10-15 minutos, e por fim lavagem por três vezes em água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar (Fig. 2). Teixeira et al. (2001) recomendam que seja evitada água sanitária comercial por conter alto teor de hidróxido de sódio, que tem ação cáustica e pode danificar os tecidos da gema.

Terminada a desinfestação, os explantes são transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura e, em seguida, mantidos em sala de cultivo até seu crescimento e diferenciação, podendo demorar de quatro a seis semanas (a depender do genótipo, assepsia, tamanho do explante, meio de cultura e condições de cultivo) (Fig. 3). De acordo com Ventura (1994) e Sá (2001), a quebra de dormência das gemas, ou seja, o início do seu desenvolvimento (que se caracteriza pela mudança da cor branca para verde) ocorre entre 10 e 15 dias após o estabelecimento in vitro, enquanto o processo de organogênese acontece geralmente aos 30 dias. Nesse contexto, Teixeira et al. (2001), avaliando oito genótipos de abacaxizeiro, verificaram que a porcentagem de gemas desenvolvidas in vitro variou de 13,3% a 80%, ao passo que Ventura (1994) e Sá (2001) relatam de 36% a 75%.

2.2.4. Indexação de Fungos e Bactérias dos Explantes Estabelecidos in Vitro

A indexação é o processo de detecção de patógenos em plantas ou culturas, visando identificar plantas sadias. Constitui um procedimento importante do processo de micropropagação e deve ser realizado anteriormente à fase de multiplicação, visto que a ocorrência de contaminantes durante os subcultivos pode limitar ou mesmo inviabilizar a produção de mudas.

²Este procedimento tem sido utilizado nos trabalhos e pode apresentar variações ou adaptações de acordo com a literatura consultada, seja quanto ao tipo e/ou concentração das substâncias desinfetantes ou tempo de exposição dos explantes a eles.

Fotos: Jonny E. Scherwinski-Pereira

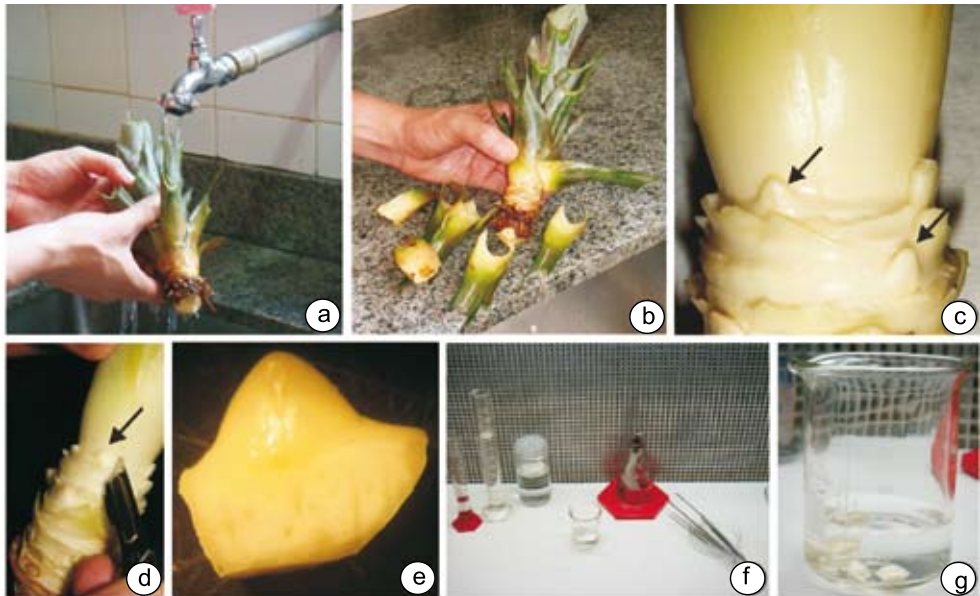


Fig. 2. Aspectos gerais para o estabelecimento in vitro de gemas axilares: a, b) lavagem e desfolha do material vegetal; c) detalhe da haste caulinar desfolhada, evidenciando gemas axilares (setas); d) excisão de gema axilar ex vitro; e) detalhe da gema obtida; f, g) processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar, utilizando álcool, hipoclorito de sódio e água estéril.

Fotos: Jonny E. Scherwinski-Pereira

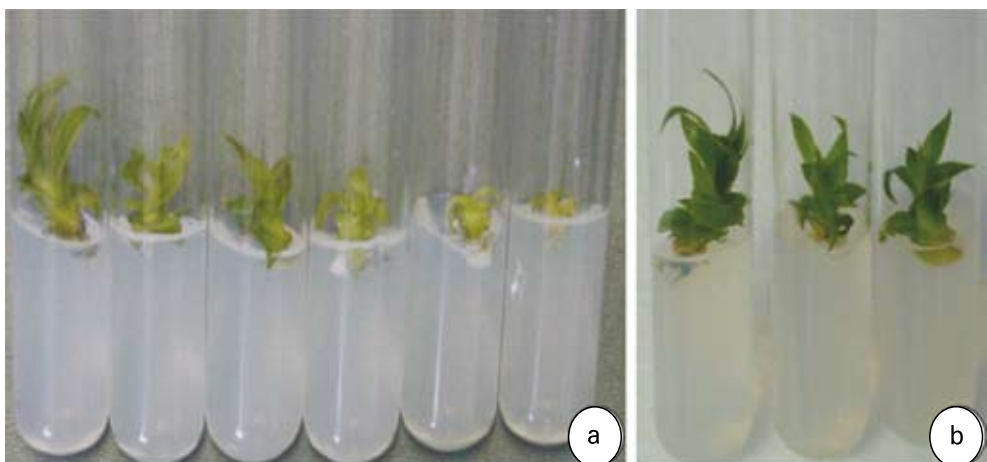


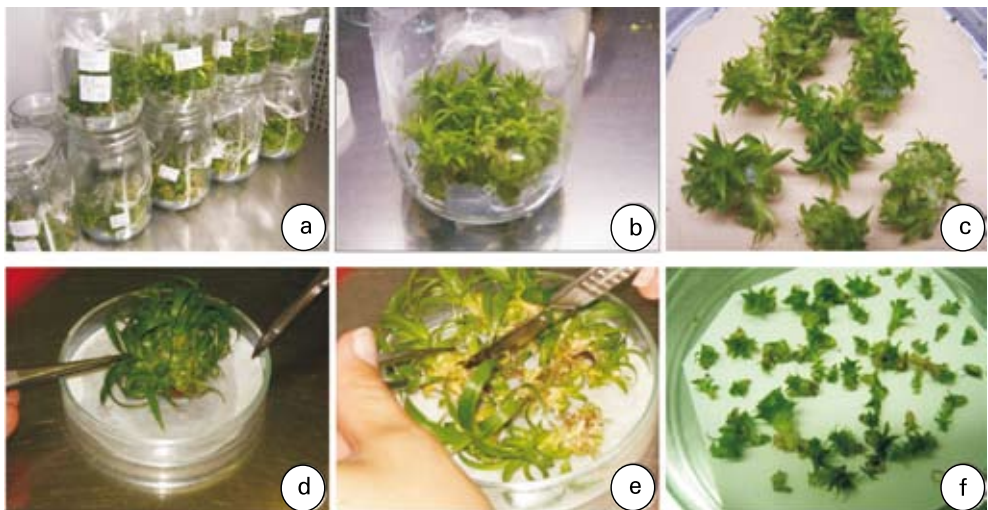
Fig. 3. Brotos em diferentes estádios de desenvolvimento, oriundos do estabelecimento in vitro de gemas axilares de abacaxizeiros: a) início de desenvolvimento, após 4 a 6 semanas do estabelecimento das gemas; b) brotações isoladas em tubos de ensaio, oriundas das etapas tardias do estabelecimento.

Para a micropropagação do abacaxizeiro, a indexação é feita por observação visual, durante e após a fase de estabelecimento *in vitro*. No último caso, as brotações obtidas são transferidas para meio de consistência líquida em camada fina, verificando-se a partir de então a turbidez do meio, pelo crescimento de bactérias, fungos e leveduras. Já no caso de indexação para vírus, deve-se realizá-la na planta matriz, pois os sintomas são evidentes (TEIXEIRA, 2006).

2.3. Multiplicação/Proliferação de Brotos

Terminado o período de estabelecimento *in vitro* (quatro a seis semanas), os explantes livres de contaminação e com desenvolvimento satisfatório (Fig. 3b) são submetidos à indução de múltiplas brotações axilares. Para isso, os brotos são subdivididos e, em seguida, transferidos para meio de cultura suplementado com regulador de crescimento, geralmente uma combinação entre citocinina e auxina, e mantidos em sala de crescimento.

