

Biblioteca



13020019

PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CURAUÁ
(*Ananas erectifolius* L.B. Smith)

ELVILENE DE MELO E SILVA ALBIM

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Biologia Vegetal Tropical, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador: Dr. Osmar Alves Lameira

Belém-PA

2004

TESE/RIUFRA
584.85
A 335p.
ex. 1

1302
tese
ex. 1

NS
19021

A 335 Albim, Elvilene de Melo e Silva
Propagação "in vitro" de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.
Smith)/ Elvilene de Melo e Silva Albim. _ Belém, 2004.

63 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) _ Universidade Federal
Rural da Amazônia, 2004.

1 *Ananas erectifolius* 2 Curauá 3 Regulador de Crescimento
4 Micropropagação 5 Substrato

CDD_584.22



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

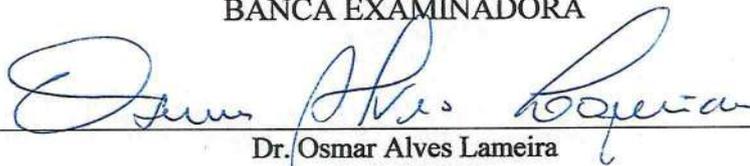
PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE CURAUÁ
(Ananas erectifolius L. B. Smith)

ELVILENE DE MELO E SILVA ALBIM

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Biologia Vegetal Tropical, para obtenção do título de "Mestre".

Aprovado em março de 2004

BANCA EXAMINADORA



Dr. Osmar Alves Lameira
Orientador

Embrapa Amazônia Oriental - Belém-PA



Dr. Oriél Filgueira de Lemos
Embrapa Amazônia Oriental - Belém-PA



Prof. Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Prof. Dr. Milton Guilherme da Costa Mota
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

A **DEUS**, minha fonte de água viva.

Aos **Santos Anjos**, minha especial devoção.

Aos meus pais **Olga e Elvio** e ao meu irmão **Luís**

Por todo o sacrifício que fizeram por mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, princípio e fim.

Aos Santos Anjos, meus eternos guardiães.

Aos meus pais, Olga e Elvio, meus irmãos: Luís, Ruth e Helena; meu cunhado Júnior e meus sobrinhos: Ophir, Juliana e Natália.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio dado à pesquisa.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), a todo corpo docente pela oportunidade de realizar este curso e aumentar meus conhecimentos, em especial ao Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho, coordenador do curso de Mestrado em Agronomia na Área de concentração: Biologia Vegetal Tropical e aos professores doutores Milton Mota, Aliete e Paulo Contente.

Aos secretários do curso de pós-graduação: Regina Moura e Raimundo Gomes.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, Belém-PA, por disponibilizar recursos e estrutura necessários à realização deste trabalho, em especial ao orientador, Dr. Osmar Alves Lameira, pelo apoio, amizade, paciência e disponibilidade em dividir seus conhecimentos e ao Dr. Edson Artiaga.

Ao Laboratório 'Bionorte': Tecnologia de Plantas, Benevides-PA, por subsidiar alguns experimentos, em especial, à Sra. Fátima Nascimento .

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas e do Horto da Embrapa: Dr. Oriel Lemos, Dra. Marli Pedroso, Ms. Ilmarina Menezes, Ms. Iracema Cordeiro, Iulla Naiff, Surama Pantoja, Alessandra Cardoso, Lana Reis, Luciene Medeiros, Clévea da Silva, Leila Amaral, Sérgio Alves, Gerson Martins, Gilberto Costa, Paulo Barros, Raimundo Castro, Aluísio Souza, Elaine Oliveira e Juliana Paiva.

Aos funcionários da Biblioteca da Embrapa: José Maria Fernandes, José Ribamar Santos e Dioberto Araújo, pelo grande auxílio durante a revisão da literatura.

À amiga e bióloga Ms. Eunice Macedo, ao amigo e biólogo, Hélio Plautz e ao agrônomo Jorge Pinheiro, por toda ajuda durante o curso de mestrado.

Ao Ms. Moisés Mourão Júnior e ao Ms. Raimundo Parente pela assessoria às análises estatísticas.

Aos pesquisadores, Dr. Davi Junghans, Dra. Fernanda Vidigal e Dra. Maria Eugênia Sá, pelo auxílio na revisão da literatura.

Aos colegas mestrandos das turmas de 2002 e 2003, pela convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial, Angélica Barbosa, Silvanira Barbosa, Márcia Sacco, Maria Cristina Mendes, Telma Teixeira e João Batista Alves Júnior.

**“Aprendi com a natureza,
a me deixar cortar
e voltar sempre inteira”**

Cecília Meireles

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 RESUMO GERAL	14
ABSTRACT	15
1.2 APRESENTAÇÃO	16
1.3 A IMPORTÂNCIA DA PROPAGAÇÃO “ <i>IN VITRO</i> ”	18
1.3.1 Regeneração de plantas via organogênese	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2 ASSEPSIA E ESTABELECIMENTO “<i>IN VITRO</i>” DE GEMAS AXILARES DE CURAUÁ (<i>Ananas erectifolius</i> L.B. Smith)	23
2.1 RESUMO	23
ABSTRACT	24
2.2 INTRODUÇÃO	25
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.3.1 Obtenção de gemas assépticas	26
2.3.2 Estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá	28
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
2.4.1 Obtenção de gemas assépticas	29
Contaminação	29
Oxidação	31
Tecidos mortos	32
2.4.2 Estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá	34
2.5 CONCLUSÕES	38
2.5.1 Obtenção de gemas assépticas	38
2.5.2 Estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

CAPÍTULO 3 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP (6-BENZILAMINOPURINA) NA INDUÇÃO DE BROTOS “IN VITRO” DE CURAUÁ (<i>Ananas erectifolius</i> L.B. Smith)	41
3.1 RESUMO	41
ABSTRACT	41
3.2 INTRODUÇÃO	42
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO 4 CRESCIMENTO DE BROTOS DE CURAUÁ “IN VITRO” E ACLIATIZAÇÃO	50
4.1 RESUMO	50
ABSTRACT	50
4.2 INTRODUÇÃO	51
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.3.1 Crescimento de brotos de curauá “in vitro”	52
4.3.2 Aclimatização de plantas de curauá obtidas “in vitro”	53
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.4.1 Crescimento de brotos de curauá “in vitro”	54
4.4.2 Aclimatização de plantas de curauá obtidas “in vitro”	57
4.5 CONCLUSÕES	60
4.5.1 Crescimento de brotos de curauá “in vitro”	60
4.5.2 Aclimatização de plantas de curauá obtidas “in vitro”	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).	27
Tabela 2. Frequência de gemas contaminadas em função dos tratamentos e assepsia aplicados às gemas axilares de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	29
Tabela 3. Percentagem de gemas axilares de curauá oxidadas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	31
Tabela 4. Frequência de gemas com tecidos mortos em função dos tratamentos de assepsia aplicados ao curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	33
Tabela 5. Frequência relativa de gemas axilares de curauá estabelecidas e em desenvolvimento sob inoculação em meio de cultura MS + 4,5 mg.L ⁻¹ de BAP e meios de cultura ½ MS → MS + GA ₃ + BAP após 30 dias. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	35
Tabela 6. Resumo da Análise de Variância para média de indução de brotos de curauá em função das concentrações de BAP e tempo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	44
Tabela 7. Médias de indução de brotos de curauá por repetição cultivados em meio de cultura MS em diferentes concentrações de BAP e intervalos de tempo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	44
Tabela 8. Resumo da Análise de Variância para média de comprimento de brotos de curauá em função dos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos, ao longo de 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.	54
Tabela 9. Médias de comprimento e de brotos e emissão de raízes em brotos de curauá nos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos, ao longo de 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.	55
Tabela 10. Resumo da Análise de Variância para média de brotos de curauá ≥ 0,5 cm de comprimento em função dos meios de cultura MS e ½ MS líquidos após 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.	56

- Tabela 11. Resumo da Análise de Variância para comprimento das plantas de curauá em função dos diferentes substratos testados ao longo de 60 dias de cultivo. Bionorte, Benevides-PA, 2004. 57
- Tabela 12. Resultados da aplicação do teste T aos contrastes considerados relevantes entre os substratos estudados, para média de comprimento dos brotos de curauá aos 60 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004. 59

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Banco Ativo de Germoplasma de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003 (A); curauá branco (B); curauá roxo (C).	17
Figura 2. 'Tolete' de curauá e em evidência gema axilar utilizada como explante. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	26
Figura 3. Frequência relativa de gemas de curauá contaminadas em função da ausência (-) e presença (+) de álcool a 70% e NaOCl a 2% na assepsia das gemas de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	30
Figura 4. Frequência relativa de gemas oxidadas em função do uso de álcool a 70% e NaOCl a 2% na assepsia das gemas de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	32
Figura 5. Frequência relativa de gemas com presença de tecidos mortos, em função do uso de álcool a 70% e NaOCl a 2% na assepsia das gemas de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	33
Figura 6. Efeitos da concentração de GA ₃ no estabelecimento de gemas axilares de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	36
Figura 7. Gema de curauá aos 15 dias estabelecida em meio de cultura MS + 4,5 mg.L ⁻¹ de BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	37
Figura 8. Número de gemas axilares de curauá estabelecidas em meio de cultura MS + 4,5 mg.L ⁻¹ de BAP ao longo de 30 dias. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	37
Figura 9. Plantas assépticas doadoras de explantes. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	43
Figura 10. Efeito de diferentes concentrações (mg.L ⁻¹) de BAP na média de indução de brotos de curauá em meio de cultura MS líquido. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.	45

- Figura 11. Brotos de curauá aos 90 dias em meio de cultura MS líquido suplementado com BAP a 3,0 (A), 3,5 (B), 4,0 (C) e 4,5 mg.L⁻¹ (D), respectivamente. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003. 47
- Figura 12. Brotos de curauá em fase de crescimento nos meios de cultura MS (A) e ½ MS (B), líquidos, ao longo de 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004. 55
- Figura 13. Plantas de curauá aos 60 dias em ambiente de telado. Da esquerda para direita, os substratos correspondentes aos tratamentos: T1, T2, T3, T4 e T5. Bionorte, Benevides-PA, 2004. 58
- Figura 14. Representação gráfica e equação de regressão para efeito do tempo aos 15, 30, 45 e 60 dias para comprimento de plantas de curauá nos substratos estudados. Bionorte, Benevides-PA, 2004. 58

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 RESUMO GERAL

Ananas erectifolius L. B. Smith popularmente conhecida como curauá é uma *Bromeliaceae* de alto interesse econômico, especialmente para a indústria automobilística, pois produz uma fibra com resistência semelhante ao vidro. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias eficientes para a propagação "in vitro" desta espécie. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental - Belém-Pará e no Laboratório Bionorte - Tecnologia de Plantas, em Benevides-Pará. As fontes de explantes utilizadas foram plantas advindas do BAG da Embrapa, Belém-Pará e plantas cultivadas "in vitro". O trabalho constituiu-se das etapas de assepsia e estabelecimento de gemas axilares, multibrotação com BAP a partir de segmentos caulinares, crescimento, multibrotação e enraizamento sem regulador de crescimento, utilizando tufo de brotos como explantes e aclimatização de plantas de curauá obtidas "in vitro". Para assepsia, foi observada menor taxa de contaminação de gemas axilares de curauá advindas de plantas-matrizes do campo desinfestadas em NaOCl a 2% aos 10 e 15 minutos de imersão e ausência de álcool; assepsia de gemas de curauá em álcool a 70% por 5 minutos, seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos proporcionou menor percentual de oxidação, o menor percentual de tecidos mortos em gemas de curauá foi obtido com NaOCl a 2% por 10 minutos. A adição de GA₃ em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP nas concentrações testadas foi dispensável para estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá, a adição de 4,5 mg.L⁻¹ de BAP em meio de cultura MS, no cultivo inicial de gemas axilares de curauá teve papel importante no estabelecimento e o cultivo inicial por sete dias de gemas axilares de curauá em meio de cultura ½ MS, e posteriormente para meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP permitiu às gemas maior percentagem de desenvolvimento. Foi observado que o tempo para indução de brotos de curauá ocorreu de maneira eficiente até aos 90 dias, o maior número de indução de brotos ocorreu na presença de 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e que BAP acima de 3,0 mg.L⁻¹ reduziu a taxa de indução de brotos de curauá. Após 35 dias de cultivo nos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos foi observado que ambos podem ser utilizados para o crescimento de brotos de curauá; durante a fase de crescimento e enraizamento houve indução de novos brotos, principalmente, em meio de cultura MS; o meio de cultura MS foi o mais favorável à indução de raízes nos brotos do que o meio de cultura ½ MS. Através de avaliações quinzenais ao longo de 60 dias foi observado que o substrato pó de coco + fibra de coco na proporção volumétrica de 1:1 foi o mais eficiente na aclimatização de plantas de curauá obtidas "in vitro"; o tempo adequado para crescimento das plantas de curauá em bandeja é de 65 dias de cultivo e todos os substratos utilizados permitiram 100% de sobrevivência das plantas de curauá aclimatizadas originadas "in vitro" para formação de mudas.