Após algumas semanas, os explantes primários e as brotações produzidas (agregados de brotos ou multibrotações) são individualizados (sempre que possível) ou divididos em agregados menores, submetidos a uma poda das folhas e raízes e transferidos para meio de cultura fresco, até que os mesmos procedimentos sejam novamente demandados (Fig. 4). Essas sucessivas transferências dos explantes para meio de mesma constituição são conhecidas como subcultivos, repicagens ou ciclos de multiplicação. Cada subcultivo tem uma duração média de quatro a cinco semanas e deve ser efetuado no máximo cinco vezes, para evitar ou reduzir o aparecimento de plantas atípicas e também a depleção dos constituintes (carboidrato, sais minerais e vitaminas) e do próprio meio de cultura pelos explantes.



Fotos: Jonny E. Scherwinski-Pereira

Fig. 4. Aspectos da fase de repicagem em fluxo laminar: a, b) brotos em meio de multiplicação de consistência semi-sólida; c, d, e, f) manipulação dos brotos (individualização, subdivisão e corte da parte aérea das multibrotações).

Para o sistema de produção de mudas comercial, a fase de multiplicação é uma das mais importantes, na qual se procura obter o máximo de brotações, no menor espaço de tempo sem, no entanto, prejudicar as etapas subseqüentes (alongamento/enraizamento e aclimatização), seja pela presença de plantas atípicas (variantes) ou devido à baixa qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dessa forma, tem-se uma multiplicação em crescimento por progressão geométrica, de modo que a partir de uma única gema axilar estabelecida in vitro é possível obter milhares de novas brotações ao final de alguns meses, o que dependerá do protocolo, habilidade dos manipuladores e genótipo empregados.

Um fator imprescindível na etapa de multiplicação diz respeito à suplementação exógena do meio de cultura com citocininas³ e auxinas, sendo as mais utilizadas a N⁶-benzilaminopurina (BAP) e o ácido naftaleno acético (ANA) respectivamente. Segundo Teixeira et al. (2001) a presença da auxina no meio de multiplicação favorece o enraizamento das brotações na fase seguinte (alongamento e/ou enraizamento), além de permitir a produção de brotos mais alongados. O BAP é uma citocinina que promove a indução de múltiplas brotações pela quebra da dominância apical⁴ (TEIXEIRA et al., 2001). Atualmente é a citocinina mais utilizada para a indução in vitro de brotos axilares em genótipos de abacaxizeiro, porém a concentração "ideal" é genótipo-dependente.

Além do BAP, outras citocininas têm sido utilizadas em protocolos de micropropagação de abacaxizeiro, como a cinetina (CIN) (BARBOZA et al., 2004) e zeatina (FITCHET, 1990). Adicionalmente, outras substâncias com efeitos de citocininas são relatadas, entre as quais, o Thidiazuron (TDZ) e o sulfato de adenina (PAIVA et al., 1999), porém seus efeitos ainda são pouco conhecidos e em alguns casos ineficientes quando comparados ao BAP.

Outro fator a ser considerado nesta fase é o estado físico do meio de cultura, pois existem vários trabalhos que reportam o uso de meio líquido, com resultados superiores ao meio geleificado (FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003). Porém, no caso de se optar por meios semi-sólidos, o ágar tem sido o agente solidificante mais empregado, embora Costa et al. (2007) relatem o uso de amido de mandioca (60 g L⁻¹) com resultados similares à adição de ágar (5 g · L⁻¹) (12,6 brotações/explante).

Alternativamente ao estabelecimento in vitro de gemas axilares, a multiplicação pode ainda ter como fonte de explantes de plantas mantidas in vitro por vários meses ou mesmo anos. Isso pode acontecer em laboratórios que mantêm acessos ou genótipos sob conservação in vitro. Neste caso, as plantas também têm as raízes e o ápice das folhas cortados (podados). A utilização de plantas mantidas assepticamente em laboratório tem como vantagem possibilitar que todo processo de produção seja programado a intervalos de tempo reduzidos (semanas ou dias). Em contraste, quando se considera o estabelecimento in vitro, o período de produção é maior, além do que problemas relacionados à

³As citocininas são uma classe de reguladores de crescimento com capacidade marcante de induzir a divisão celular em tecidos vegetais, sendo por isso importantes para formação de órgãos, principalmente, aéreos.

⁴Dominância exercida pela gema apical de um broto ortotrópico (broto com crescimento vertical) ou galho sobre as gemas laterais, impedindo o desenvolvimento dessas (TEIXEIRA, 2006).

disponibilidade de mudas, aos níveis de contaminação e ao estabelecimento em si podem ocorrer, comprometendo o cronograma de produção (TEIXEIRA, 2006).

2.4. Alongamento/Enraizamento dos Brotos

O uso freqüente de citocininas no meio de cultura durante subcultivos seqüenciais, com o intuito de maximizar as taxas de multiplicação, tem resultado em brotações com reduzido alongamento da parte aérea, de difícil individualização e que apresentam pouca ou nenhuma raiz (provavelmente devido ao efeito cumulativo do regulador de crescimento – habituação). Devido a isso, uma fase de alongamento e/ou concomitantemente de enraizamento é necessária, sobretudo para os brotos menores.

Para tanto, as múltiplas brotações e/ou os agregados de gemas obtidos ao final da fase de multiplicação são individualizados ou subdivididos em agregados menores (*clusters*) e transferidos para meio de alongamento e enraizamento, geralmente suplementado com auxina(s) e desprovido de citocininas. Dessa forma, ao final de 3 a 4 semanas, são obtidas plantas completas, apresentando parte aérea alongada e raízes, as quais são submetidas à fase de aclimatização.

Existe ainda a possibilidade de que brotações bem desenvolvidas possam ser diretamente removidas dos frascos e submetidas ao processo de aclimatização, sem necessitar de uma fase de alongamento/enraizamento *in vitro*. Possibilidade esta reportada por Ventura et al. (1994), Guerra et al. (1999) e Sá (2001), segundo os quais mesmo as plantas que não formaram raízes *in vitro*, o fizeram após o transplante para substrato com 95,5% e 100% de sobrevivência.

2.5. Meio de Cultura e Condições de Cultivo

2.5.1. Meio de Cultura

Em geral, os meios de cultura utilizados para o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos são constituídos por substâncias essenciais ao crescimento e desenvolvimento das culturas, tais como a água, macro e micronutrientes, aminoácidos, vitaminas e carboidrato(s). Além destes, outros compostos podem ser adicionados, como os reguladores de crescimento⁵, agentes geleificantes (ágar, Phytigel®, amido de mandioca), compostos orgânicos complexos (água de coco), carvão ativado, caseína hidrolisada, antibióticos e/ou fungicidas.

Uma outra condição imprescindível do meio de cultura refere-se ao pH, o qual deve ser adequado à integridade celular, podendo também influenciar na disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento e na geleificação/

⁵Reguladores de crescimento são análogos sintéticos dos hormônios vegetais. Têm a mesma função dos hormônios, porém são sintetizados em laboratório e não pela planta, além de ser requeridos em maiores quantidades para obter resposta semelhante (TERMIGNONI, 2005). São exemplos, o N⁶-benzilaminopurina (BAP) e Tidiazuron (TDZ) (grupo das citocininas); e ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) (grupo das auxinas).

solidificação do meio (caso o meio seja de consistência semi-sólida ou sólida). Assim, normalmente utiliza-se pH ajustado para 5,8. Em relação à autoclavagem, esta é realizada por 15 a 20 minutos a 121°C e 1,3 atm de pressão.

A escolha por determinado meio de cultura é função da espécie vegetal a ser micropropagada, tipo de explante e as diferentes fases do processo (estabelecimento, multiplicação, etc.), sendo por esses motivos uma condição básica para o desenvolvimento de protocolos bem sucedidos. Portanto, para uma melhor resposta morfogênica dos explantes (ápices caulinares, meristemas, brotações, etc.), o mais adequado é desenvolver um meio de cultura baseado nas exigências da espécie, ou mesmo cultivar em questão, tomando por base análises nutricionais.

Para o abacaxizeiro, o meio de cultura freqüentemente utilizado em todas as etapas da propagação in vitro é o de Murashige e Skoog (1962), mundialmente conhecido como MS (Tabela 1), acrescido de reguladores de crescimento (TAMAKI et al., 2007). Entretanto, dependendo da fase de cultivo, algumas modificações têm sido feitas, especialmente nas concentrações de macronutrientes, havendo também alguns relatos do uso de outras formulações, como o meio N6 e MT (ALBUQUERQUE et al., 2000; SRIPAORAYA et al., 2003). Quanto ao estado físico do meio de cultura, a maioria dos trabalhos baseia-se no uso de meios de consistência semi-sólida, utilizando o ágar ou Phytigel como agentes geleificantes (MACEDO et al., 2003; PEDROSO et al., 2001). Porém, estudos mais recentes têm relatado o emprego de meio líquido, principalmente em sistema de biorreatores de imersão temporária (ESCALONA et al., 1999; FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003; TEIXEIRA et al., 2001; TEIXEIRA, 2006), cuja eficiência tem sido superior comparado ao meio semi-sólido e líquido (estacionário ou em agitadores).

Outra estratégia para a micropropagação de abacaxizeiro é o sistema de cultivo em meio dupla-fase (bifásico), que consiste em acrescentar, ao longo da cultura in vitro, alíquotas de meio líquido sobre o meio semi-sólido contendo os explantes, ao invés de transferir as brotações para meio fresco. Dessa forma, é possível reduzir a constante necessidade por subcultivos, como também diminuir a manipulação (subdivisão e individualização) dos agregados de gemas e multibrotações, o número de frascos envolvidos no processo de multiplicação e o espaço laboratorial. Acrescenta-se ainda que o uso do sistema dupla-fase possibilita o aumento da superfície de área do explante em contato com o meio de cultura e o incremento da difusão, absorção e renovação dos constituintes do meio de cultivo.

Tabela 1. Composição do meio MS.

Componente	Concentração	
	mg · L ⁻¹	mM
	Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6
KNO ₃	1.900	18,8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	3,0

Continua...

Tabela 1. Continuação.

MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Micronutrientes		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,030
H ₃ BO ₃	6,2	0,100
KI	0,83	0,005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0001
FeEDTA		
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	0,10
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,10
Vitaminas e aminoácidos		
Tiamina – HCl	0,1	0,0003
Piridoxina – HCl	0,5	0,0024
Ácido nicotínico	0,5	0,0040
Glicina	2,0	0,0270
Mio-Inositol	100	0,55
Sacarose	30.000	87,6

Fonte: Adaptada de Murashige; Skoog, 1962.

2.5.1.1. Fase de Estabelecimento

Para esta fase, a maioria dos protocolos tem utilizado meio semi-sólido, geralmente solidificado com ágar e acrescido de combinações entre citocininas e auxinas (SOUZA JUNIOR et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002; MACEDO et al., 2003; SRIPAORAYA et al., 2003; BARBOZA et al., 2004). Alternativamente, Costa et al. (2007) reportam o estabelecimento in vitro de gemas axilares das cultivares Rio Branco e Quinari, pela substituição parcial ou total do ágar pelo amido de mandioca (fécula). Em adição, há relatos do uso de meio líquido, tanto em frascos⁶ quanto em tubos de ensaio, empregando-se neste caso suportes do tipo ponte de papel-filtro (ESCALONA et al., 1999; GUERRA et al., 1999; SÁ, 2001).

A importância da escolha de meio apropriado e do uso de reguladores de crescimento na etapa de estabelecimento in vitro é relatada por Albuquerque et al. (2000), segundo os quais, o percentual de necrose dos ápices caulinares de aproximadamente 1 mm, provenientes de mudas do tipo coroa da cv. Pérola, foi de 0% em meio N6 adicionado de AG₃, ao passo que no meio MS suplementado com BAP 20% dos ápices necrosaram. Também verificaram que na ausência de reguladores de crescimento a frequência de necrose foi em média 90%,

⁶É importante destacar que o uso de frascos contendo várias gemas axilares em vez de tubos de ensaio (contendo apenas uma gema axilar cada um) pode acarretar maiores perdas, uma vez que na fase de estabelecimento a possibilidade de contaminações é maior.

alcançando a totalidade na maioria deles. Nesse contexto, Grattapaglia e Machado (1998) afirmam ser benéfica a adição de reguladores de crescimento, uma vez que supre as possíveis deficiências dos níveis endógenos de hormônios nos explantes isolados.

Já Firoozabady e Gutterson (2003) utilizaram para o estabelecimento de gemas meristemáticas (1 cm^3), oriundas de mudas tipo coroa da cv. Smooth Cayenne, meio basal constituído pelos sais de MS reduzido a 50%, vitaminas de B5, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose e 0,2% Gel-rite, acrescido de BAP ($3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Utilizando este meio, os meristemas apresentavam-se alongados e com as folhas primárias totalmente abertas, após uma semana do estabelecimento.

Tratando-se do estabelecimento de gemas axilares, tem sido indicado o meio MS básico, acrescido de BAP ($0,5$ a $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e ANA ($0,12$ a $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (ALMEIDA et al., 1994, 2002; ESCALONA et al., 1999; GUERRA et al., 1999; BARBOZA et al., 2004), CIN ($2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (SRIPAORAYA et al., 2003) ou mesmo desprovido de reguladores de crescimento (SOUZA JUNIOR et al., 2001).

2.5.1.2. Fase de Multiplicação

Apesar de vários trabalhos utilizarem meio semi-sólido nesta etapa, estudos mais recentes têm demonstrado ser um sistema pouco eficiente e laborioso para uso em escala comercial em comparação ao emprego de meio líquido, principalmente quando este é associado a biorreatores de imersão temporária (ESCALONA et al., 1999; FIROOZABADY; GUTTERSON, 2003, SILVA et al., 2007). O interesse em se utilizar meio líquido pode ser justificado, entre outros aspectos, pela facilidade de preparação e manipulação do meio, redução dos custos, possibilidade de automação do processo, uso de uma menor quantidade de meio por explante, além de poder aumentar a disponibilidade de nutrientes e proporcionar um maior contato dos explantes com o meio (PEREIRA; FORTES, 2003). Entretanto, caso não se disponha de equipamentos do tipo biorreatores, deve-se ter o cuidado de não utilizar grandes quantidades de meio líquido em sistema estacionário (sem agitação), de modo a evitar que os explantes sejam encobertos e ocasionar a falta de aeração do material em cultivo. Assim, recomenda-se utilizar camadas finas de meio líquido (TEIXEIRA, 2006) ou empregar agitadores orbitais.

Quanto às concentrações de reguladores de crescimento, existe grande amplitude de variação entre os protocolos, com concentrações de BAP e ANA variando entre $0,25$ e $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,12$ e $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Porém, as maiores taxas de multiplicação são obtidas com $1,5$ a $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP associado a quantidades menores de ANA. Almeida (1994) afirma que concentrações maiores de BAP ($4,0$ ou $5,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) são prejudiciais aos explantes, com altas taxas de mortalidade, ao passo que $2,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ promovem a melhor resposta de diferenciação. Nesse mesmo sentido, Medeiros et al. (2001) relatam que o acréscimo de BAP (2 e $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e ANA (1 e $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), no meio de cultura, favorece a multiplicação, entretanto os brotos apresentam um alongamento da parte aérea muito reduzido e são de difícil individualização. Por outro lado, concentrações intermediárias (BAP $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + $0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ANA) ou

mesmo menores (BAP $0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 0,12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ANA) são as mais indicadas para obter brotos com taxa de crescimento e de multiplicação *in vitro* equilibradas.

As diferenças nas concentrações exógenas de reguladores de crescimento reportadas na literatura podem ser atribuídas, principalmente, ao genótipo utilizado e a consistência do meio de cultura (sólido ou líquido). Assim, para propósitos de micropropagação devem-se desenvolver protocolos regenerativos específicos para cada cultivar, sempre observando a qualidade dos brotos produzidos.

Além do uso de reguladores de crescimento, outra alternativa que tem mostrado resultados positivos na indução de brotações e aumento nas taxas de multiplicação em abacaxizeiro é a quebra da dominância apical por processos mecânicos (ALMEIDA et al., 2002). De acordo com estes autores, o emprego de meio líquido estacionário suplementado com $1,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP e o seccionamento longitudinal dos brotos aumentaram o número médio de brotos/explante (2013,5) após cinco subcultivos na cv. Pérola, o que foi atribuído à maior absorção do meio de cultura e ao estímulo à divisão celular, ocasionado pelo corte ao meio dos explantes. Utilizando essa metodologia, os autores concluíram ser possível obter 161.080 plantas após oito meses, partindo apenas de oito mudas tipo filhote, cada uma contendo dez gemas axilares. Por outro lado, usando o método convencional de multiplicação de abacaxizeiro, seriam necessários 7 anos e 6 meses para obter 32.700 mudas de uma planta matriz inicial, insuficiente para estabelecer um hectare desta cultura.