Palavras-chave: *Ananas erectifolius*, curauá, regulador de crescimento, micropropagação, substrato.

ABSTRACT

Ananas erectifolius L.B. Smith popularly known as curaua is a *Bromeliaceae* of high economic interest, especially for the automobile industry, therefore it produces a fiber with similar resistance to the glass. The objective of this research was to develop efficient methodologies for the in vitro propagation of this species. The experiments had been carried through in the Biotechnology of Plants Laboratory from the Embrapa Amazonia Oriental, Belem-Para and in the Bionorte Laboratory Technology of Plants, in Benevides-Para. The sources of used explants were plants from the Embrapa BAG, Belem-Para and in vitro cultivated plants. The research consisted of the stages of asepsis and axillary buds establishment, shoots multiplication with BAP of stem segments, shoots growth, shoots multiplication and rooting without growth regulator using shoots tufts as explants and acclimatization of curaua plants gotten in vitro. For asepsis, was observed minor contamination tax of axillary buds of curaua happened of plant-matrices from field disinfested in NaOCl 2% to the 10 and 15 minutes of immersion and alcohol absence; curaua axillary buds asepsis in alcohol 70% per 5 minutes, followed of NaOCl 2% per 15 minutes provided minor oxidation percentile; the died tissue minor percentile in curaua axillary buds was gotten with NaOCl 2% per 10 minutes. The addition of GA₃ in culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP in the tested concentrations was dispensable for establishment and development of curaua axillary buds, the addition of 4,5 mg.L⁻¹ of BAP in culture medium MS, in the initial culture of curaua buds had important paper in the establishment and the initial culture per seven days of curaua axillary buds in culture medium ½ MS, and later for culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP allow buds greater development percentage. Was observed that the the time for induction of curaua shoots occurred in efficient way until the 90 days, the biggest number of shoots induction occurred in the presence of 3,0 mg.L⁻¹ of BAP and that BAP above of 3,0 mg.L⁻¹ reduced the tax of curaua shoots induction. After 35 days of culture in culture mediums MS and ½ MS, liquids was observed that both can be used for the growth of curaua shoots; during the phase of growth and rooting it had induction of new shoots, mainly, in culture medium MS; the culture medium MS was most favorable to the induction of roots in the shoots of that the culture medium ½ MS. Through biweekly evaluations throughout 60 days was observed that the substrate coconut dust + coconut fiber in the volumetric ratio of 1:1 it was most efficient in the acclimatization of curaua plants gotten in vitro; the time adjusted for growth of the curaua plants in tray is of 65 days of culture e all the used substrates had allowed 100% of survival of the aclimatized curaua plants originated in vitro for formation of plants.

keywords: *Ananas erectifolius*, curaua, growth regulator, micropropagation, substrate

1.2 APRESENTAÇÃO

A importância da utilização de fibras vegetais remonta ao homem primitivo. Na economia agrícola mundial, sua produção destaca-se como um dos principais setores de atividades industriais (MEDINA, 1959).

A grande tendência da indústria mundial, com destaque para o setor automobilístico, atualmente é a utilização de fibras vegetais que são biodegradáveis em substituição às fibras sintéticas, resultando uma alternativa ecológica e economicamente viável.

A fibra de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith) submetida a freqüentes pesquisas no Brasil e no exterior apresentou resultados significativos que a credenciam a ser considerada a fibra mais promissora entre as produzidas na Amazônia Brasileira. Resultados preliminares demonstraram ser a fibra do curauá comparável ao vidro, no que diz respeito à relação peso/resistência (SENA E COLARES, 1996), superando o sisal em duas vezes, a malva em cinco vezes e a juta em nove vezes (AMAZON NETWORK, 2003).

Estudos realizados por Leão, Rowell e Tavares (1998) com sisal, juta, curauá e outras fibras naturais associadas a compostos de polipropileno, atribuíram ao curauá melhor desempenho, especialmente em relação à tensão da fibra. Esta fibra também é utilizada em associação a outras fibras naturais, tais como: açai, coco, miriti entre outras, para a obtenção de papel reciclável (UFPA/POEMA, 2003).

O curauá é encontrado no Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso e Pará (BORBOREMA, 1943). Ocorre em lugares onde a precipitação pluviométrica ultrapassa 2.000 mm anuais (MEDINA, 1959) e, de acordo com Camargo (1943), trata-se de uma cultura pré-colombiana.

O curauá é descrito por Ledo (1967) como uma planta monocotiledônea, herbácea, rizomatosa, sem raiz pivotante e de sistema radicular fasciculado e superficial, pertence à Família *Bromeliaceae* e Gênero *Ananas*. A altura máxima do caule, nas condições locais, atinge aproximadamente, 1,5 m. Apresenta folhas eretas, coriáceas, dispostas, circuncentricamente, lanceoladas, medindo cerca de 5,0 cm de largura, 5,0 mm de espessura, e, aproximadamente, 1,5 m de comprimento, bordos lisos, sendo que, algumas plantas apresentam espinhos ao longo do processo de envelhecimento. Apresenta fruto semelhante em gosto e aspecto ao abacaxi, mas de tamanho reduzido. Há dois tipos, um de folhas roxo-avermelhadas denominado curauá roxo, que é mais desenvolvido e outro de folhas verde-claras denominado curauá branco (Figura 1).



FIGURA 1 - Banco Ativo de Germoplasma de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003 (A); curauá branco (B); curauá roxo (C).

Não há diferenças anatômicas entre as variedades de curauá branco e roxo (PEREIRA¹, informação verbal), contudo, em pesquisas com desgomagem de fibras, Cunha (1998) observou que o curauá roxo apresenta maior quantidade de perda de massa em relação ao branco.

¹PEREIRA, T.E.B. Engenheira Agrônoma, Ex-bolsista do Programa PIBIC/CNPq/FCAP, Belém, 1998.

O cultivo de curauá, no estado do Pará destaca-se nos municípios de Bragança e Santarém (COSTA, LAMEIRA E YOSHINO, 2002). A plantação pode se dar por monocultivo e em consórcio com outras espécies (MEDINA, 1959). Não há até o momento indícios significativos de que o curauá seja atacado por alguma praga ou doença que comprometa sua produtividade.

Plantas de curauá obtidas “*in vitro*”, mostraram-se resistentes, quando submetidas por Rizzo et al. (2002) à contaminação por ovos e juvenis infestantes de duas espécies consideradas mais daninhas de nematóides formadores de galhas do gênero *Meloidogyne*.

Quando cultivado através do método convencional, o curauá é capaz de produzir no máximo 40 mudas por ano, sendo possível a partir de apenas uma gema cultivada “*in vitro*” a obtenção de 625 mudas em cinco meses (LAMEIRA et al., 2000).

A aplicação da técnica de propagação “*in vitro*” ao curauá surge como alternativa para a expansão da cultura, visando suprir a necessidade de maior demanda da sua produção no estado do Pará, estimada em 370 toneladas de fibra/mês e oferta de 6 a 8 toneladas/mês (AGROAMAZÔNIA, 2002). Considerando-se a escassez de informações técnico-científicas sobre o curauá, além desta espécie, foram preferencialmente utilizadas outras espécies do gênero *Ananas* como parâmetro para a realização deste trabalho, que objetivou desenvolver metodologias eficientes para a propagação “*in vitro*” do curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith).

1.3 A IMPORTÂNCIA DA PROPAGAÇÃO “*IN VITRO*”

A cultura de tecidos é o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta (explante) em meio de cultura sintético sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, para gerar uma nova planta (LAMEIRA et al., 2000). Kerbauy (1997) destaca a importância prática e potencial desta ferramenta tecnológica nas áreas agrícola, florestal, horticultural, bem como na pesquisa básica em geral.

De acordo com Caldas, Haridasan e Ferreira (1998), os explantes podem ser frações de tecidos, órgãos ou células em suspensão. Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento “*in vitro*”. Esta técnica baseia-se, principalmente, na totipotencialidade das células.

A utilização da cultura de tecidos para a conservação de germoplasma, de acordo com Ferreira, Caldas e Pereira (1998) tem sido especialmente útil para espécies propagadas vegetativamente.

A técnica mais difundida atualmente na cultura de tecidos vegetais "*in vitro*" é a micropropagação e é assim denominada em função do pequeno tamanho dos propágulos utilizados como explantes.

Os métodos que são teoricamente viáveis para a propagação de plantas "*in vitro*", segundo Lameira et al. (2000), podem ser obtidos diretamente pela diferenciação de brotos adventícios, estímulo de gemas axilares (organogênese) e embriogênese somática ou indiretamente com a formação de calos. Este mesmo autor e seus colaboradores esclarecem que a escolha do explante é determinada pelo objetivo final do projeto. É imprescindível observar as condições fitossanitárias, fisiológicas e nutricionais da planta doadora de explante "*in vivo*".

A principal vantagem da micropropagação é a fixação de genótipos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes, conforme relatam Guerra et al. (1999).

Para a realização da micropropagação, Grattapaglia e Machado (1998) descrevem três passos importantes: seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação; transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

Algumas espécies, durante o processo de micropropagação necessitam de uma fase de alongamento, comentam Grattapaglia e Machado (1998), enquanto outras, a fase de enraizamento é dispensável, sendo assim, o esquema sofre adaptações de acordo com as peculiaridades específicas.

No cultivo de abacaxizeiro "*in vitro*", o meio líquido geralmente induz uma menor taxa de multiplicação, entretanto, permite a formação de brotos sem a necessidade de transferência para um meio de alongamento (LAMEIRA et al., 2000).

Para micropropagação de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), Lemos (2003) desenvolveu eficiente metodologia a partir de gemas de plantas obtidas "*in vitro*", passando pelas etapas de estabelecimento e multiplicação de gemas, crescimento caulinar e enraizamento e obtenção de plantas, até a etapa de aclimatização, com conseqüente formação de mudas.

1.3.1 Regeneração de plantas via organogênese

Estudos para regeneração de plantas de curauá a partir de segmentos caulinares obtidos de plantas assépticas foram realizados com sucesso por Rios (2002), utilizando meio de cultura de Murashige e Skoog, (1962) (MS) líquido e suplementado com BAP, induzindo pequenos e grandes brotos.

Protocolo eficiente foi descrito por Figueiredo, Nunes e Mendes (2003) para regeneração de *Ananas ananassoides* (Backer L.B. Sm.) a partir de sementes germinadas “*in vitro*” em meio de cultura ½ MS, resultando em plântulas saudáveis ao final de 60 dias.

Plântulas de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber, ex Ducke) foram regeneradas com eficiência por Cordeiro et al. (2002) a partir de sementes germinadas “*in vitro*”.

Pesquisas desenvolvidas por Lopes et al. (2000) apresentaram bons resultados para regeneração de mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de sementes germinadas “*in vitro*”, utilizando diferentes substratos, em substituição ao meio de cultura sintético habitualmente utilizado em cultura de tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROAMAZÔNIA: A revista de agronegócios da Amazônia. Ano 1, n.8, p.30-31, 2002.
- AMAZON NETWORK. Ecoamazon. Disponível em:
<http://www.amazonia.com.br/canais/ecologia/esp-curaua.asp>. Acesso em 10 dez. de 2003.
- BORBOREMA, H. R. O Curauá. Boletim da Seção de Fomento Agrícola, Belém-PA, V.2, n.1, 1943, p.11-17.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª. ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, 1998, V.1, 509 p.
- CAMARGO, F. Vida e Utilidade das Bromeliáceas. Instituto Agrônomo do Norte. Boletim Técnico n.1. 1943.
- CORDEIRO, I.M.C.C. et al. Germinação “*in vitro*” de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, ano V, n.27, p.58-61, 2002.
- COSTA, M.R., LAMEIRA, O.A., YOSHINO, V.C. Caracterização genética do curauá (*Ananas erectifolius*) através de marcadores RAPD. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, ano V, n.26, p.28-30, 2002.
- CUNHA, E.J. de S. Desgomagem de feixes de fibra de curauá (*Ananas erectifolius* S.): Influência das variáveis de processo na solubilidade do material péctico e nas propriedades mecânicas. 1998, 64 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará, Belém-PA.1998.
- FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S; PEREIRA. E.A. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª.ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação,1998. V.1, 509 p.
- FIGUEIREDO, G.S.F.; NUNES, A.C.G. da; MENDES, R.A. Germinação “*in vitro*” de *Ananas ananassoides* (Backer L.B. Sm.). In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais/ I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. 2003, Lavras-MG. Anais, 2003, p.91.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª.ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, 1998, V.1, 509 p.
- GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília-DF V.34. n.9, p.1557-1563. 1999.

- KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas "in vitro": uma realidade. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, ano 1, n.1, 1997.
- LAMEIRA, O.A. et al. *Cultura de Tecidos (Manual): Documentos*, Belém-PA, Embrapa-CPATU, n.66, 2000, p.41.
- LEÃO, A.L.; ROWELL, R.; TAVARES, N. Applications of Natural Fibers in Automotive Industry in Brazil-Thermoforming Process. *Science and Technology of Polymers and Advanced Materials*. Edited by P. N. Prasad et al. 1998. New York. Disponível em : <http://www.fpl.fs.fed.us/document/pdf1998/leao98apdf>. Acesso em ago. 2003.
- LEDO, I.A. de M. O cultivo do curauá no Lago Grande da Franca. Belém-Pará: Banco de Crédito da Amazônia S.A. 1967, 23 p.
- LEMONS, O.F. de. Mutagênese e Tecnologia "in vitro" no Melhoramento Genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). 2003, 159 p. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ, Piracicaba-SP, 2003.
- LOPES, S.C. et al. Germinação "in vitro" de mogno. *Boletim de Pesquisa*, Belém-PA, Embrapa-CPATU, n.30, 2000, 17 p.
- MEDINA, J.C. *Plantas Fibrosas da Flora Mundial*. Campinas-SP. Instituto Agrônomo. 1959, p.3-21.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.A. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962, V.15, p.473-497.
- RIOS, M.S. Multiplicação de plantas de curauá (*Ananas erectifolius*) através de técnicas de cultura de tecidos. 2002, 12 p. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Universidade Federal do Pará, Belém-PA.2002.
- RIZZO, F.M. et al. Multiplicação de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* em curauá (*Ananas erectifolius*). In: IX REUNIÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO LAGEADO. 2002, Botucatu-SP. Resumos. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/rc12002/cmtor.htm>. Acesso em 11 ago. 2003.
- SENA & COLARES. *Introdução básicas sobre a cultura do curauá*. 1996. Emater-Pará.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. POEMA. Business Promotion Sector of Bolsa Amazônia. Disponível em: <http://www.bolsamazonia.com.br/eng/Produtos/papel.aspxcurauá+f.hat>. Acesso em 11 ago. 2003.

CAPÍTULO 2 ASSEPSIA E ESTABELECIMENTO “*IN VITRO*” DE GEMAS AXILARES DE CURAUÁ (*Ananas erectifolius* L.B. Smith)

2.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias eficientes para assepsia e estabelecimento “*in vitro*” de gemas axilares de *Ananas erectifolius* L.B. Smith. Foram utilizadas 200 gemas axilares em quatro procedimentos de assepsia: imersão em NaOCl a 2% por 15 minutos; imersão em álcool a 70 % por 5 minutos seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos; imersão em álcool a 70 % por 5 minutos seguido de NaOCl a 2% por 10 minutos e imersão em NaOCl a 2% por 10 minutos, com 50 gemas para cada assepsia. Após 30 dias, foi observada menor taxa de contaminação de gemas axilares de curauá advindas de plantas-matrizes do campo desinfestadas em NaOCl a 2% aos 10 e 15 minutos de imersão e ausência de álcool; assepsia de gemas de curauá em álcool a 70% por 5 minutos, seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos, proporcionou menor percentual de oxidação; o menor percentual de tecidos mortos em gemas de curauá foi obtido com NaOCl a 2% por 10 minutos. Para estabelecimento, foram utilizadas 500 gemas axilares inoculadas individualmente, 400 em meio de cultura ½ MS e 100 em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP. As gemas inoculadas em meio de cultura ½ MS, após 7 dias foram transferidas para meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP + GA₃ nas concentrações (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹), após 7 dias, as gemas em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP + GA₃ nas concentrações (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹) foram transferidas para meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP. Após 30 dias foi observado que a adição de GA₃ em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP nas concentrações testadas foi dispensável para estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá, a adição de 4,5 mg.L⁻¹ de BAP em meio de cultura MS, no cultivo inicial de gemas axilares de curauá teve papel importante no estabelecimento e o cultivo inicial por sete dias de gemas axilares de curauá em meio de cultura ½ MS, e posteriormente para meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP permitiu às gemas, maior percentagem de desenvolvimento.

ABSTRACT

The objective of this research was to develop efficient methodologies for asepsis and axillary buds establishment of *Ananas erectifolius* L.B. Smith. 200 axillary buds in four procedures of asepsis had been used: immersion in NaOCl 2% per 15 minutes; immersion in alcohol 70 % per 5 minutes followed of NaOCl 2% per 15 minutes; immersion in alcohol 70 % per 5 minutes followed of NaOCl 2% per 10 minutes and immersion in NaOCl 2% per 10 minutes, with 50 buds for each asepsis. After 30 days was observed minor contamination tax of axillary buds of curaua happened of plant-matrices from field disinfested in NaOCl 2% to the 10 and 15 minutes of immersion and alcohol absence; curaua axillary buds asepsis in alcohol 70% per 5 minutes, followed of NaOCl 2% per 15 minutes, provided minor oxidation percentile; the died tissue minor percentile in curaua axillary buds was gotten with NaOCl 2% per 10 minutes. For establishment, had been used 500 axillary buds individually inoculated; 400 in culture medium $\frac{1}{2}$ MS and 100 in culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP. The buds inoculated in culture medium $\frac{1}{2}$ MS, after 7 days had been transferred to culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP + GA₃ in concentrations (0,0; 1,0; 2,0 and 3,0 mg.L⁻¹); after 7 days the buds in culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP + GA₃ in concentrations (1,0; 2,0 and 3,0 mg.L⁻¹) had been transferred to culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP. After 30 days was observed the addition of GA₃ in culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP in the tested concentrations was dispensable for establishment and development of curaua axillary buds, the addition of 4,5 mg.L⁻¹ of BAP in culture medium MS, in the initial culture of curaua buds had important paper in the establishment and the initial culture per seven days of curaua axillary buds in culture medium $\frac{1}{2}$ MS, and later for culture medium MS + 4,5 mg.L⁻¹ of BAP allowed buds greater development percentage.

2.2 INTRODUÇÃO

Um fator limitante no estabelecimento do processo de micropropagação é a obtenção de explantes livres de contaminantes (LEMOS, 2003).

A probabilidade de se isolar tecidos livres de vírus e outros agentes causadores de doenças, comenta Murashige² (1977 citado por TORRES, TEIXEIRA E POZZER, 1998) está inversamente relacionada ao tamanho do explante. Desse modo, vários autores relatam que a proliferação de gemas axilares é preferida para micropropagação; além de reproduzir “*in vitro*” um fenômeno natural, este sistema é mais facilmente controlado e apresenta uma fidelidade genética muito alta (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

Para a produção de plantas assépticas de curauá, tendo como fonte de explantes plantas advindas do campo, são utilizadas gemas axilares, como explantes para cultivo (LAMEIRA et al., 2000).

Pesquisas bem sucedidas foram realizadas por Pescador e Koller (1992) e Feuser, Nodari e Guerra (2001) sobre micropropagação, utilizando gemas axilares de abacaxizeiro como explantes. Da mesma forma, Almeida (1994) e Almeida, Matos e Sousa (1995) utilizaram gemas axilares das cultivares ‘Pérola’ e ‘Primavera’ em experimentos para estabelecimento, inoculando-as em meio de cultura MS suplementado com BAP.

Protocolo otimizado para micropropagação de abacaxizeiro cultivar ‘Pérola’ foi desenvolvido eficientemente por Almeida et al. (2002) a partir de gemas axilares, submetendo-as à assepsia com álcool a 70% e hipoclorito de cálcio a 2% e, posteriormente, estabelecidas com sucesso em meio de cultura MS acrescido de BAP.

O trabalho objetivou desenvolver metodologias eficientes para assepsia e estabelecimento “*in vitro*” de gemas axilares de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith).

² MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. 1977. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, V.18, p.1-24.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Obtenção de gemas assépticas

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

Foram utilizadas como fonte de explantes, plantas adultas de curauá provenientes do BAG da Embrapa Amazônia Oriental. Com auxílio de lâminas de bisturi, 200 gemas axilares foram excisadas do caule desprovido de folhas ('tolete', Figura 2).

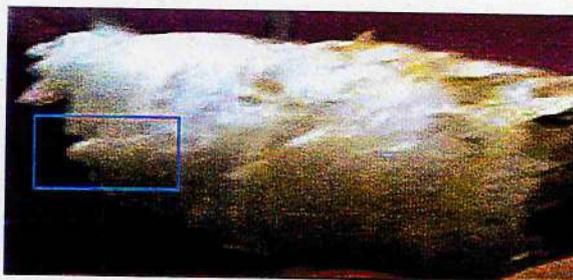


FIGURA 2 - 'Tolete' de curauá roxo e em evidência gema axilar utilizada como explante. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

As gemas axilares obtidas foram lavadas cinco vezes em água corrente e detergente comercial neutro e, posteriormente, sob câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com álcool a 70%, foram submetidas à desinfestação, adotando-se quatro procedimentos: imersão em NaOCl a 2% por 15 minutos; imersão em álcool a 70% por 5 minutos seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos; imersão em álcool a 70% por 5 minutos, seguido de NaOCl a 2% por 10 minutos e imersão em NaOCl a 2% por 10 minutos. Após os tratamentos de desinfestação, as gemas foram lavadas cinco vezes com água destilada e autoclavada a 121°C por 15 minutos para remoção dos resíduos das soluções de assepsia. Foram utilizados 50 mL de NaOCl a 2% para cada assepsia testada e da mesma forma 50 mL de álcool a 70% para cada assepsia que continha esta solução. A imersão das gemas nas diferentes soluções ocorreu em frascos autoclavados de 200 mL e durante o processo, utilizou-se pinça e espátula estéreis.

Após as lavagens, as gemas foram distribuídas em placas de Petri autoclavadas e, posteriormente, inoculadas com auxílio de pinça estéril em tubos de ensaio de 50 mL com

10 mL de meio de cultura MS (Tabela 1) contendo apenas metade da concentração dos sais ($\frac{1}{2}$ MS) e solidificado com ágar a 0,6%. Após o preparo do meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, ajustou-se o pH para $5,7 \pm 0,1$ com auxílio das soluções HCl e/ou NaOH nas concentrações 0,5 N e 1,0 N; o meio de cultura foi então autoclavado a 121° C por 15 minutos.

Após inoculação, os tubos foram vedados com papel alumínio e película de parafilm e armazenados em sala para crescimento, sob fotoperíodo de 16 h.luz.dia⁻¹ com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ de irradiância e temperatura de $25 \pm 3^{\circ}$ C.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro tratamentos que constaram de 50 gemas axilares cada, distribuídas em tubos de ensaio, contendo uma gema por tubo, totalizando 50 unidades experimentais por tratamento.

A avaliação, aos 30 dias, considerou as percentagens de gemas contaminadas, gemas mortas (coloração totalmente branca = tecidos mortos), gemas oxidadas (escurecidas ao centro) e em função da presença e ausência de álcool a 70% e tempo de imersão em NaOCl a 2%, os resultados foram analisados através do teste qui-quadrado.

TABELA 1- Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).

Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1,650
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1,900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Fe-EDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Vitaminas	
Tiamina - HCl	0,10
Piridoxina -HCl	0,50
Ácido nicotínico	0,50
Glicina	2,00
Mio-inositol	100,00
Fonte carbono	
Sacarose	30,000
pH	5,8

2.3.2 Estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá

O experimento foi desenvolvido no mesmo local do anterior. Os procedimentos para obtenção de gemas axilares, desinfestação (álcool a 70% por cinco minutos, seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos), inoculação e cultivo foram os mesmos adotados no experimento anterior.

As gemas axilares (400) foram inoculadas em tubos de ensaio similares aos utilizados no experimento anterior, contendo 10 mL de meio de cultura com a metade da concentração de sais ($\frac{1}{2}$ MS) e 100 gemas axilares inoculadas no meio de cultura MS, suplementado com $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, todos solidificados com ágar a 0,6%.

Após 7 dias, as gemas inoculadas no meio de cultura inicial $\frac{1}{2}$ MS foram transferidas para o meio de cultura MS suplementado com BAP e GA_3 distribuídos nos seguintes tratamentos: $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 + $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Posteriormente, após 7 dias, as gemas inoculadas nos tratamentos suplementados com GA_3 foram transferidas para meio de cultura MS suplementado apenas com $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Para cada tratamento empregou-se 100 gemas axilares, distribuídas em tubos de ensaio, contendo uma gema por tubo, totalizando cem unidades experimentais por tratamento.

Os dados referentes ao número de gemas estabelecidas e em desenvolvimento foram coletados ao longo de 30 dias. Avaliou-se a percentagem de estabelecimento e a utilização dos meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS para a variável de resposta, número de gemas estabelecidas, os dados foram posteriormente submetidos ao teste qui-quadrado. Para a variável de resposta, desenvolvimento de gemas, empregou-se a percentagem.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Obtenção de gemas assépticas

Contaminação

As taxas de contaminação oscilaram entre 8 e 32% (Tabela 2). Ao se avaliar a frequência de gemas contaminadas, foi possível determinar diferença altamente significativa entre todos os tratamentos ($\chi^2_{(3)}=14,04$; $p<0,001$).