Recentemente, Firoozabady e Gutterson (2003) visando reduzir os custos de micropropagação do abacaxizeiro, tanto em relação à mão-de-obra quanto ao espaço requerido, propuseram que nos estágios anteriores ao processo de multiplicação *in vitro*, os explantes resultantes do estabelecimento *in vitro* devem ser seccionados longitudinalmente em várias partes para permitir que os brotos axilares normalmente quiescentes produzam novas brotações, resultando em aumento global da multiplicação.

2.5.1.3. Fase de Alongamento e Enraizamento

Nesta fase, a maioria dos trabalhos tem utilizado a formulação básica do meio MS reduzindo a sua concentração salina (BARBOZA et al., 2004), suplementado ou não com auxinas. No entanto, a eficiência desta etapa tem sido relacionada principalmente à consistência do meio e ao sistema de cultivo utilizado (TEIXEIRA et al., 2001, TEIXEIRA, 2006).

Isso porque de acordo com Teixeira et al. (2001), a transferência dos agregados de gemas, provenientes da multiplicação em meio geleificado, para meio líquido em biorreator de imersão temporária proporciona uma eficiência na produção de mudas ao final do processo de micropropagação da ordem de 3,5 vezes em comparação ao meio geleificado. Assim, utilizando este sistema, o número de mudas regeneradas por agregado variou de 11,1 a 37,4, ao passo que utilizando meio solidificado este número variou de 5,4 a 11,3

entre 9 genótipos estudados. Em estudo mais recente, Teixeira (2006) afirma que devido ao elevado número de frascos requerido para o alongamento e enraizamento (entre 100 e 150 unidades para produzir mil mudas), o emprego do sistema de imersão temporária, utilizando meio MS desprovido de regulador de crescimento e 4% de sacarose, reduz sobremaneira os custos de produção (maiores informações no tópico relacionado ao uso de biorreator).

Quanto ao meio de cultivo, estudo realizado por Tamaki et al. (2007), com diferentes diluições dos macronutrientes do meio MS, sobre o cultivo in vitro de clones da cv. Smooth Cayenne, a partir de nós estiolados, demonstrou que o meio MS/5 (reduzido em 1/5 dos macronutrientes) promove os mesmos efeitos para a parte aérea e sistema radicular, quando comparado aos meios MS completo e MS/2 (reduzido a 50% dos macronutrientes). Ainda de acordo com os autores, os teores de nitrato dos eixos caulinares foram maiores nas plantas cultivadas em MS, decrescendo 50% em MS/2 e a 90% em MS/5, ao passo que nenhuma diferença significativa foi obtida para clorofila a+b e carotenóides. Dessa forma, os autores concluíram ser possível a redução de custos, uma vez que a quantidade de nitrogênio no meio MS original poderia estar além das necessidades nutricionais do clone de *Ananas comosus* analisado, promovendo um acúmulo de nitrato nos tecidos das plantas mantidas nessa condição.

Fotos: a, b (Empresa de Biotecnologia Vegetal); c, d, e (Herminio Souza Rocha).

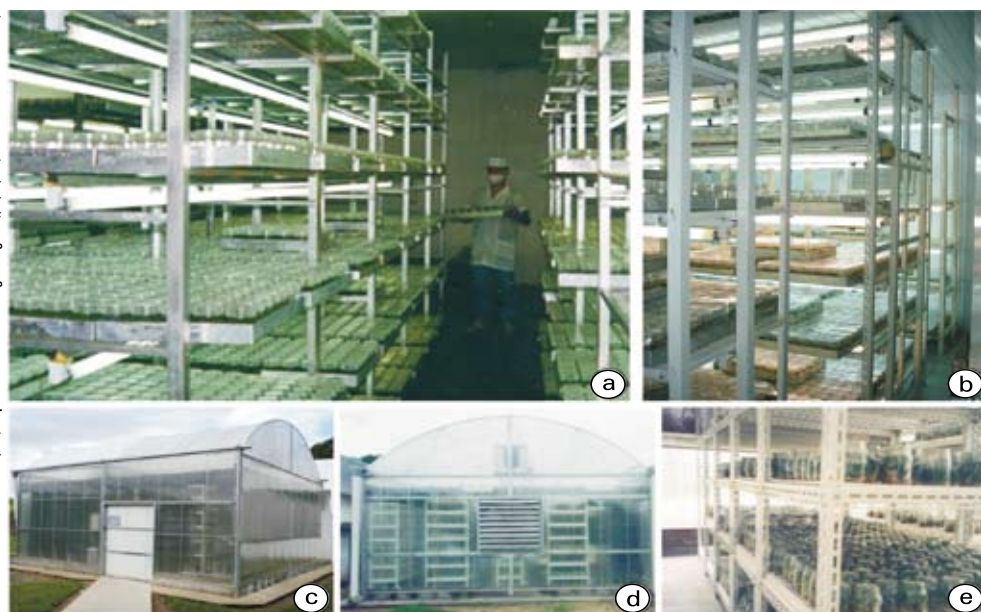


Fig. 5. Vista geral do ambiente de cultivo de abacaxizeiros micropropagados: a, b) sala de crescimento de luz artificial; c, d, e) sala de crescimento de luz solar/natural – Campo – Biotecnologia Vegetal, localizada na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA.

2.5.2. Condições de Cultivo ou Incubação

Durante todas as fases do cultivo *in vitro*, o padrão adotado tem sido o de salas de crescimento climatizadas, as quais possuem, geralmente, iluminação artificial (fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares 20W ou 40W), com fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Porém, resultados obtidos por Silva (2006) demonstram ser possível e vantajoso, na fase de enraizamento *in vitro*, substituir a iluminação artificial pela luz solar nas salas de crescimento (Fig. 5).

Estudo recente reporta diferenças visíveis no padrão de crescimento, estrutura foliar interna e no processo de carboxilação (CAM ou C3) de plantas de abacaxizeiro *Ananas comosus* var. Smooth cayenne, de um mesmo clone, dependendo do regime de temperatura utilizado no cultivo *in vitro* (constante ou alternado) (NIEVOLA et al., 2005). Segundo estes autores, plantas cultivadas sob 28°C durante o regime de luz e 15°C no período de escuro (termoperíodo alternado) foram mais curtas, tiveram maior peso seco da parte aérea e de raízes superiores e folhas mais espessas. Adicionalmente, estas plantas apresentaram mesofilo com grande número de camadas de células, hipoderme mecânica (evidente apenas neste regime de temperatura), sistema vascular mais notável, grande índice de suculência (relação entre a quantidade de água e clorofila), alta atividade da enzima PEPCase (no período de escuro) e gradual incremento nos níveis de ABA durante o período de luz e maior acúmulo no final do dia. Dessa forma, os autores concluíram que plantas crescendo em regime de temperatura alternada (28°C luz/ 15°C escuro) mostram características de fotossíntese CAM, enquanto sob temperatura constante (28°C , dia e noite) apresentam características de fotossíntese C3. Todavia, os aspectos regulatórios de fixação de carbono em abacaxizeiro são pouco conhecidos, sendo o trabalho de Nievola et al. (2005) o primeiro relato em plantas *in vitro*.

2.6. Contaminação in Vitro

Consiste no aparecimento de microrganismos (fungos, bactérias ou leveduras), após o estabelecimento do material vegetal *in vitro*, seja por causa de um ineficiente processo de assepsia, erros de manipulação ou microrganismos endofíticos. A ocorrência de contaminantes constitui uma das mais importantes causas de perda de material vegetal em trabalhos de cultura de tecidos, especialmente quando os explantes são provenientes de matrizes mantidas no campo. Caso as condições de cultivo (meio de cultura, etc.) favoreçam o crescimento destes microrganismos, estes passam a competir por nutrientes e carboidratos, além de produzir metabólitos tóxicos aos explantes, no caso de bactérias, comprometendo o processo de micropropagação (PEREIRA et al., 2003).

Em cultura *in vitro*, a contaminação tem sido mais evidente na fase de estabelecimento, embora as taxas e o tipo sejam bastante variáveis em função de diversos fatores, como a época de coleta dos explantes no campo, o estado

sanitário das plantas matrizes, a correta execução do processo de assepsia e manipulação durante as repicagens e os agentes desinfestantes utilizados.

Para a detecção e controle, devem ser realizadas observações visuais durante as diferentes fases do cultivo in vitro, de modo a eliminar e autoclavar as culturas contaminadas. Outro aspecto importante é o uso de agentes geleificantes de boa qualidade como o Phytigel®, pois irá facilitar a detecção do material contaminado e com isso evitar a sua disseminação. No caso de fungos e leveduras, podem-se facilmente identificá-los, pois se desenvolvem bem em meio de cultura, ao contrário das bactérias, especialmente aquelas que permanecem latentes⁷ in vitro, as quais podem ser detectadas somente após algum tempo de cultivo e desta forma ser disseminadas durante os subcultivos (PEREIRA et al., 2003). Contudo, no caso da micropropagação de abacaxizeiro, a ocorrência de contaminações não tem sido considerada um problema limitante entre os trabalhos publicados, salvo aqueles que utilizam meios de consistência líquida, especialmente os desenvolvidos em biorreatores.

2.7. Aclimatização

Assim como para as demais espécies micropropagadas, o processo de aclimatização do abacaxizeiro consiste basicamente na retirada das plantas dos frascos de cultivo, lavagem das raízes em água corrente para remoção do resíduo de meio de cultura aderido, poda das raízes (toailete), transplântio para tubetes ou bandejas coletivas contendo substrato e transferência para casa de vegetação ou telado (Fig. 6). Alternativamente, em alguns casos, pode-se realizar uma pré-aclimatização, pela abertura dos frascos ainda na sala de crescimento por algumas horas ou mesmo dias, ou deixando as plantas em recipientes contendo água destilada.

Em casa de vegetação ou telado, as plantas devem ser submetidas de maneira gradual ao aumento da luminosidade e redução da umidade relativa do ar, mantendo-se durante os primeiros dias do transplântio uma alta umidade e sombreamento em torno de 50%, além de uma eficiente irrigação, geralmente por meio de microaspersão. Em adição, pode-se fazer a adubação semanal com macro e micronutrientes conforme reportado por Teixeira et al. (2001).

Quanto ao tamanho adequado para o transplântio ex vitro, Oliveira e Cabral (1998) reportam a altura de 4 cm, recomendando ainda que as raízes mais longas sejam cortadas, de modo a deixar um comprimento máximo de 3 cm, visando sobretudo homogeneizar o sistema radicular, facilitar o transplântio das plantas e estimular o crescimento de novas raízes. Em relação ao tipo de recipiente, a maioria dos trabalhos tem reportado o uso de tubetes e, em menor frequência, o de bandejas coletivas, sendo o primeiro vantajoso por não causar o envelhecimento das raízes. Nesse contexto, Teixeira et al. (2001), avaliando tubetes de diferentes dimensões, observaram que o melhor desenvolvimento das plantas ocorreu quando se utilizaram tubetes de maior volume (300 mL), resultado em discordância ao observado por Souza Junior et al. (2001). No que se refere ao tipo de substrato, grande parte dos trabalhos tem usado a

⁷Bactérias que não apresentam crescimento visível no meio de cultivo e nem sintomas nos tecidos cultivados (PEREIRA et al., 2003).

formulação comercial Plantmax[®] (SOUZA JUNIOR et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2001), havendo também a utilização de misturas compostas por casca de arroz carbonizada e solo (1:1), acrescidas de 7,5 g do formulado NPK (5-20-10), além da mistura de areia, xaxim e húmus (SOUZA JUNIOR et al., 2001).



Fotos: a, b (Jonny E. Scherwinski-Pereira); c, d, e (Hermínio Souza Rocha)

Fig. 6. Plantas alongadas e enraizadas in vitro em meio líquido (a); lavagem em água de torneira (b); plantas aclimatizadas em tubetes (c, d, e).

Apesar de haver discordâncias para os diferentes protocolos publicados, nenhuma dificuldade tem sido reportada quanto à sobrevivência ex vitro e o desempenho em campo das plantas micropropagadas de abacaxizeiro. O que se tem observado é um crescimento muito lento das mudas nas semanas iniciais do transplante ex vitro, de maneira que a intensa formação de folhas novas ocorre somente após 120 dias, sendo necessário que as mudas permaneçam menos de 5 a 7 meses em casa de vegetação a fim de atingirem o tamanho mínimo para plantio no campo (TEIXEIRA et al., 2001). Ainda segundo estes autores, as folhas oriundas do cultivo in vitro podem apresentar enrugamento generalizado por algumas semanas, além de um fenótipo atípico do genótipo em questão, com espinhos pouco desenvolvidos e reduzida cerosidade, aspectos não observados nas folhas formadas durante a aclimatização.

Entretanto, dependendo das condições ambientais da região onde o processo de aclimatização for realizado, pode-se ter um crescimento mais rápido das mudas micropropagadas e redução no período necessário para que estas sejam levadas ao campo, acarretando divergências nos trabalhos

relatados. De acordo com Hermínio Souza Rocha (informação verbal)¹⁰, plantas de abacaxizeiro micropropagadas aclimatizadas em tubetes contendo substrato adequado e adubação complementar, no Município de Cruz das Almas (BA), atingem cerca de 20 cm de altura e boa formação de sistema radicular após 45 a 60 dias do transplântio ex vitro. Segundo Almeida et al. (2002), mudas com aproximadamente 15-20 cm de altura e 150 g de peso fresco apresentaram boa adaptação quando transferidas para o campo.

Recentemente, outra alternativa que vem sendo utilizada para reduzir o estresse das plantas após a sua exposição às condições ex vitro e favorecer um melhor restabelecimento é o emprego da luz solar como fonte de iluminação na fase de alongamento/enraizamento in vitro. Tal alternativa foi inicialmente estudada por Silva (2006) e mostrou bons resultados em relação ao cultivo em sala de crescimento sob luz artificial.

3. Anatomia Foliar das Plantas Micropropagadas

Até o presente momento, pouco é reportado na literatura sobre a anatomia foliar de abacaxizeiros em condições de campo e das plantas micropropagadas. No caso das plantas em campo, as estruturas anatômicas descritas são aquelas características das bromeliáceas, tais como: presença de ceras, tricomas, epiderme uniestratificada revestida por cutícula com diâmetro maior perpendicular ao eixo da folha e presença de hipoderme. As folhas são hipoestomáticas, com os estômatos dispostos longitudinalmente em sulcos pequenos e paralelos, e o mesofilo apresenta tecido aquífero logo abaixo da face adaxial da epiderme, parênquima clorofilado ou não, onde estão os feixes vasculares, cordões de fibras isolados e canais de aeração (PY, 1969; PY et al., 1984 citados por BARBOZA et al., 2006). Em relação às plantas micropropagadas, poucos são os trabalhos publicados (NIEVOLA et al., 2005; BARBOZA et al., 2006; SILVA, 2006).

De maneira geral, folhas de mudas de abacaxizeiro in vitro e em casa de vegetação apresentam estruturas básicas semelhantes, tais como presença de fibras, hipoderme, parênquima aquífero, parênquima clorofilado e cavidades aeríferas. Porém, variações estruturais como frequência estomática, espessamento da cutícula e parede da epiderme, formato e sinuosidade das paredes das células do parênquima aquífero e presença de células papilosas são observadas, o que demonstra plasticidade fenotípica da espécie ao ambiente. Contudo, as principais características anatômicas são listadas na Tabela 2.

Em relação às características relacionadas, Barboza et al. (2006) discutem que a presença da hipoderme e do parênquima aquífero nas folhas in vitro pode ser correlacionada com o alto índice de sobrevivência ex vitro das plantas micropropagadas, muito embora o crescimento nos primeiros dois meses em aclimatização seja reduzido. Nesse contexto, estes autores enfatizam que a realização de pesquisas sobre as funções fisiológicas da hipoderme e do

parênquima aquífero, principalmente na fase de transição da planta *in vitro* para *ex vitro*, pode contribuir para melhorar o crescimento da muda e reduzir o tempo em casa de vegetação. Além disso, o estudo e entendimento das alterações decorrentes do processo de micropropagação podem ter papel importante no desenvolvimento de novos protocolos ou na otimização dos já existentes.

Tabela 2. Principais características da anatomia foliar de plantas de abacaxizeiro micropropagadas – cultivar Pérola.