TABELA 2 - Frequência de gemas contaminadas em função dos tratamentos de assepsia aplicados às gemas axilares de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Álcool	NaOCl a 2%			
	10 minutos		15 minutos	
	% Contaminadas	% Não contaminadas	% Contaminadas	% Não contaminadas
Presença	18 (9)	82 (41)	32 (16)	68 (34)
Ausência	8 (4)	92 (46)	8 (4)	92 (46)

Os tratamentos na ausência de álcool apresentaram menores taxas de contaminação (8%), independente do tempo de imersão das gemas em NaOCl a 2%, quando comparados aos que utilizavam álcool na assepsia (18 e 32%) (Tabela 2, Figura 3). Os valores de contaminação na ausência de álcool foram similares.

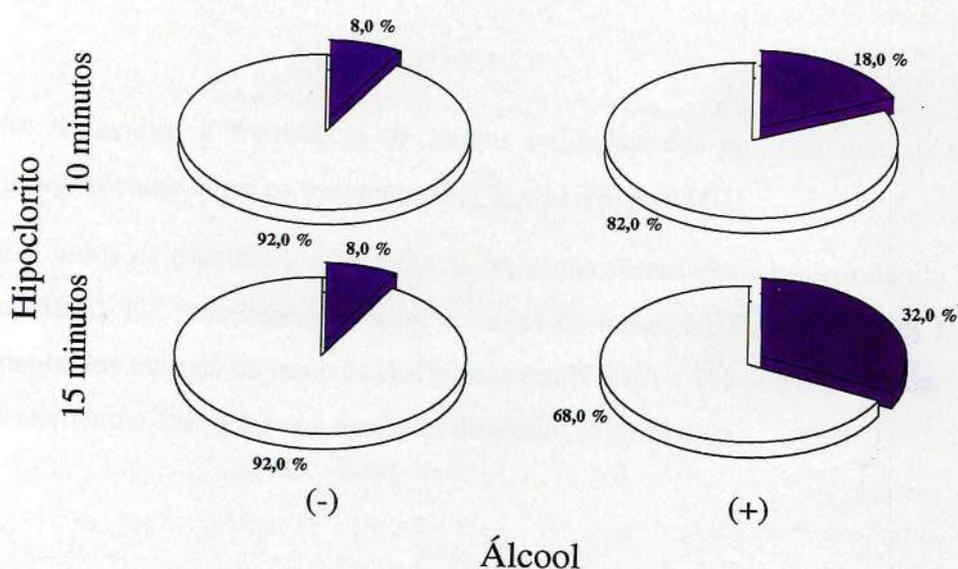


FIGURA 3 - Frequência relativa de gemas de curauá contaminadas em função da ausência (-) e presença (+) de álcool a 70% e NaOCl a 2% na assepsia das gemas de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Na presença de álcool, a percentagem de contaminação foi menor (18%) quando as gemas foram submetidas ao NaOCl a 2% por 10 minutos). Isso demonstra que nem sempre o maior tempo de imersão é o mais eficiente.

Lameira et al. (2000) obtiveram bons resultados com o uso de álcool a 70% por 1 minuto, seguido de NaOCl a 2,5% por 15 minutos em gemas axilares de curauá e por Guerra et al. (1999) em gemas axilares de abacaxizeiro, cultivares 'Perolera' e 'Primavera' com a utilização de álcool a 70% por 1 minuto, seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos.

A contaminação de explantes pode ser atribuída ao grau de eficiência dos descontaminantes e ao tempo de contato do manipulador com o material a ser inoculado. Weber et al. (2003) relatam essas experiências em abacaxizeiro micropropagado, bem como, nos trabalhos com gemas de abacaxizeiro realizados por Piza, Lima e Brasil (2001) quando utilizaram NaOCl a 2,5%.

Oxidação

Ao se avaliar a frequência de gemas oxidadas, foi possível determinar diferença altamente significante entre os tratamentos ($\chi^2_{(3)}=11,78$; $p<0,001$).

Em todos os tratamentos as taxas de oxidação foram elevadas, oscilando entre 58% e 88% (Tabela 3). Na presença de álcool, as taxas de oxidação foram menores (58% e 72%) independente dos tempos de imersão das gemas em NaOCl a 2% testados quando comparadas com os tratamentos das gemas na ausência de álcool (Figura 4).

TABELA 3 - Percentagem de gemas axilares de curauá oxidadas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

NaOCl a 2%				
Álcool	10 minutos		15 minutos	
	% Oxidadas	% Não oxidadas	% Oxidadas	% Não oxidadas
Presença	72 (36)	28 (14)	58 (29)	42 (21)
Ausência	88 (44)	12 (6)	76 (38)	24 (12)

Foi observado ainda que entre os tempos de imersão em NaOCl a 2%, o tratamento por 15 minutos apresentou menor percentagem de oxidação. Entretanto, as taxas de oxidação obtidas ainda foram elevadas. Grattapaglia e Machado (1998) relacionam a frequência da oxidação à liberação de compostos fenólicos pelas células danificadas com o corte, cuja toxidez difunde-se por todo explante, também é provável que tal efeito seja decorrente da absorção de íons pelo explante (ULISSES et al., 2000).

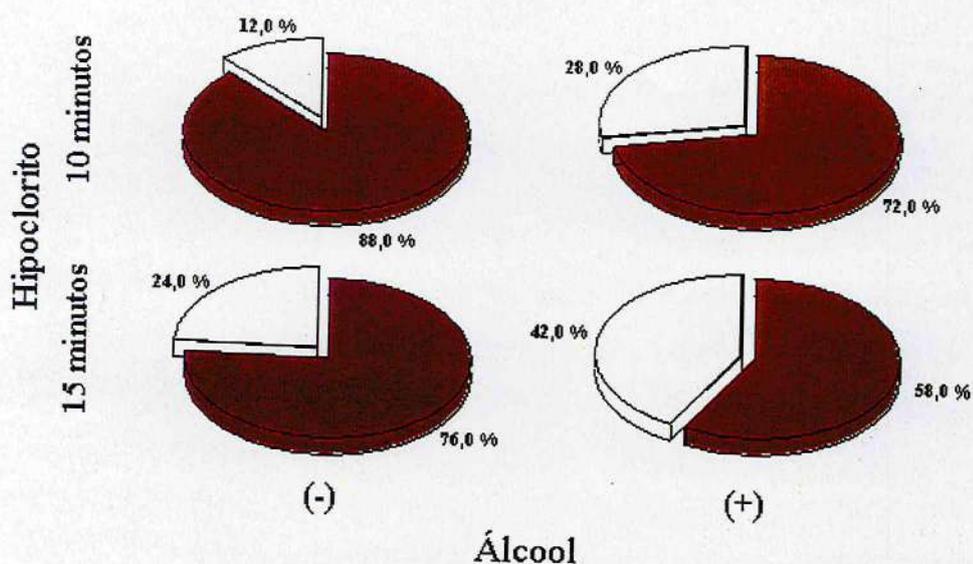


FIGURA 4 - Frequência relativa de gemas oxidadas em função do uso de álcool a 70% e NaOCl a 2% na assepsia das gemas de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Tecidos mortos

A avaliação da frequência de tecidos mortos determinou equivalência entre os tratamentos ($\chi^2_{(3)}=5,13$; $p>0,15$).

De um modo geral, as taxas de tecidos mortos nos tratamentos com a utilização de álcool foram menores. A ausência de álcool, durante a assepsia das gemas, tratadas com NaOCl a 2% por 10 minutos, apresentou a menor percentagem de tecidos mortos (4%) e a maior taxa foi obtida com as gemas tratadas com NaOCl a 2% por 15 minutos (16%) (Tabela 4, Figura 5). Na presença de álcool, os resultados foram inversos, ou seja, a menor taxa foi obtida com as gemas tratadas com NaOCl a 2% por 15 minutos (6%) e a maior taxa quando as gemas foram tratadas com NaOCl a 2% por 10 minutos (10%). Isso demonstra que a interação entre o tempo de imersão das gemas em NaOCl a 2% e a presença de álcool foram os fatores que mais influenciaram na morte dos tecidos.

TABELA 4 - Frequência de gemas com tecidos mortos em função dos tratamentos de assepsia aplicados ao curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Álcool	NaOCl a 2%			
	10 minutos		15 minutos	
	% Tecidos mortos	% Sem tecidos mortos	% Tecidos mortos	% Sem tecidos mortos
Presença	10 (10)	90 (90)	6 (6)	94 (94)
Ausência	4 (4)	96 (96)	16 (16)	84 (84)

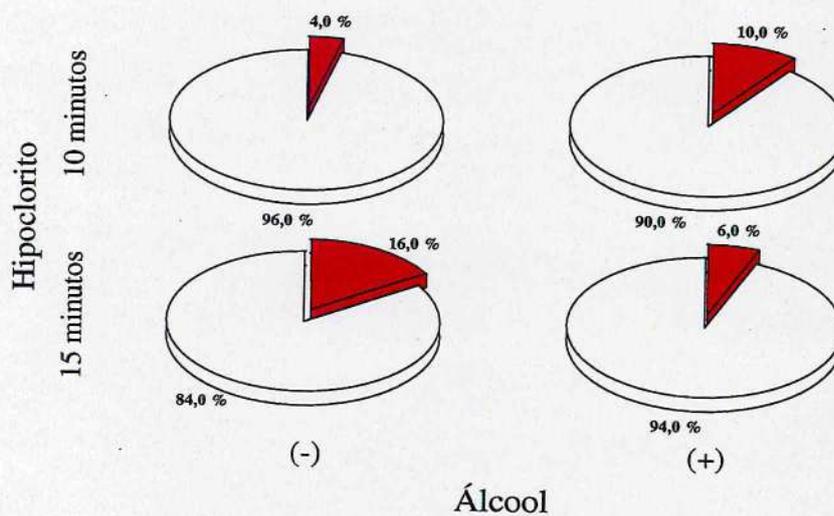


FIGURA 5 - Frequência relativa de gemas com presença de tecidos mortos, em função do uso de álcool a 70% e NaOCl a 2% na assepsia das gemas de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

2.4.2 Estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá

Na frequência de gemas estabelecidas foram observadas diferenças altamente significantes entre todos os tratamentos testados ($\chi^2_{(4)}=56,55$; $p=1,5 \times 10^{-11}$) e em relação à utilização dos meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS ($\chi^2_{(3)}=30,61$; $p=3,6 \times 10^{-6}$) entre os tratamentos que apresentaram gemas estabelecidas, sendo favorável ao meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP. Provavelmente, a utilização da concentração total dos sais do meio de cultura MS, além de vitaminas e fonte de carbono associados a esta citocinina proporcionaram melhores condições para o estabelecimento. Almeida (1994) e Almeida, Matos e Sousa (1995) obtiveram melhores resultados para o estabelecimento de gemas axilares de abacaxizeiro cultivares 'Primavera' e 'Pérola' em meio de cultura MS acrescido de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Enquanto que Sá (2001) obteve melhor resultado para estabelecimento de gemas axilares de abacaxizeiro em meio de cultura MS sem regulador de crescimento.

De acordo com Donato et al. (1999) é essencial para a micropropagação, que o meio nutritivo elaborado forneça condições para que haja um bom crescimento vegetativo, além de um índice de multiplicação adequado.

Para estabelecimento e desenvolvimento das gemas obteve-se as seguintes percentagens (Tabela 5): O tratamento $\frac{1}{2}$ MS \rightarrow MS + 0,0 mg.L⁻¹ de GA₃ + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentou 10% de gemas estabelecidas, das quais 60 % (6) iniciaram seu desenvolvimento; $\frac{1}{2}$ MS \rightarrow MS + 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentou 12% de gemas estabelecidas, das quais 33,33% (4) apresentaram desenvolvimento; $\frac{1}{2}$ MS \rightarrow MS + 2,0 mg.L⁻¹ de GA₃ + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP apresentou 4% de gemas estabelecidas, das quais 50% (2) apresentaram desenvolvimento; $\frac{1}{2}$ MS \rightarrow MS + 3,0 mg.L⁻¹ de GA₃ + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP não apresentou estabelecimento de gemas; e MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP com 31% de gemas estabelecidas, das quais 35,48% (11) apresentaram-se em desenvolvimento.

TABELA 5 - Frequência relativa de gemas axilares de curauá estabelecidas e em desenvolvimento sob inoculação em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP e meios de cultura ½ MS → MS + GA₃ + BAP aos 30 dias. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Meio de Cultura	GA ₃ (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)	N. de gemas estabelecidas - %	Gemas estabelecidas em desenvolvimento - %
½ MS → MS	0	4,5	10 (10)	60 (6)
½ MS → MS	1	4,5	12 (12)	33,33 (4)
½ MS → MS	2	4,5	4 (4)	50 (2)
½ MS → MS	3	4,5	0	0
MS	0	4,5	31 (31)	35,48 (11)

* ½ MS → MS - transferência após 7 dias de cultivo

As evidências mostram que a inoculação de gemas axilares de curauá em meio de cultura MS, suplementado com 4,5 mg.L⁻¹ de BAP, proporcionou maior número de gemas estabelecidas, pois as citocininas, com destaque para o BAP são indispensáveis para indução de proliferação de gemas axilares (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998). Os mesmos autores explicam que o tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação "in vitro". Em termos proporcionais, o maior número de gemas em desenvolvimento foi obtido no tratamento, contendo meio de cultura ½ MS → meio de cultura MS + 0,0 mg.L⁻¹ de GA₃ + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP; demonstrando que o acréscimo de GA₃ nas concentrações testadas em meio de cultura MS suplementado com BAP a 4,5 mg.L⁻¹ é desnecessário para desenvolvimento de gemas axilares de curauá. No que concerne ao estabelecimento das gemas, os resultados obtidos mostraram que houve um aumento de 10% para 12% de gemas estabelecidas nas concentrações de 0,0 e 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃, respectivamente, embora tenha sido observada relação inversamente proporcional à concentração de GA₃, pois percebe-se claramente que o aumento da concentração de GA₃ ocasionou diminuição gradativa para tal ocorrência (Figura 6).

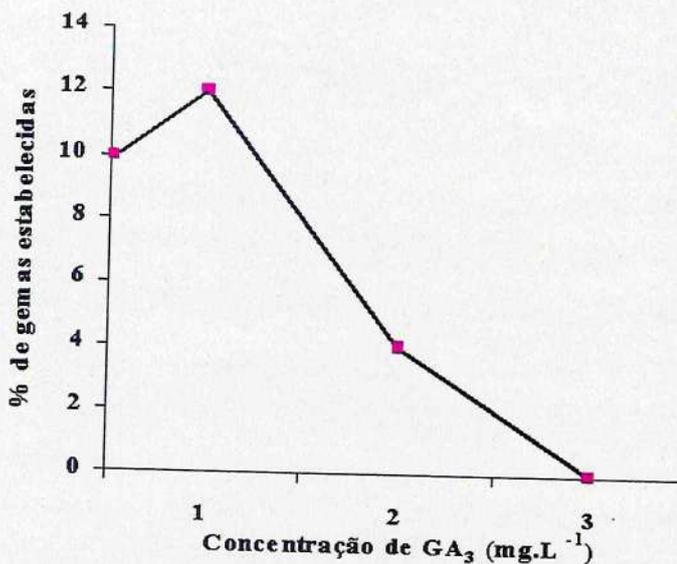


FIGURA 6 - Efeitos da concentração de GA₃ no estabelecimento de gemas axilares de curauá. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Dentre os tratamentos utilizando GA₃, em associação com BAP a 4,5 mg.L⁻¹ observou-se maior taxa (12%) de estabelecimento de gemas axilares com a utilização da concentração de 1,0 mg.L⁻¹; na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ ocorreu 4% de estabelecimento; enquanto que com 3,0 mg.L⁻¹ não ocorreu estabelecimento. Provavelmente, o GA₃ em concentração mais elevada, tende a inibir o processo de estabelecimento das gemas quando associado a uma citocinina. Matsumoto (2000) ressalta que há casos em que as giberelinas estimulam os efeitos de citocininas.

De uma maneira geral, a proporção de gemas estabelecidas foi heterogênea para os cinco tratamentos utilizados, com destaque para o meio de cultura MS acrescido de 4,5 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 7). O período de estabelecimento de gemas axilares (Figura 8) iniciou-se no 3º dia com 27 gemas, aumentando para 80 no 6º dia, diminuindo para 55 no 13º dia em virtude de oxidação e contaminação e assim sucessivamente; 51 gemas no 16º dia, 48 gemas no 21º dia, 41 gemas no 24º dia e 31 gemas no 30º dia. Embora a contaminação e oxidação não tenham sido analisadas, foram ocorrências observadas em todos os tratamentos durante a coleta de dados. Neste tratamento observou-se a emissão de brotos a partir do 21º dia, enquanto que nos demais tratamentos, tal ocorrência foi observada aos 30 dias.



FIGURA 7 - Gema de curauá aos 15 dias estabelecida em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

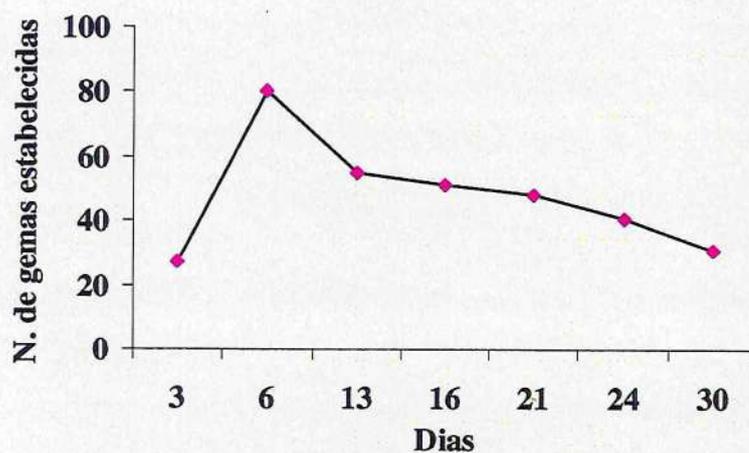


FIGURA 8 - Número de gemas axilares de curauá estabelecidas no meio cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP ao longo de 30 dias. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

As respostas fisiológicas das gemas axilares de curauá em meio de cultura MS suplementado com BAP a 4,5 mg.L⁻¹ aceleraram o processo de estabelecimento, resultando em explantes meristemáticos assépticos, o que tornou evidente a potencialidade da espécie para o processo inicial de micropropagação.

2.5 CONCLUSÕES

2.5.1 Obtenção de gemas assépticas

- Gemas axilares de curauá advindas de plantas-matrizes do campo, desinfestadas em NaOCl a 2%, aos 10 e 15 minutos e ausência de álcool, apresentam a menor taxa de contaminação.
- A assepsia de gemas de curauá em álcool a 70% por 5 minutos, seguido de NaOCl a 2% por 15 minutos, proporciona menor percentual de oxidação.
- O menor percentual de tecidos mortos em gemas de curauá é obtido com NaOCl a 2% por 10 minutos.

2.5.2 Estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá

- A adição de GA₃ em meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP nas concentrações testadas é dispensável para estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de curauá.
- A adição de 4,5 mg.L⁻¹ de BAP em meio de cultura MS, no cultivo inicial de gemas axilares de curauá tem papel importante no estabelecimento.
- O cultivo inicial por sete dias de gemas axilares de curauá em meio de cultura ½ MS, e posteriormente para meio de cultura MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP permite às gemas, maior percentagem de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, W.A.B de. Efeito da benzilaminopurina (BAP) nas diferentes fases da propagação “*in vitro*” do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merri.). 1994. 69 p. Dissertação (Mestrado) Escola de Agronomia - Cruz das Almas-BA, 1994.
- ALMEIDA, W.A.B de.; MATOS, A.P.; SOUSA, A.S. Efeito da benzilaminopurina (BAP) na diferenciação de gemas axilares do abacaxizeiro. *Magistra*, V.7, p.37,1995.
- ALMEIDA, W.A.B de. et al. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP, V.24, n.2, p.296-300, 2002.
- DONATO, V.M.T. et al. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas “*in vitro*” com diferentes fontes de nitrogênio. *Scientia Agricola*, V.56, n.4, p.289-1292, 1999.
- FEUSER, S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, V.23, n.1, p.006 – 010, 2001.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.1998. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ª.ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação,1998, V.1. 509 p.
- GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília-DF V.34. n.9, p.1557-1563. 1999.
- LAMEIRA, O.A. et al. *Cultura de Tecidos (Manual)*: EMBRAPA. Documentos n.66. 41 p, Belém, 2000.
- LEMOES, O.F. de. Mutagênese e Tecnologia “*in vitro*” no Melhoramento Genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). 2003. 159 p. Tese (Doutorado em Agronomia) ESALQ, Piracicaba-SP, 2003.
- MATSUMOTO, K. In: CID, L.P.B. *Introdução aos hormônios vegetais*. Brasília-DF: EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 180 p.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.A. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962, V.15, p.473-497.
- PESCADOR, R.; KOLLER, O.C. Propagação “*in vitro*” do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. *Revista Brasileira de Fruticultura*, V.14, n.2, p.1-4, Cruz das Almas-BA, 1992.
- PIZA, M. de T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. *Revista Ceres*, V.48, n.280, p.681-690, 2001.

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

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1^a.ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, 1998, V.1. 509 p.

ULISSES, C. et al. Seleção "*in vitro*" de gemas de bananeira 'Nanicão' tolerantes à salinidade. Scientia Agricola, V.57, n.4, p.667-670, 2000.

WEBER, O.B.; et al. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiro Cayenne Champac em diferentes substratos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília-DF, V.38, n.6, p.689-696, 2003.

CAPÍTULO 3 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP (6-BENZILAMINOPURINA) NA INDUÇÃO DE BROTOS "IN VITRO" DE CURAUÁ
(*Ananas erectifolius* L.B. Smith)

3.1. RESUMO

O trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de brotos de curauá, a partir de segmentos caulinares de 4,0 cm provenientes de plantas cultivadas "in vitro". Três explantes, dos quais foram retirados os excessos foliares e a gema apical, foram inoculados em frascos contendo 15 mL de meio de cultura MS líquido suplementado com 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mg.L⁻¹ de BAP, totalizando quatro tratamentos. Para cada tratamento foram utilizados 30 explantes, constituindo cento e vinte no total. Foram realizadas avaliações aos 60, 75 e 90 dias observando o número de brotos ≥ 0,5 cm, após os quais, foi observado que o tempo para indução de brotos de curauá ocorreu de maneira eficiente até aos 90 dias, o maior número de indução de brotos ocorreu na presença de 3,0 mg.L⁻¹ de BAP e que BAP acima de 3,0 mg.L⁻¹ reduziu a taxa de indução de brotos de curauá.

ABSTRACT

The research objectified to evaluate the effect of different BAP concentrations in the curaua shoots induction of stem segments of 4,0 cm proceeding of in vitro cultivated plants. Three explants, of which had been removed the leaf excesses and the apical bud, had been inoculated in bottles contends 15 mL of culture medium MS in liquid state supplemented with 3,0; 3,5; 4,0 and 4,5 mg.L⁻¹ of BAP, totalizing four treatments. For each treatment had been used 30 explants, constituting one hundred and twenty in the total. Evaluations to 60, 75 and 90 days had been carried through, observing the shoots number ≥ 0,5 cm, after which, was observed that the the time for induction of curaua shoots occurred in efficient way until the 90 days, the biggest number of shoots induction occurred in the presence of 3,0 mg.L⁻¹ of BAP and that BAP above of 3,0 mg.L⁻¹ reduced the tax of curaua shoots induction

3.2 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da fase de multiplicação é produzir o maior número de plantas possível no menor espaço de tempo. Além das altas taxas de multiplicação são essenciais a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

As citocininas têm como principal função a divisão celular e de acordo com Cid (2000), sua utilização para multibrotação de gemas axilares ou apicais de plantas lenhosas ou herbáceas é de elevada importância.

Os reguladores de crescimento podem ser utilizados isoladamente como relatado por Barboza e Caldas (2001) que utilizaram BAP para regeneração de brotos estiolados de abacaxizeiro ou em associação com outros reguladores de crescimento, como ANA, proposto eficientemente por Guerra et al. (1999) para multibrotação das cultivares de abacaxizeiro 'Primavera' e 'Perolera' e por Lemos et al. (1998) ao pesquisar a mesma espécie utilizando a cultivar 'Cabeça-de-onça'. Os autores observaram maior proliferação de brotos com a interação proporcionada entre os dois reguladores de crescimento supracitados.

Ao basear-se em citações de outros pesquisadores, Piza, Lima e Brasil (2001) reportam o fato de que o conjunto de dois ou mais grupos de reguladores de crescimento, pode vir a maximizar a proliferação de brotos.

O trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP na indução de brotos de curauá, a partir de explantes provenientes de plantas cultivadas "*in vitro*" com a finalidade de aprimorar o processo de micropropagação da espécie.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Os explantes foram obtidos de plantas cultivadas "*in vitro*", as quais apresentavam de 4 a 5 folhas, estimando-se uma gema a cada inserção foliar (Figura 9) e inoculados em meio de cultura MS líquido suplementado com BAP a 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5 mg.L⁻¹, em frascos de 200 mL com 15 mL de meio de cultura para cada tratamento. Em cada frasco foram inoculados três explantes constituídos de segmentos caulinares de 4,0 cm, dos quais foram retirados os excessos foliares e a gema apical com bisturis e pinças estéreis, constituindo trinta explantes por tratamento, totalizando cento e vinte. Os tratamentos

testados foram: MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP; MS + 3,5 mg.L⁻¹ de BAP; MS + 4,0 mg.L⁻¹ de BAP e MS + 4,5 mg.L⁻¹ de BAP.