Características	<i>In vitro</i> ¹	Aos 6 meses <i>ex vitro</i> ²	Aos 10 meses <i>ex vitro</i> ³
Cutícula	Pouco desenvolvida nas faces adaxial e abaxial da epiderme	Epiderme recoberta por cutícula em toda sua extensão, porém com espessamento variável	
Células epidérmicas	Células epidérmicas adaxiais de paredes finas	Superfície adaxial com espessamento da parede entre 8 e 10 μm na região do eixo central, e 10 e 12 μm na região do bordo foliar. Na face abaxial, o espessamento foi menor	
Paredes periclinais das células epidérmicas	Paredes periclinais externas curvas ou convexas nas faces adaxial e abaxial, e células papilosas*	Paredes periclinais externas retas ou quase retas	
Tricomas	Tricomas glandulares multicelulares estão presentes nas faces adaxial e abaxial da epiderme das folhas		
Estômatos	As folhas de abacaxizeiro são hipoestomáticas, independentemente do ambiente de cultivo. Estão distribuídos em faixas paralelas por toda extensão da face abaxial, apresentando câmara subestomática		
Densidade estomática	Em média, 54 estômatos $\cdot \text{mm}^{-2}$, com maior densidade no terço médio das folhas	Em média 62 estômatos $\cdot \text{mm}^{-2}$, com maior densidade no terço médio das folhas	
Hipoderme	Presente em ambas as faces da epiderme, com 42 e 41 μm para o ambiente <i>in vitro</i> e casa de vegetação		
Mesofilo	Mesofilo dorsiventral na região do eixo central da folha e homogêneo na região do bordo foliar		

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Parênquima aquífero	Constituído por células grandes de formato arredondado, paredes delgadas, planas ou com leves ondulações. Espessura média de 204 μm	Células grandes, com paredes delgadas e planas. Espessura média de 661 μm . Na região do eixo central, presença de três ou quatro estratos de células; da região do eixo central da folha em direção ao bordo foliar, ocorre diminuição do tamanho e número de camadas de células
Parênquima clorofilado	Células arredondadas, observando-se os cloroplastos distribuídos centrifugamente por toda a parede da célula. Espessura média de 195 μm	Homogêneo na região do bordo foliar. Espessura média de 636 μm
Diferenciação do mesofilo	Diferenciação bem marcante entre os parênquimas aquífero e clorofilado in vitro e em aclimatização, embora o formato das células em paliçada tenha sido observado apenas no parênquima aquífero de plantas em casa de vegetação	
Parênquima aquífero e clorofilado, na região do eixo central da folha	Nenhuma diferença entre si, assim como a razão entre tecido aclorofilado (hipoderme + parênquima aquífero) e parênquima clorofilado. Nesta região da folha, o parênquima aquífero ocupa, em ambos os ambientes, em torno de 50% do mesofilo	
Feixes vasculares	Tamanho variado com grande quantidade de fibras junto ao floema e xilema, estando em maior intensidade na região do bordo foliar. Os feixes vasculares estão regularmente distribuídos no parênquima clorofiliano na região do eixo central da folha e bordo foliar	
Cerosidade	Não avaliada	
Cavidades aeríferas	Intercaladas aos feixes vasculares	

¹Plantas alongadas, por dois meses, em meio de cultivo MS geleificado, sem adição de fitorreguladores e mantidas a 16 horas de intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

^{2 e 3}Plantas aclimatizadas por 6 e 10 meses, em ambiente com sombreamento de 60%, $27,2^\circ\text{C}$ e 65,5% de umidade relativa média.

Obs.: análise anatômica efetuada na quarta e quinta folha, do ápice para a base, no material in vitro e em aclimatização, respectivamente.

*A baixa irradiância e a alta umidade relativa do ambiente in vitro podem estar relacionadas com a presença de células papilosas.

Fonte: Adaptada de Barboza et al., 2006.

4. Desempenho em Campo das Mudanças Micropropagadas

Avaliando 17 acessos de abacaxizeiro micropropagados das cultivares Pérola, Smooth Cayenne, Amarelo e Amarelinho, Vesco et al. (2000) não verificaram diferenças entre os acessos propagados. Quanto à sanidade das mudas, em 680 plantas micropropagadas a taxa de incidência de fusariose foi de 0,7%. De acordo com os autores, além desse valor ser considerado baixo, no caso de plantio com cultivares suscetíveis à fusariose e considerando apenas um ciclo de produção, o sistema proposto permite a multiplicação de mudas tipo filhote sadias, as quais podem ser utilizadas para plantio em novas áreas livres da doença.

Já Teixeira et al. (2001) comparando oito genótipos de abacaxizeiro aos 11 meses após o plantio no campo, todos obtidos por micropropagação, observaram diferenças apenas em relação à altura e vigor das plantas, os quais variaram de acordo com a cultivar. Em contraste, as plantas apresentaram grande uniformidade e níveis insignificantes de variações somaclonais.

5. Estabilidade Genética dos Clones Micropropagados

Em cultura de tecidos vegetais, quando protocolos de micropropagação são utilizados para a multiplicação massal de determinada espécie, é esperado que todas as plantas obtidas possuam genótipo idêntico à planta de origem (planta matriz). Todavia, variações genéticas podem ocorrer durante e/ou após o cultivo *in vitro*, algumas sendo epigenéticas (reversíveis) outras herdáveis, neste último caso denominadas de variações somaclonais⁸ (FEUSER et al., 2003) e, com isso, comprometer a identidade genotípica e fenotípica. Tais variações têm sido associadas a alterações cromossômicas, resultantes da deleção ou duplicação das seqüências de determinados genes (VENTURA et al., 1994), e são indesejáveis do ponto de vista de produção de mudas (VENTURA et al., 1994; KISS et al., 1995).

Para o abacaxizeiro, a variação somaclonal mais freqüentemente observada é a presença de espinhos nas extremidades das folhas de variedades inermes (desprovidas de espinho), muito embora possam ocorrer ainda variações na forma, coloração e arquitetura das folhas, bem como na altura da planta e no fruto (REINHARDT; SOUZA, 2000). A freqüência com que ocorrem não pode ser prevista e depende de vários fatores, tais como a espécie, o tipo de explante e o genótipo do doador, as condições físicas de cultivo, o tipo e concentração de reguladores de crescimento e o tempo entre os subcultivos.

Apesar dos vários trabalhos existentes, o abacaxizeiro é uma planta pouco conhecida geneticamente, principalmente quanto à variação somaclonal, entretanto sua ocorrência não tem sido reportada como um problema. Contudo,

⁸Termo empregado para expressar a variação espontânea de plantas regeneradas de cultura de células ou tecidos *in vitro* (TEIXEIRA, 2006).

devido à crescente utilização deste tipo de material propagativo tem sido importante avaliar a magnitude da variação somaclonal e seu efeito fenotípico (FEUSER et al., 2003). Além disso, de acordo com Kiss et al. (1995), as bromélias são particularmente propensas a variações genotípicas e fenotípicas em cultivo de tecidos. Assim, com o intuito de verificar e compreender melhor essas variações, técnicas como determinação de padrões isoenzimáticos ou amplificação casualizada de DNA polimórfico (RAPD) (GOTTARDI et al., 2002), ou ainda observações fenotípicas (plantas atípicas ou variantes), durante ou após o cultivo in vitro (VESCO et al., 2000), têm sido empregadas.

Nesse sentido, Vesco et al. (2000) avaliaram 17 acessos de abacaxizeiro pertencentes às cultivares Pérola, Smooth Cayenne, Amarelo e Amarelinho por meio de padrões fenotípico e genotípico. De acordo com os resultados, de 1.408 plantas mantidas in vitro (entre a 11ª e 13ª repicagem), 57 apresentaram alguma variação morfológica (folhas variegadas e vitrificação), porém a maioria era epigenética e somente três plantas tiveram variação somaclonal estável (5,3%). Já a análise isoenzimática detectou quatro plantas com diferenças no padrão varietal (7,02%) entre as 57 plantas. Em relação às diferentes repicagens (subcultivos), foram observadas quatro plantas apresentando variação somaclonal detectada por isoenzimas (4%), sendo uma no 3º e 4º subcultivos e duas na 10ª repicagem, além de uma modificação morfológica, num total de 5% (de 100 plantas). Por outro lado, mudas na fase de aclimatização não apresentaram alterações morfológicas, ao contrário do padrão isoenzimático que detectou duas (0,86%). Por fim, o padrão fenotípico avaliado em campo (características morfoagronômicas) foi normal. Dessa forma, os autores consideraram o protocolo utilizado como adequado para a manutenção da estabilidade genética.

Posteriormente, Gottardi et al. (2002), utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, observaram em algumas amostras plantas com padrões de bandas diferentes para alguns dos "primers" utilizados, as quais foram associadas a uma possível variação somaclonal. De modo semelhante, Feuser et al. (2003) avaliaram a fidelidade genética de abacaxizeiro micropropagado em biorreator de imersão temporária e permanente, por meio de análises isoenzimáticas e marcadores RAPD. De acordo com seus resultados, duas variantes (0,67%) foram identificadas pelas análises isoenzimáticas no sistema estacionário, ao passo que quatro das 600 plantas (0,67%) oriundas do sistema de imersão temporária apresentaram variações. Quanto aos padrões de RAPD, a taxa de variantes somaclonais para o cultivo em imersão temporária variou de 2,3% a 11%, na presença de 0 e 6 μM de PBZ (Paclobutrazol), ambos associados a 2,0 μM de AG_3 (ácido giberélico). Já avaliando os sistemas (estacionário ou imersão temporária), a técnica de RAPD detectou 7,5% e 5,0%, respectivamente, porém sem diferenças significativas. Diante dos resultados, os autores consideraram baixa a taxa de variações.