Os procedimentos de inoculação de explantes e armazenamento dos cultivos em sala de crescimento foram os mesmos adotados nos experimentos anteriores. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com medidas repetidas em relação ao tempo; foram utilizados quatro tratamentos e cinco repetições, onde cada repetição foi constituída por dois frascos, totalizando 10 unidades experimentais por tratamento.

Os dados corresponderam ao número de brotos $\geq 0,5$ cm de comprimento aos 60, 75 e 90 dias. A cada avaliação extraíram-se as médias de indução dos brotos por repetição, as quais foram submetidas, sem transformação, à análise de variância, ao teste de 'Tukey' para comparação de médias em função do tempo e da concentração de BAP e de regressão para avaliar a capacidade regenerativa dos brotos em função da concentração de BAP.



FIGURA 9 - Plantas assépticas doadoras de explantes. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às médias de indução de brotos de curauá em função do tempo destinado às avaliações e da concentração de BAP foram obtidos ao longo de 90 dias. De acordo com análise de variância (Tabela 6), foram observadas diferenças altamente significantes entre os quatro tratamentos testados em relação ao tempo ($F=83,07$; $p<0,001$) e concentração de BAP ($F=5,64$; $p=0,008$). O coeficiente de variação obtido, 11,63%, indica que houve um controle adequado das condições experimentais. As médias de indução de

brotos foram submetidas ao teste de 'Tukey', foram observadas diferenças entre todos os tratamentos em relação ao tempo destinado às avaliações e em função da concentração de BAP foi observada diferença entre os tratamentos que utilizaram 3,0 mg.L⁻¹ e 4,5 mg.L⁻¹. Aos 60 dias, a média de indução de brotos obtida por repetição foi de 22,08; aos 75 dias houve um crescimento para 31,53 e ao final de 90 dias, foi observada a média de 35,93 brotos. Em relação à concentração de 3,0 mg.L⁻¹ de BAP foi obtida média de indução de brotos igual a 36,67, média de 30,10 com 3,5 mg.L⁻¹ de BAP; 29,13 com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP e com 4,5 mg.L⁻¹ de BAP obteve-se a menor média de indução de brotos (23,47) (Tabela 7). Os resultados foram submetidos à análise de regressão (Figura 10).

TABELA 6 - Resumo da Análise de Variância para média de indução de brotos de curauá em função das concentrações de BAP e tempo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Fonte de variação	GL	S. Q.	Q. M.	F	PR > F
Concentração de BAP	3	1318,211	439,403	5,636	0,008 **
Resíduo (A)	16	1247,269	77,954		
Tempo	2	2003,570	1001,785	83,067	0,000 **
BAP x Tempo	6	129,018	21,502	1,783	0,134 ^{ns}
Resíduo (B)	32	385,939	12,060		
Total	59	5084,007			

Média geral : 29,84

C. V (%) : 11,63

** , ns - altamente significante e não significante, (P < 0,01; P > 0,05), respectivamente pelo teste F

TABELA 7 - Médias de indução de brotos de curauá por repetição cultivados em meio de cultura MS em diferentes concentrações de BAP e intervalos de tempo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Tempo (dias)	Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)				Média Total
	3,0	3,5	4,0	4,5	
	Média de número de brotos				
60	30,40	20,10	20,90	16,90	22,08 a
75	39,12	33,30	31,10	22,60	31,53 b
90	40,50	36,90	35,40	30,90	35,93 c
Total global	36,67 a	30,10 ab	29,13 ab	23,47 b	29,84

* médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de 'Tukey'

Houve uma tendência no aumento da média de indução de brotos entre os 60 e 90 dias, demonstrando ser nesse trabalho, o período em torno de 90 dias, como a fase máxima de proliferação de brotos de curauá; Rios (2002) obteve maior taxa de proliferação de brotos de curauá em meio de cultura MS líquido acrescido de BAP aos 90 dias. Guerra et al. (1999) ressaltam a importância de se compatibilizar o tempo de cultivo e a taxa de proliferação de brotos que associados a outros fatores contribuem para um processo de micropropagação bem sucedido. Estes autores obtiveram maior taxa de produção de brotos de abacaxizeiro, cultivar 'Perolera' em meio de cultura MS líquido, após um período de cultivo de 49 dias.

A espécie e o tipo de explante respondem de formas diferentes à ação dos diversos tipos de reguladores utilizados em culturas "*in vitro*" (PIZA, LIMA E BRASIL, 2001), de acordo com Rogalski, Guerra e Silva (2003) para o uso prático da micropropagação é necessário otimizar as condições de cultura para cada espécie e/ou variedade.

Efetuu-se a análise de regressão para média de indução de brotos de curauá em função da concentração de BAP, conforme Guerra et al. (1999) o modelo linear foi o mais adequado para explicar a taxa média de desenvolvimento dos brotos (Figura 10).

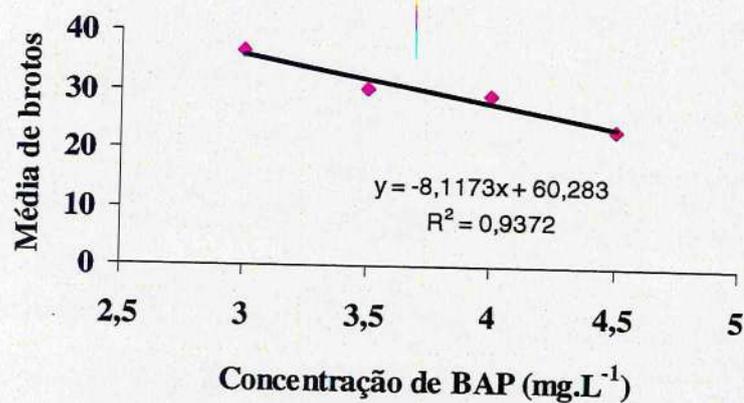


FIGURA 10 - Efeito de diferentes concentrações (mg.L⁻¹) de BAP na média de indução de brotos de curauá em meio de cultura MS líquido. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

Pode-se observar (Figura 10) que a linha de regressão mostrou tendência linear decrescente; à medida que se aumentou a concentração de BAP, diminuiu a emissão de brotos, indicando que ocorreu uma inibição, e que provavelmente em concentrações menores poderia ocorrer maior emissão de brotos. O tratamento com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP foi o mais eficiente com média de 36,67 brotos/repetição, correspondendo a aproximadamente 12,22

brotos/explante ($\geq 0,5$ cm), similar ao obtido por Guerra et al. (1999) com média de 14,1 brotos/explante para abacaxizeiro cultivar 'Primavera' e 'Perolera' em meio de cultura MS líquido, suplementado com ANA e BAP. Rios (2002) obteve média de 19,88 brotos/explante de curauá em meio de cultura MS líquido suplementado com $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

O uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas até determinada concentração, mas seu excesso é tóxico (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998); os mesmos autores citam a vitrificação, como um dos sintomas que mais caracteriza a toxidez (CORDEIRO, 2002), tal sintoma é conceituado por Pasqual et al. (1991) como o aspecto brilhante ou vítreo apresentado por algumas plantas obtidas "*in vitro*", embora não tenha sido observado neste trabalho.

Os resultados deste trabalho contrariam os obtidos por Rios (2002) que observou em brotos de curauá em meio de cultura MS líquido maior proliferação à medida que se aumentou a concentração deste regulador de crescimento, obtendo maior produtividade para o uso de BAP na concentração de $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$; é provável que o genótipo da planta tenha interferido diretamente nesta divergência de resultados, pois conforme Harbage e Stimart³ (1996 citados por PEDROTTI E VOLTOLINI, 2001), o genótipo determina diferentes respostas nos diferentes estágios da micropropagação; além da idade e atividade fisiológica da planta-matriz.

Alguns autores citam que o explante não deve ser submetido a muitos subcultivos, pois entre outras conseqüências pode ocorrer alteração celular a nível nuclear, comprometendo a citocinese, o que pode vir a causar modificações da capacidade regenerativa da planta e, por conseguinte, variação somaclonal.

Altas concentrações de BAP foram também utilizadas com sucesso por Marciani-Bendezu, Pinto e Pasqual (1990) para proliferação de brotos de abacaxizeiro cultivar 'Smooth Cayenne' em meio de cultura MS solidificado com ágar a 0,6%, suplementado com $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. A utilização de baixas concentrações de BAP em algumas espécies apresentou resultados satisfatórios como descrito por Braga et al. (2003) que obtiveram maiores taxas de multiplicação de brotos de *Ananas bracteatus* em meio de cultura MS acrescido de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

³ HARBAGE, J.F; STIMAT, D.P. Effect of pH and ¹H-indol-3 butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, V.121, n.6, p.1049-1053, 1996.

Através de observação visual é possível identificar que o tratamento com meio de cultura MS suplementado com 3,0 mg.L⁻¹ de BAP proporcionou maior desenvolvimento dos brotos em comprimento (Figura 11 A), todavia não foi realizada análise estatística para esta variável de resposta.



FIGURA 11 - Brotos de curauá aos 90 dias em meio de cultura MS líquido suplementado com BAP a 3,0 (A), 3,5 (B), 4,0 (C) e 4,5 mg.L⁻¹ (D), respectivamente. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2003.

3.5. CONCLUSÕES

- O tempo para indução de brotos de curauá ocorre de maneira eficiente até aos 90 dias.
- O maior número de indução de brotos ocorre na presença de 3,0 mg.L⁻¹ de BAP.
- BAP acima de 3,0 mg.L⁻¹ reduz a taxa de indução de brotos de curauá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. V.36, n.3, 2001.
- BRAGA, E.P. et al. Avaliação dos efeitos do número de explantes, do meio de cultura e do fotoperíodo na multiplicação “*in vitro*” de abacaxi ornamental (*Ananas bracteatus*). In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e plantas Ornamentais/I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de plantas. 2003, Lavras-MG. Anais, 2003, p.312.
- CID, L.P.B. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília-DF: EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 180 p.
- CORDEIRO, I.M.C.C. et al. Micropropagação de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, ano V, n.29, p.78-81, 2002.
- GUERRA, M.P et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília-DF, V.34, n.9, p.557-1563, 1999.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª. ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, 1998. V.1. 509 p.
- LEMONS, O. F. de. et al. Efeito de reguladores de crescimento na multiplicação “*in vitro*” de brotos de abacaxizeiro. Boletim de Pesquisa, Belém-PA, Embrapa-CPATU, n.204, 1998, 14 p.
- MARCIANI-BENDEZU, J.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas “*in vitro*”. Revista Brasileira de Fruticultura. Cruz das Almas-BA, V.12, n.1, p.35-39, 1990.
- PASQUAL, M.; et al. Influência de 6-Benzilaminopurina, sacarose e ágar sobre a vitrificação de brotos de pereira “*in vitro*”. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília-DF, V.26, p.1919-1924, 1991.
- PEDROTTI, E.L; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento “*ex vitro*” e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. Revista Brasileira de Fruticultura, V.23. n.2, p.234-239. 2001.
- PIZA, M. de T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. Revista Ceres, V.48, n.280, p.681-690, 2001.

RIOS, M.S. Multiplicação de Plantas de Curauá (*Ananas erectifolius*) Através de Técnicas de Cultura de Tecidos. 2002. 12 p. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2002.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L da. Multiplicação “*in vitro*” da ameixeira 'Santa Rosa': efeito da citocinina BAP. Revista Brasileira de Fruticultura, V.25, n.2, p.365-367, 2003.

CAPÍTULO 4 CRESCIMENTO DE BROTOS DE CURAUÁ “*IN VITRO*” E ACLIMATIZAÇÃO

4.1. RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência dos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos, sem regulador de crescimento, no crescimento, multibrotação e emissão de raízes de brotos de curauá, bem como, o efeito de substratos no crescimento de mudas de curauá. Para o crescimento foram utilizados como explantes, tufos de curauá constituídos por cinco brotos sem a presença de raízes e obtidos assepticamente, os quais foram inoculados individualmente nos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos. Após 35 dias, foi observado que ambos os meios de cultura podem ser utilizados para o crescimento de brotos de curauá; durante a fase de crescimento e enraizamento houve indução de novos brotos, principalmente, em meio de cultura MS; o meio de cultura MS foi o mais favorável à indução de raízes nos brotos do que o meio de cultura ½ MS. Para aclimatização, foram utilizadas cento e vinte plantas de curauá com aproximadamente 9,0 cm de comprimento, enraizadas, provenientes de meio de cultura MS, foram transferidas para cinco bandejas plásticas descartáveis, constituídas por 24 células. Cada bandeja correspondeu a um tratamento de substrato, assim distribuídos: pó de coco; pó de coco + cama de galinha; fibra de coco; pó de coco + esterco bovino e fibra de coco + pó de coco. A combinação de substratos correspondeu à proporção volumétrica de 1:1. Através de avaliações quinzenais ao longo de 60 dias foi observado que o substrato pó de coco + fibra de coco na proporção volumétrica de 1:1 foi o mais eficiente na aclimatização de plantas de curauá obtidas “*in vitro*”; o tempo adequado para crescimento das plantas de curauá em bandeja foi estatisticamente previsto para 65 dias de cultivo e todos os substratos utilizados permitiram 100% de sobrevivência das plantas de curauá aclimatizadas originadas “*in vitro*” para formação de mudas.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the influence of the culture mediums MS and ½ MS, liquids, without growth regulator, in the growth, shoots multiplication and roots emission of curaua shoots, as well as, the substrates effect in the growth of curaua plants. For the growth had been used as explants, of curaua tufts constituted by five shoots without the presence of roots and gotten aseptically, which had been inoculated, individually in the culture mediums MS and ½ MS, liquids. After 35 days, it was observed that both the culture medium can be used for the growth of curaua shoots; during the phase of growth and rooting it had induction of new shoots, mainly, in culture medium MS; the culture medium MS was most favorable to the induction of roots in the shoots of that the culture medium ½ MS. For acclimatization had been used one hundred and twenty curaua plants with approximately 9,0 cm of length, roots taken, proceeding from culture medium MS, had been transferred to five dismissable plastic trays, constituted of 24 cells. Each tray corresponded to a substrate treatment, thus distributed: coconut dust; coconut dust + hen bed; coconut fiber; coconut dust + bovine manure and fiber of coconut + coconut dust. The substrate combination corresponded to the volumetric ratio of 1:1. Through biweekly evaluations throughout 60 days was observed that the substrate coconut dust + coconut fiber in the volumetric ratio of 1:1 it was most efficient in the acclimatization of curaua plants gotten *in vitro*; the time adjusted for growth of curaua plants in tray was statisticly foreseen for 65 days of culture and all the used substrates had allowed 100% of survival of the acclimatized curaua plants originated *in vitro* for formation of plants.