6. Progressos na Micropropagação de Abacaxizeiro

6.1. Produção de Mudas a partir da Técnica de Estiolamento

Como alternativa aos métodos convencionais utilizados para a produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro, Kiss et al. (1995) propuseram um novo método de propagação rápida, baseado no alongamento de brotos induzidos *in vitro*, por meio do estiolamento⁹. O método desenvolvido consiste inicialmente no corte da parte aérea de brotos assépticos (5 a 8 mm acima da base), os quais são cultivados em meio basal de MS acrescido de ANA (10 μ M) e mantidos em condições de escuro a 28°C. Em seguida, os brotos estiolados são divididos em segmentos e transferidos para placas de petri, no sentido horizontal, contendo meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento e mantidos a 26°C e 16 horas de fotoperíodo. Posteriormente, os brotos desenvolvidos dos segmentos estiolados são enraizados em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento e, ao atingir cerca de 8 a 10 cm de altura, são transferidos para casa de vegetação visando à aclimatização. Utilizando este método com a cv. Smooth Cayenne estes autores afirmam ser possível obter aproximadamente 80 mil plantas no período de um ano, partindo de uma planta primária, com a vantagem de evitar lesões na zona de regeneração, impedir a formação de calo e, conseqüentemente, reduzir a possibilidade de variabilidade fenotípica.

Outra conseqüência do uso da técnica de estiolamento *in vitro* é o fato de que no escuro os entrenós da haste dos brotos do abacaxizeiro se alongam, separando os nós que, normalmente, em presença de luz, permanecem próximos uns aos outros. Assim, para fins de micropropagação, essa separação facilita o desenvolvimento de gemas axilares e a manipulação de plantas regeneradas (BARBOZA; CALDAS, 2001). Em adição, Maynard e Bassuk (1996), utilizando outra espécie, afirmam que o estiolamento promove o aumento da suculência, decréscimo na barreira mecânica dos tecidos do caule em conseqüência da menor lignificação (o que poderia favorecer o enraizamento *in vitro*), suberificação e espessura das paredes celulares, além de alterações na sensibilidade dos tecidos à auxina e modificações no conteúdo de compostos fenólicos.

Atualmente, em decorrência dos experimentos de Kiss et al. (1995), diversos estudos são reportados com a técnica de estiolamento em abacaxizeiro (PRAXEDES et al., 2000; BARBOZA; CALDAS, 2001; MOREIRA et al., 2003; TAMAKI et al., 2007), todos visando aprimorá-la a cada genótipo e, em alguns casos, estudar a possibilidade de estiolamento sem suplementação exógena de reguladores de crescimento. Porém, nenhum trabalho sobre os efeitos do estiolamento na estrutura, fisiologia ou desempenho agrônômico *ex vitro* das

⁹Consiste no desenvolvimento de brotos, ramos ou partes desses em ausência de luz, o que causa o crescimento, geralmente pelo alongamento dos internódios, com coloração amarela ou branca devido à ausência de clorofila (HARTMANN; KESTER, 1990).

mudas produzidas foi realizado até o presente momento, nem mesmo este método tem sido empregado em escala comercial.

6.2. Utilização de Biorreatores de Imersão Temporária

Nos últimos anos, várias pesquisas utilizando sistemas de automação como os biorreatores¹⁰ têm sido relatadas para a micropropagação de abacaxizeiro em meio líquido (ESCALONA et al., 1999; 2003; GONZÁLEZ-OLMEDO et al., 2005; TEIXEIRA, 2006; SILVA et al., 2007), com resultados mais promissores para o sistema de imersão temporária (TIB)¹¹, atualmente considerado o método de maior eficiência. Este sistema, além de possibilitar a automação do processo de cultivo in vitro, pode também reduzir os custos relativos à mão-de-obra e superar alguns problemas comumente encontrados na micropropagação convencional, como distúrbios fisiológicos dos explantes cultivados e hiperidricidade (ESCALONA et al., 2003). Adicionalmente, promove incremento significativo nas taxas de multiplicação e crescimento das culturas (TEIXEIRA, 2006; SILVA et al., 2007).

Os primeiros trabalhos foram desenvolvidos por Escalona et al. (1999), os quais comparando diferentes métodos de cultivo (sólido, líquido e imersão temporária) verificaram que o sistema de imersão temporária, com imersão das plantas por 2 minutos a cada 3 horas, possibilitou a maior taxa de multiplicação, com incremento de 300% e 400% comparado aos sistemas líquido e sólido convencional. Tal eficiência foi atribuída à habilidade deste sistema em promover a aeração e um maior contato dos explantes com o meio. Com este sistema, os autores afirmam ser possível obter aproximadamente 120 brotos de oito coroas em cerca de 10 semanas, de modo que após 8 semanas adicionais são produzidos 6 mil brotos aptos ao enraizamento e aclimatização ex vitro. Além disso, o uso deste sistema reduziu em cerca de 20% os custos de produção por planta de abacaxizeiro em relação ao método convencional. Todavia, os autores utilizaram 200 mL de meio por explante, bem superior às quantidades adotadas nos sistemas convencionais.

De modo semelhante, utilizando um biorreator de imersão temporária¹², desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), apenas na fase de alongamento/enraizamento, Teixeira (2006) obteve uma redução de 53% no custo de uma muda produzida numa biofábrica convencional. Entre as principais razões desse decréscimo substancial nos custos está a redução no número de frascos envolvidos no processo de micropropagação, assim como a eliminação da necessidade de manipulação (subdivisão e individualização) dos agregados de gemas e multibrotos resultantes da fase de multiplicação, antes de serem transferidos para a fase de alongamento/enraizamento, como ocorre com o processo convencional, resultando em economia de mão-de-obra,

¹⁰Equipamentos utilizados para o cultivo de células, tecidos, órgãos (como as gemas axilares) ou embriões vegetais, em meio de cultura líquido, sendo basicamente de dois tipos: sistema de imersão contínua e temporária (ETIENE; BERTHOULY, 2002).

¹¹Cultivo in vitro, no qual o meio de cultura líquido entra em contato com o explante de tempos em tempos, por exemplo, cinco minutos a cada duas horas (TEIXEIRA, 2006).

¹²Pedido de patenteamento (PI 0004185-8).

a qual participa em aproximadamente 60% a 70% do custo final da muda no sistema de micropropagação convencional.

Mais recentemente, Silva et al. (2007) trabalhando com a cultivar Imperial obtiveram resultados significativamente superiores utilizando o sistema de frascos irmãos com imersão temporária a cada 2 e 4 horas. Neste sistema, o cultivo de brotações axilares em frascos de 1 L contendo 300 mL de meio MS acrescido de BAP ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e ANA ($0,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) apresentou, após 45 dias, as maiores médias para número de brotos ($>1 \text{ cm}$), altura e massa de matéria seca de brotos. Ainda, quando comparado aos sistemas de cultivo in vitro convencionais, os biorreatores possibilitaram taxas de multiplicação 136% até 316% superiores.

As perdas que podem ocorrer pelo emprego desta tecnologia estão relacionadas ao baixo controle ambiental, pois a quase totalidade dos estudos sobre o ecossistema do sistema de micropropagação envolve meios semi-sólidos. Além disso, há necessidade de definir os requerimentos fisiológicos dos explantes e caracterizar ecofisiologicamente o ambiente dos biorreatores, especialmente visando aumentar a qualidade das plantas obtidas (ESCALONA et al., 2003). Deve ser salientado que a adoção de biorreatores requer um investimento inicial alto, o que pode limitar a rápida expansão desse sistema de cultivo, principalmente em biofábricas.

6.3. Uso da Luz Solar

De acordo com Fuentes et al. (2007) é possível melhorar as características fisiológicas das plantas in vitro e o subsequente desempenho ex vitro das mudas micropropagadas, particularmente as espécies tropicais. Para isso, devem-se manipular alguns fatores abióticos in vitro, como a intensidade e qualidade luminosa, por meio do cultivo das plantas em sala de crescimento com luz solar nos últimos estágios do processo de micropropagação. Outra consequência do uso da luz solar ou natural é a redução dos gastos com iluminação artificial e, conseqüentemente, nos custos de produção (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999). Isso porque os gastos com iluminação nas salas de crescimento, utilizando lâmpadas fluorescentes, correspondem a aproximadamente 65% dos custos em energia elétrica (STANDAERT DE METSENAEAE, 1991). Todavia, a utilização ou não desta fonte de luz dependerá da região, visto que a disponibilidade e homogeneidade de luz varia com as condições climáticas, como estações do ano e hora do dia. Adicionalmente, devem-se considerar a espécie e a fase de cultivo in vitro, o que necessita de estudos mais aprofundados quanto aos seus efeitos sobre a fisiologia e estrutura das plantas obtidas, bem como de sua performance ex vitro.