4.2 INTRODUÇÃO

A etapa subsequente à multiplicação corresponde ao crescimento dos brotos e de acordo com Grattapaglia e Machado (1998) pode-se observar também nesta etapa a formação de raízes adventícias nas partes aéreas dos explantes. Os mesmos autores comentam que o enraizamento de espécies herbáceas é geralmente fácil.

Algumas espécies necessitam neste estágio de reguladores de crescimento como suplemento ao meio de cultura, enquanto que em outras, tal suplemento é desnecessário, observando-se o mesmo em relação à etapa de enraizamento.

Em pesquisas com abacaxizeiro micropropagado, Piza, Lima e Brasil (2001) verificaram o efeito benéfico da interação de BAP e ANA para o crescimento de brotos; ressalta-se que o uso de giberelinas é mais freqüentemente relatado em pesquisas sobre alongamento de brotos, pois um dos efeitos fisiológicos básicos da giberelina exógena em planta é a aceleração do crescimento caulinar (MATSUMOTO, 2000).

Em estudos com curauá, Lameira et al (2000) relatam que esta espécie pode alongar-se sem a necessidade de reguladores de crescimento, sendo o mesmo observado na fase de enraizamento. Grattapaglia e Machado (1998) comentam que os tipos e concentrações de auxinas são os fatores que em geral mais influenciam o enraizamento; estes mesmos autores explicam que meios líquidos tendem a estimular a formação de um sistema radicular mais completo.

Após obtenção da planta completa (parte aérea + raiz) ocorre o transplântio (embora para algumas espécies seja mais viável a emissão de raízes “*ex vitro*”) que envolve a transferência da planta da condição “*in vitro*” para casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimatização e endurecimento (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998), adaptando-se às condições ambientais de cultivo (FAUTH et al., 1994), com o uso de substratos mineral-orgânicos apropriados (USBERTI FILHO et al., 1995).

Alta taxa de sobrevivência, obtida em plantas aclimatizadas “*ex vitro*”, depende do correto tratamento providenciado durante o processo da transição “*in vitro*” para “*in vivo*” (CALVETE, KAMPF E SUZIN, 2002).

Os substratos são utilizados isoladamente ou em diversas combinações, como demonstram as pesquisas desenvolvidas por Guerra et al. (1999) e Weber et al. (2003) para aclimatização de plantas de abacaxizeiro obtidas “*in vitro*”. Processo completo de

micropropagação de curauá envolvendo desde a fase inicial até a aclimatização de plantas e cultivo no campo em escala comercial foi obtido por Lameira, Reis e Cordeiro (2003).

Quatro funções básicas são atribuídas aos substratos: propiciar suporte ou ancoragem para a planta; proporcionar suficiente porosidade de modo a permitir o ingresso de oxigênio e o escape de gás carbônico e etileno produzidos durante a respiração das raízes; propiciar alguma reserva de água para as plantas e suprir a planta com nutrientes (TAVEIRA, 1996).

Algumas espécies necessitam de autoclavagem prévia do substrato, contudo, Guerra e Nodari (2003) comentam que para abacaxizeiros obtidos "*in vitro*" este procedimento é dispensável. Uma vez retiradas as plantas das condições "*in vitro*", após cerca de 30 dias, as mudas podem ser comercializadas em bandejas utilizadas para aclimatização.

O trabalho teve como objetivos avaliar a influência dos meios de cultura MS e ½ MS líquidos, sem regulador de crescimento para crescimento, multibrotação e emissão de raízes de brotos de curauá assépticos e avaliar o efeito de diferentes tipos de substratos na fase de aclimatização.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Crescimento de brotos de curauá "*in vitro*"

O experimento foi conduzido no Laboratório Bionorte - Tecnologia de Plantas em Benevides-PA. Os explantes utilizados foram tufo de curauá constituídos por cinco brotos sem a presença de raízes e obtidos assepticamente, os quais foram inoculados nos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos. Para cada frasco de 200 mL foram distribuídos 10 mL de meio de cultura, a metodologia para inoculação e condições de cultivo dos explantes foram as mesmas adotadas nos experimentos anteriores. Extraiu-se a média de tamanho dos brotos por tufo para cada frasco no momento da instalação do experimento, utilizando-se como referência o broto de maior comprimento e o broto de comprimento intermediário entre o maior e o menor.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e quinze repetições, totalizando 30 unidades experimentais, onde cada tratamento constou de quinze frascos com um tufo de brotos cada.

Os dados foram coletados na montagem do experimento e após 35 dias. Para análise de variância da variável de resposta, média de comprimento de brotos não foi utilizado transformação; para a variável de resposta, média de brotos $\geq 0,5$ cm de comprimento por repetição foi utilizado $\sqrt{x + 0,5}$, onde x corresponde ao número de brotos; para a variável de resposta, emissão de raízes, utilizou-se o percentual.

4.3.2 Aclimatização de plantas de curauá obtidas “*in vitro*”

O experimento foi conduzido no Laboratório Bionorte, Benevides-PA. Cento e vinte plantas de curauá com aproximadamente 9,0 cm de comprimento, enraizadas, provenientes de meio de cultura MS foram transferidas para 5 bandejas plásticas descartáveis de 36 cm x 27 cm constituídas por 24 células de 6,0 cm x por 4,0 cm, cada, distribuídas em 6 fileiras verticais com 4 células. Em cada célula apresentando 4 orifícios no fundo para drenagem da água foi inserida uma planta, totalizando 24 por tratamento. Cada bandeja correspondeu a um tratamento de substrato, assim distribuídos: pó de coco; pó de coco + cama de galinha; fibra de coco; pó de coco + esterco bovino e fibra de coco + pó de coco. A combinação de substratos correspondeu à proporção volumétrica de 1:1.

As plantas apresentando raízes, após retiradas dos frascos foram abundante e cuidadosamente lavadas com água corrente para retirar o resíduo do meio de cultura MS, transplantadas para as bandejas com os respectivos substratos predeterminados e armazenadas de forma a ficarem suspensas do solo por aproximadamente 50,0 cm em ambiente de telado, sob nebulização.

Através de avaliações quinzenais ao longo de sessenta dias extraiu-se o comprimento das plantas, a partir da porção basal em contato com o substrato até o ápice da folha de maior comprimento, considerou-se a 1ª. fileira por bandeja como parcela amostral. A variável de resposta, sobrevivência de mudas foi avaliada aos 60 dias atribuindo-se o percentual.

O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, constituindo cinco unidades experimentais, cada unidade experimental constituiu-se de 24 células por bandeja, onde cada parcela foi formada por quatro células contendo uma planta cada. Os dados foram submetidos à análise de variância, ao teste T para comparação de médias e à análise de regressão, esta em função do tempo.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Crescimento de brotos de curauá “*in vitro*”

Através de análise de variância, foi observado (Tabelas 8 e 9) para média de comprimento de brotos que não houve diferença significativa em função dos meios de cultura estudados (Teste $F=1,53$; $p=0,227$), sendo obtidas as médias de 2,82 e 3,15 cm, respectivamente, para meio de cultura MS e meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (Figura 12). Contudo, em relação ao tempo de observação, houve um aumento altamente significativo (Teste $F=67,40$; $p<0,001$), entre o início e o final do experimento, sendo obtidas as médias de 2,61 e 3,37 cm, respectivamente, confirmando os resultados obtidos por Lameira, Reis e Cordeiro (2003) em suas pesquisas com curauá, que obtiveram bons resultados para o crescimento desta espécie em meio de cultura MS, sem regulador de crescimento, da mesma forma que Lemos et al. (1998), que utilizaram meio de cultura MS para crescimento e enraizamento (sem regulador de crescimento) de brotos de abacaxizeiro, resultando em plantas com características morfológicas e genéticas semelhantes às plantas-matrizes. É provável que este desempenho seja característico do gênero. O coeficiente de variação obtido de 12,00 % indica que o experimento apresentou controle adequado.

TABELA 8 - Resumo da Análise de Variância para média de comprimento de brotos de curauá em função dos meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS líquidos, ao longo de 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

Fonte de variação	GL	S.Q.	Q. M.	F	PR > F
Tratamentos	1	1,584	1,584	1,527	0,227 ^{ns}
Resíduo (A)	28	29,063	1,037		
Tempo	1	8,626	8,626	67,390	0,000 ^{**}
Trat. x Tempo	1	0,051	0,051	0,398	0,534 ^{ns}
Resíduo (B)	28	3,604	0,128		
Total	59	42,928			

Média geral: 2,99 cm

C. V (%): 12,00

^{**}, ns - altamente significativa e não significativa, ($P < 0,01$; $P > 0,05$), respectivamente pelo teste F

TABELA 9 - Médias de comprimento e de brotos e emissão de raízes em brotos de curauá nos meios de cultura MS e ½ MS, líquidos ao longo de 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

Meio de cultura	Média de comprimento de brotos (cm)	Média de brotos/repetição	Emissão de raiz (%)
MS	2,82 a	10,22 a	66,6 a
½ MS	3,15 a	6,34 b	26,6 b

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste F.

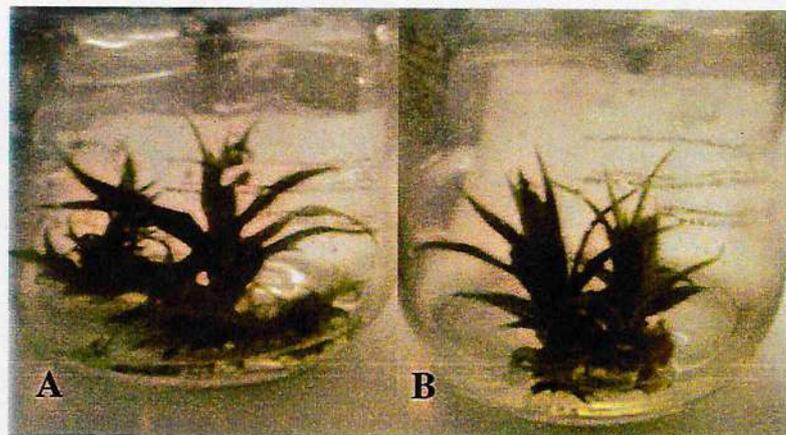


FIGURA 12 - Brotos de curauá em fase de crescimento nos meios de cultura MS (A) e ½ MS (B), líquidos, ao longo de 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

De acordo com análise de variância para a variável de resposta média de brotos $\geq 0,5$ cm de comprimento (Tabelas 9 e 10) foi observado diferença altamente significativa (teste $F=10,54$; $p=0,003$) com média de 10,22 e 6,34 brotos/repetição nos meios de cultura MS e ½ MS, respectivamente. É possível que tenha ocorrido efeito residual do BAP utilizado na fase de multiplicação, induzindo as plantas a emitirem novos brotos, nessa fase do cultivo “*in vitro*” (PIZA, LIMA E BRASIL, 2001). O coeficiente de variação obtido, 18,87 %, demonstra controle adequado das condições experimentais.

TABELA 10 - Resumo da Análise de Variância para média de brotos de curauá $\geq 0,5$ cm de comprimento em função dos meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS, líquidos após 35 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

Fonte de variação PR > F	GL	S.Q	Q.M.	F	
Tratamento	1	3,258	3,257	10,540	0,003**
Resíduo	28	8,644	0,309		
Total	29	11,902			

Média geral: 2,95

C. V (%): 18,87 %

** , altamente significativa ($P < 0,01$) pelo teste F.

A emissão de raízes foi observada em 66,6% dos tufos de brotos em meio de cultura MS e em 26,6% dos tufos inoculados em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 9). Da mesma forma, Almeida, Matos e Souza (1997, 1998) observaram em estudos com brotos de abacaxizeiro cultivares 'Primavera' e 'Pérola' que ocorreu enraizamento em meio de cultura MS sem acréscimo de reguladores de crescimento, enquanto que Santos et al. (2003) observaram que a frequência e comprimento dos sistemas radiculares "*in vitro*" foram significativamente maiores no meio de cultura MS, suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA para brotos de curauá. Piza, Lima e Brasil (2001) relatam que mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente as de crescimento de raízes.

A utilização da metade da concentração de sais do meio de cultura MS, segundo Grattapaglia e Machado (1998) têm na grande maioria das vezes, possibilitado melhor enraizamento. Embora tal observação tenha sido relatada com mais frequência quando ocorre em conjunto com a utilização de reguladores de crescimento, em abacaxizeiro (PIZA, LIMA E BRASIL, 2001) e Souza et al. (2003).

4.4.2 Aclimatização de plantas de curauá obtidas “*in vitro*”

Através de análise de variância foram observadas diferenças altamente significantes entre o comprimento das plantas de curauá ($F=7,62$; $p=0,001$) em função dos substratos estudados (Figura 13) e em relação ao comprimento das plantas ao longo do tempo decorrido para o crescimento ($F=37,25$; $p<0,001$), com média geral de 12,68 cm ao final de 60 dias. O coeficiente de variação obtido, 3,25%, revela rigoroso controle das condições experimentais (Tabela 11).

Na análise de regressão ocorreu a formação de uma semiparábola (Figura 14), através da qual mostrou-se evidente a proporcionalidade do comprimento das plantas em relação ao tempo, desse modo, é possível indicar que a média de comprimento das plantas de curauá alcançará o máximo em torno de 65 dias, quando a média geral deverá atingir 13,18 cm, mesmo considerando a exaustão gradativa de nutrientes dos substratos testados ao longo do período (FAUTH et al., 1994).

TABELA 11 - Resumo da Análise de Variância para comprimento das plantas de curauá em função dos diferentes substratos testados, ao longo de 60 dias de cultivo. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

Fonte de variação	GL	S.Q.	Q.M.	F	P>F
Substrato (S)	4	367,665	91,916	7,615	0,001**
Resíduo (A)	15	181,044	12,069		
Tempo (T)	3	18,887	6,295	37,248	0,000**
Subst. x Tempo	12	0,842	0,070	0,414	0,950 ^{ns}
Resíduo (B)	45	7,621	0,169		
Total	79	576,059			

Média geral: 12,68 cm

C. V (%): 3,25

** , ns - altamente significante e não significante, ($P < 0,01$; $P > 0,05$), respectivamente pelo teste F.



FIGURA 13 - Plantas de curauá aos 60 dias em ambiente de telado. Da esquerda para direita, os substratos correspondentes aos tratamentos: T1, T2, T3, T4 e T5. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

Onde: T1= pó de coco; T2 = pó de coco + cama de galinha; T3 = fibra de coco; T4 = pó de coco + esterco bovino e T5 = fibra de coco + pó de coco.

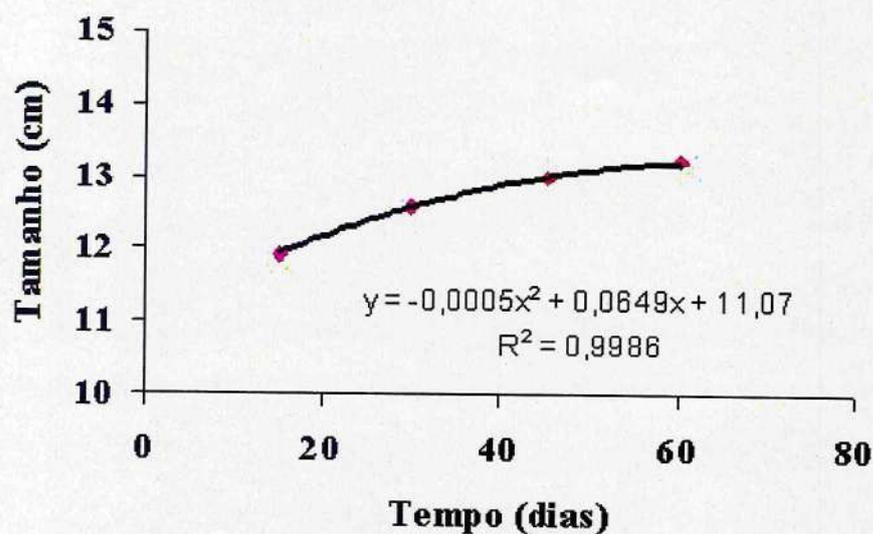


FIGURA 14 - Representação gráfica e equação de regressão para efeito do tempo aos 15, 30, 45 e 60 dias para comprimento de plantas de curauá nos substratos estudados. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

Alguns contrastes relevantes foram testados entre os substratos estudados após decorridos 60 dias (Tabela 12) para analisar as diferenças observadas.

TABELA 12 - Resultados da aplicação do teste T aos contrastes considerados relevantes entre os substratos estudados, para média de comprimento dos brotos de curauá aos 60 dias. Bionorte, Benevides-PA, 2004.

CONTRASTES	SUBSTRATOS					Valor do Contraste	Teste T (p)
	Média de comprimento dos brotos aos 60 dias - (cm)						
	PC	PC+CG	FC	PC+EB	FC+PC		
	12,95	13,08	14,05	9,70	16,28		
PC * FC	-1		+1			1,05	0,437 ^{ns}
PC * FC+PC	-1				+1	3,18	0,031*
PC * PC+CG * PC+EB	-2	+1		+1		-3,34	0,183 ^{ns}
PC+CG * PC+EB		+1		-1		2,56	0,002**

Tratamentos: PC; PC + CG; FC, PC + EB; PC + FC

Onde: PC= pó de coco; FC= fibra de coco; CG= cama de galinha; EB= esterco bovino

*, ns - significativo e não significativo ($P < 0,05$ e $P > 0,05$), ** - altamente significativo ($P < 0,01$), respectivamente pelo teste T.

Ao serem analisados os substratos pó de coco e fibra de coco nos tratamentos em que foram utilizados, isoladamente, não foi observado diferença significativa, contudo, ao analisar os tratamentos pó de coco e pó de coco + fibra de coco em relação à adição da fibra ao pó, a diferença foi significativa, aumentando consideravelmente o crescimento das plantas, confirmando os comentários de Souza (2001) de acordo com o qual, os substratos alternativos de origem vegetal têm sido recomendados para a produção de mudas. Para análise entre os tratamentos: pó de coco; pó de coco + cama de galinha e pó de coco + esterco bovino não houve diferença significativa, optando-se pelo uso isolado do primeiro substrato. A comparação entre os tratamentos pó de coco + cama de galinha e pó de coco + esterco bovino apresentou diferença altamente significativa em favor do tratamento pó de coco + cama de galinha.

De um modo geral, os substratos testados expressaram diferença significativa por ação dos tratamentos, revelando uma capacidade diferente de imprimir crescimento às plantas.

Ao final do experimento, foi observada a taxa de 100% de sobrevivência de mudas, resultado similar foi obtido por Guerra et al. (1999) que obtiveram taxa de 95,5% de mudas de abacaxizeiro sobreviventes após aclimatização em substrato, composto de casca de arroz

carbonizada e solo arenoso. Enquanto que Fauth et al. (1994) obtiveram 80,34% de plantas de abacaxizeiro sobreviventes à aclimatização aos 57 dias em diferentes combinações dos substratos: solo, xaxim, turfa, vermiculita, esterco bovino, areia e húmus.

4.5 CONCLUSÕES

4.5.1 Crescimento de brotos de curauá “*in vitro*”

- Os meios de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS, líquidos podem ser utilizados para o crescimento de brotos de curauá.
- Durante a fase de crescimento e enraizamento de brotos há indução de novos brotos, principalmente, em meio de cultura MS
- O meio de cultura MS é mais favorável à indução de raízes nos brotos do que o meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS.

4.5.2 Aclimatização de plantas de curauá obtidas “*in vitro*”

- O substrato pó de coco + fibra de coco na proporção volumétrica de 1:1 é o mais eficiente na aclimatização de plantas de curauá obtidas “*in vitro*”.
- O tempo adequado para crescimento das plantas de curauá em bandeja é de 65 dias de cultivo.
- Todos os substratos utilizados permitem 100% de sobrevivência das plantas de curauá aclimatizadas originadas “*in vitro*” para formação de mudas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, W.A.B. de; MATOS, A.P.; SOUZA, A. da S. Influência da benzilaminopurina (BAP) no desenvolvimento de plântulas do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivadas "in vitro". 1997/98. Magistra. Cruz das Almas-BA, V.2. n.10. p.55-63.
- CALVETE, E.O., KAMPF, A. N. e SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento "in vitro" de morangueiro. Horticult. Bras., V.20, n.2, p.186-191, 2002.
- FAUTH, A. et al. Aclimatização de mudas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) resistentes à fusariose, cultivadas "in vitro". 1994. Revista Brasileira de Fruticultura. Cruz das Almas-BA, V.16, n.2, p.7-12.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. 1ª. ed. Brasília-DF: CBAB EMBRAPA. Serviço de Produção de Informação, 1998. V.1, 509 p.
- GUERRA, M.P.; et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. 1999. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília-DF, V.34, n.9 p.1557-1563.
- GUERRA, M.P. e NODARI, R.O. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS E MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS. FIT/CCA/UFSC. Disponível em: <http://www.marceloventuri.hpg.ig.com.br/agronomia/bloco8/ApCTBiot.doc>. Acesso em 12 dez. de 2003.
- LAMEIRA, O. A. et al. Cultura de Tecidos (Manual): EMBRAPA. Documentos n.66. 41 p, Belém, 2000.
- LAMEIRA, O. A., REIS, I.N.R. de S.; CORDEIRO, I.M.C.C. Otimização da Propagação "in vitro" de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith). Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento, ano VI, n.30, p.78-81, 2003.
- LEMOS, O. F. de. et al. Efeito de reguladores de crescimento na multiplicação "in vitro" de brotos de abacaxizeiro. Boletim de Pesquisa, Belém-PA, Embrapa-CPATU, n.204, 1998, 14 p.
- MATSUMOTO, K. In: CID, L.P.B. Introdução aos hormônios vegetais. Brasília-DF: EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 180 p.
- PIZA, M. de T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. 2001. Revista Ceres, V.48, n.280, p.681-690.
- SANTOS, A.S.A. et al. Micropropagação "in vitro" de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith). In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e plantas Ornamentais/I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de plantas. 2003, Lavras-MG. Anais, 2003, p.243.

SOUZA, F.X. de. Materiais para formulação de substratos na produção de mudas e no cultivo de plantas envasadas. Documentos, Fortaleza-CE, Embrapa-CNPAT, 2001. 21p.

SOUZA, A. da S. et al. Otimização de fatores para micropropagação massal do abacaxizeiro híbrido PE x SC-60 mediante o estiolamento de plantas. In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e plantas Ornamentais/I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de plantas. 2003, Lavras-MG. Anais, 2003, p.99.

TAVEIRA, J.A. Boletim Ibraflor Informativo. 1996. n.13. Plântula Consultoria.

USBERTI FILHO, J.A.; et al. Inheritance of leaf spiness and segregation of leaf color in pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill). 1995. Brazilian Journal of Genetics. 18(4). p.547-552.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos preliminares foram realizados para a execução deste trabalho que objetivou identificar as condições “*in vitro*” mais viáveis para assepsia e estabelecimento de gemas axilares, observar os efeitos de diferentes concentrações de BAP na indução de brotos, testar a influência dos sais para o crescimento de brotos, multibrotação e emissão de raízes e identificar o substrato mais eficiente para aclimatização com conseqüente formação de mudas de padrão comercial.

A realização de estudos para obtenção de pequenas brotos (rosetas) a partir de gemas axilares assépticas é necessária para acelerar o processo de micropropagação.

Os resultados obtidos sinalizam os passos a serem seguidos em futuros experimentos para otimização das metodologias desenvolvidas neste trabalho.

Descreve-se como metodologias eficientes para propagação “*in vitro*” de curauá, a utilização de gemas axilares como explantes, submetidas à assepsia com álcool a 70% por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos; estabelecimento das gemas em meio de cultura MS acrescido de $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP; meio de cultura MS líquido suplementado com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP para indução de brotos ao longo de 90 dias; meio de cultura MS líquido para crescimento de tufo de brotos e indução de raízes e para aclimatização, a combinação de substrato fibra de coco + pó de coco, na proporção volumétrica de 1:1 ao longo de 65 dias.

Em suma, a espécie *Ananas erectifolius* L.B. Smith, popularmente conhecida como curauá, apresentou através dos resultados obtidos neste trabalho, adaptabilidade satisfatória às técnicas de cultura de tecidos utilizadas, comprovando-se ter potencial para o processo de micropropagação.