Em abacaxizeiro, resultados promissores pelo uso desta fonte de luz são reportados por Silva (2006) para a cv. Imperial, principalmente na fase de enraizamento. Entre os efeitos positivos observados por esse autor está a obtenção de plantas maiores e anatomicamente mais adaptadas, com espessamento significativo do parênquima clorofiliano, além de melhor performance agrônômica e anatômica das plantas durante a fase de aclimatização.

6.4. Esterilização Química do Meio de Cultivo

Entre as alternativas para reduzir os custos de produção em laboratórios comerciais de plantas ou biofábricas, a substituição do processo de esterilização via autoclavagem por outro método mais barato, sem contudo prejudicar o crescimento in vitro das culturas, tem sido discutida e considerada promissora (TEIXEIRA et al., 2006). Além de encarecer o custo final de produção, a autoclavagem pode influenciar negativamente compostos termolábeis como os antibióticos e giberelinas (CID; ZIMMERMANN, 2006), tiamina, ácido indolacético (AIA) e indolbutírico (AIB), piridoxina, entre outros (TEIXEIRA et al., 2006).

Nesse intuito, uma alternativa que tem sido estudada em abacaxizeiro é a esterilização química. Porém seu uso no cultivo in vitro de plantas ainda é pouco explorado. O método consiste em adicionar ao meio de cultivo baixas concentrações de cloro ativo (p/v) (NaClO), de maneira que os utensílios de vidro, frascos de cultivo, bem como as tampas também sejam submetidos a tratamentos prévios em solução de hipoclorito de sódio. Utilizando esse método, Teixeira et al. (2006) verificaram que brotos de abacaxizeiro da cv. Smooth cayenne cultivados em meio contendo concentração igual ou superior a 0,0003% de cloro ativo, associado a outros procedimentos assépticos, proporcionaram completa esterilização do meio. Adicionalmente, na concentração de 0,0003%, os brotos mais do que dobraram sua biomassa (fresca e seca) e o número de novos brotos. Entretanto, as respostas positivas sobre o cultivo do abacaxizeiro, devido ao uso de cloro ativo, ainda necessitam de elucidação.

7. Considerações Gerais e Perspectivas Futuras

O desenvolvimento de processos e produtos mais produtivos e menos onerosos tem sido a retórica dos trabalhos de propagação clonal de abacaxizeiros in vitro. Neste contexto, têm merecido maior atenção trabalhos que abordam o uso de novas metodologias mais eficientes de produção de mudas, a partir da utilização de meios de consistência líquida e biorreatores, com resultados bastante promissores. No entanto, apesar dos importantes avanços e, de certa forma, do domínio atual das diferentes etapas do processo, é necessário maior aprofundamento em questões fisiológicas básicas da espécie que ainda não estão devidamente respondidas, como por exemplo, o comportamento do aparato fotossintético e desenvolvimento in vitro da espécie. Biorreatores de imersão temporária também devem ser melhor estudados e adaptados à cultura para que a eficiência propagativa torne-se evidente, uma vez que, apesar dos esforços, ainda são poucos os relatos sobre o uso direto de mudas micropropagadas em campos produtivos brasileiros. Outra questão a ser estudada com maior profundidade refere-se ao excessivo tempo necessário ao crescimento das plantas micropropagadas em casa de vegetação/viveiro para o transplante definitivo em campo.

Apesar das atuais dificuldades e desafios futuros de se trabalhar a propagação clonal *in vitro* do abacaxizeiro, há um consenso entre os pesquisadores da área de que a cultura de tecidos é a alternativa mais promissora para a multiplicação clonal em larga escala de materiais selecionados e livres de doenças. Isso evidencia que os trabalhos *in vitro* com a espécie devem ser mais bem estudados, seja para a produção de mudas em larga escala ou para acelerar programas de melhoramento genético desta espécie, especialmente para o Brasil que deseja ser referência mundial na área de fruticultura.

8. Agradecimentos

À Dalíhia Nazaré dos Santos por ter contribuído nas ilustrações deste trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

9. Referências

ABACAXI. **Agrianual 2007**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, Consultoria e Agroinformativos, 2007. p. 149-158.

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

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 363-366, 2000.

ALMEIDA, W. A. B. de. **Efeito da benzilaminopurina nas diferentes fases da propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.)**. 1994. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, Cruz das Almas, Cruz das Almas.

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

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

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

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, DF, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

CID, L. P. B.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 122).

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

CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. (Org.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 480 p.

DAMIÃO FILHO, C. F.; LAURINDO, V. T.; BIANCO, S. Cultivo *in vitro* de gemas axilares do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Smooth Cayenne. **Cultura Agrônômica**, Ilha Solteira, v. 2, n. 1, p. 49-60, 1993.

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

ESCALONA, M.; SAMSON, G.; BORROTO, C.; DESJARDINS, Y. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 651-656, 2003.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 215-231, 2002.

FEUSER, S.; MELER, K.; DAQUINTA, M.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 221-227, 2003.

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

FITCHET, M. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapples. **Acta Horticulturae**, n. 275, p. 261-266, 1990.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; ESPADAS, F.; QUIROZ, A.; AGUILAR, M.; COELLO, J.; SANTAMARÍA, J. M. Manipulation of abiotic *in vitro* factors to improve the physiology and subsequent field performance of micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, n. 748, p. 77-85, 2007.

GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L.; FUNDORA, Z.; MOLINA, L. A.; ABDULNOUR, J.; DESJARDINS, Y.; ESCALONA, M. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 87-90, 2005.

GOTTARDI, M. V. C.; LEMOS, E. G. M.; RUGGIERO, C. Avaliação por RAPD de plantas de abacaxizeiro cultivar Smooth cayenne derivadas do seccionamento do talo e cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 001-005, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa – SPI: Embrapa – CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

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

JUNGHANS, T. G.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos. Obtenção e manuseio de explantes. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 100-114.

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.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1999.

MACÊDO, C. E. C. de; SILVA, M. G. da; NÓBREGA, F. S. da; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

MANICA, I. **Fruticultura tropical: 5. Abacaxi**. Cinco Continentes, Porto Alegre, 1999.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Effects of stock plant etiolation, shading, banding, and shoot development on histology and cutting propagation of *Carpinus betulus* L. *fastigiata*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 5, p. 853-860, 1996.

MEDEIROS, D. N.; MACÊDO, C. E. C.; ALLOUFA, M. A. I. Efeito do NaCl sobre a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 01-05, 2001.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NIEVOLA, C. C.; KRAUS, J. E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B. M.; MERCIER, H. temperature determines the occurrence of cam or c3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 832-837, 2005.

PAIVA, P. D. de O.; MAYER, M. D. B.; KAWAMURA, M. I.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de BAP, Thidiazuron e Sulfato de adenina na propagação *in vitro* de abacaxi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 46, n. 265, p. 231-237, 1999.

PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; ANJOS SOBRINHO, A. dos. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 7, p. 827-834, 2003.

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

REINHARDT, D. H.; SOUZA, A. da S. Manejo e produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 13-19, 1998.

REINHARDT, D. H.; SOUZA, A. da S. Manejo e produção de mudas. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. da S.; CABRAL, J. R. S. (Ed.). **Abacaxi Produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2000. 77 p. (Frutas do Brasil, 7).

SÁ, M. E. L. de. Propagação *in vitro* de diferentes genótipos de abacaxizeiro por meio de seccionamento de plântulas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 017-020, 2001.

SILVA, A. B. da. **Biorreatores e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 132 f. :il. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, P.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 9, p.1257-1260, set. 2007.

SOUZA JÚNIOR, E. E. de; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 450-454, 2003.

STANDAERT DE METSENAERE, R. E. A. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merrill cultivar 'Smooth Cayenne' em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea**, v. 34, n. 1, p. 69-73, 2007.

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. **Produção de mudas de abacaxi de alta qualidade através da micropropagação**. Brasília: DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 26 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 70).

TEIXEIRA, J. B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 180).

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 375-378, 2006.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G. M. Propagação por biotecnologia: micropropagação "in vitro" do abacaxizeiro. In: RUGGIERO, C. **Controle integrado da fusariose do abacaxizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 43-51.

VENTURA, J. A. **Fusariose do abacaxizeiro**: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro*. 1994. 111 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; BELO, A.; FEUSER, S.; OLIVEIRA, E. N. de; BRANCHER, A.; ZAFFARI, G. R.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 80-85, 2000.