

Avaliação da capacidade morfogenética *in vitro* de diferentes genótipos de uma progênie de abacaxizeiro

Santos, Marta Taluana¹; Souza, Fernanda Vidigal Duarte²; Ledo, Carlos Alberto da Silva³

¹Mestranda da Pós-Graduação em Ciências Agrárias (UFRB), CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Fone (75) 3621-2002, email: taluanar@bol.com.br; ²Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Fone (75) 3621-8094, email: fernanda@cnpmf.embrapa.br; ³Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Fone (75) 3621-8061, email: ledo@cnpmf.embrapa.br.

INTRODUÇÃO:

Inúmeros fatores podem estar direta ou indiretamente envolvidos com o sucesso da morfogênese *in vitro*, podendo-se citar como exemplos, as características da planta mãe, o tipo de explante, o balanço de fitorreguladores, as condições ambientais nas quais se dá o cultivo, assim como fatores genéticos, entre outros. A variabilidade na resposta morfogenética *in vitro* existe tanto entre espécies do mesmo gênero como também entre genótipos da mesma espécie, tornando-se necessário a definição de protocolos diferenciados.

Programas de melhoramento genético do abacaxizeiro são demorados e complexos devidos a vários fatores, dentre eles a utilização de métodos convencionais para a propagação vegetativa. Nesse contexto, a cultura de tecidos, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se um instrumento valioso, tanto na conservação de germoplasma quanto na propagação vegetativa *in vitro* para clonagem rápida de genótipos superiores, disponibilizando maior quantidade de mudas livres de vírus em curto período de tempo (Teixeira et al, 2001; Firoozabady & Gutterson, 2003; Souza et al, 2006).

De acordo com Koornneef et al. (1993), o componente genético associado com a regeneração determina a manutenção da competência morfogenética, e não somente a sensibilidade do tecido a reguladores de crescimento incorporados ao meio de cultura.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade morfogenética *in vitro* de genótipos de abacaxizeiro pertencentes a uma mesma progênie, resultado do cruzamento entre Ananas São Bento x Primavera (*Ananas comosus* var. *bracteatus* x *Ananas comosus* var. *comosus*).

MATERIAL E MÉTODOS:

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Como material vegetal utilizou-se plantas de uma progênie oriunda do cruzamento entre Ananas São Bento x Primavera, pertencentes às variedades botânicas, *Ananas comosus* var. *bracteatus* x *Ananas comosus* var. *comosus*, respectivamente.

Foram selecionadas no campo quinze plantas dessa progênie, tendo-se inicialmente medido em cada planta, as seguintes variáveis com auxílio de uma régua graduada e um paquímetro: comprimento e diâmetros da base, do meio e do ápice do caule, assim como o número de gemas que seriam utilizadas como explante para o cultivo *in vitro*. As plantas foram levadas ao laboratório para retirada das folhas, lavagem e extração das gemas individualmente, que foram igualmente medidas, atribuindo-se valores (extremamente pequena, 2 = muito pequena, 3 = pequena, 4 = média, 5 = grande, 6 = muito grande) e levadas ao procedimento de desinfestação.

Realizado todo o procedimento de desinfestação, as gemas foram introduzidas no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 0,01 mg. L⁻¹ de ANA e 0,2 mg.L⁻¹ de BAP, acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8. Em seguida foram transferidas para sala de crescimento com intensidade luminosa de 22 μEm⁻²s⁻¹, temperatura de 27°C e fotoperíodo de 16 horas.

Avaliou-se nas primeiras semanas as taxas de contaminações fúngicas e/ou bacterianas, a oxidação e o intumescimento dos explantes (gemas). O meio de cultivo usado para estabelecimento foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) sem qualquer regulador de crescimento. Após três meses foram transferidas para meio de multiplicação fresco MS contendo 2 mg. L⁻¹ de BAP, e 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ ágar, o pH ajustado para 5,8. As condições de incubação em sala de crescimento foram as seguintes: intensidade luminosa de 22 μEm⁻²s⁻¹, temperatura de 27°C e fotoperíodo de 16 horas. O primeiro subcultivo foi realizado 60 dias após a inoculação nesse meio, quando se procedeu a contagem de brotos/gema e número de folhas.

Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre as seguintes as variáveis obtidas das plantas no campo: comprimento, diâmetros da base, do meio e do ápice do caule, e das variáveis medidas *in vitro*: tamanho médio da gema, número médio de folhas, número de brotos do primeiro subcultivo e número de brotos do segundo subcultivo. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na Figura 1 são apresentados as porcentagens de gemas contaminadas, gemas viáveis, gemas mortas, gemas não intumescidas e gemas oxidadas. De maneira geral, 28,35% das gemas retiradas apresentaram contaminação por fungos e/ou bactérias. A contaminação fúngica se dá principalmente pelo manuseio inadequado dos explantes e aumenta, muitas vezes devido às condições sanitárias do material de partida no campo, dificultando o procedimento de desinfestação. A não realização de nenhum tipo de tratamento antifúngico nas mudas pode ter contribuído para esse resultado. Já a contaminação por bactéria foi provavelmente causada por bactérias endofíticas, de ocorrência muito comum em materiais silvestres. Enquanto alguns genótipos não apresentaram contaminação, outros chegaram a apresentar até 89,47% de contaminação. Em torno de 22,75% das gemas foram viáveis, 9,42% não intumesceram e 15,07% apresentaram elevada oxidação impedindo seu desenvolvimento. A porcentagem de gemas mortas foi de 24,41%.

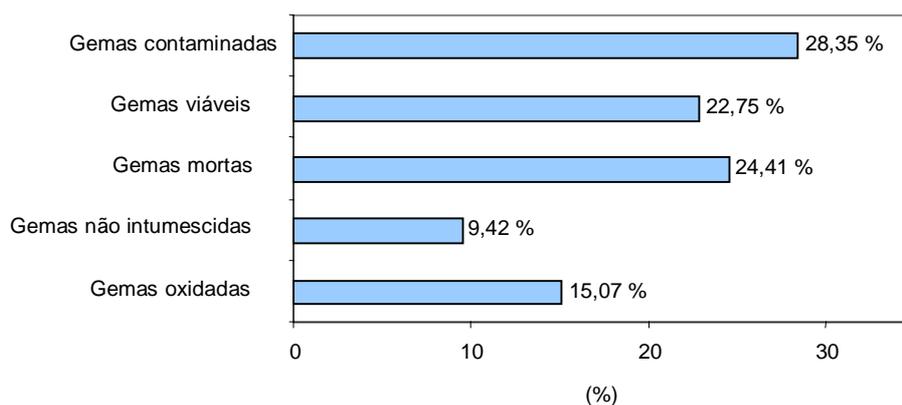


Figura 1. Porcentagens de gemas contaminadas, gemas viáveis, gemas mortas, gemas não intumescidas e gemas oxidadas oriundos de 15 genótipos de abacaxizeiro oriundos do cruzamento entre Ananás São Bento x Primavera.

Na Tabela 1 são apresentadas as estatísticas descritivas das variáveis avaliadas, que evidenciam uma diferença marcante entre os genótipos da progênie a ser usada para o experimento. O comprimento do caule entre as plantas variou de 6,30 a 23,00 cm, enquanto os diâmetros variaram de 3,5 a 7,50 cm, a 3,00 a 6,50 cm e 1,50 a 5,00 cm, respectivamente nas partes basal, mediana e apical. O número de gemas retirado em cada planta variou

conforme o diâmetro e comprimento do caule, situando-se entre 10 a 30 gemas retiradas. O número de gemas viáveis por planta foi a variável que apresentou o maior coeficiente de variação, 85,95%, indicando grande amplitude de valores, que variaram de 0 a 10 gemas. O tamanho da gema é sem dúvida uma das variáveis mais importantes a ser considerada para a morfogênese *in vitro*, influenciando, principalmente nas taxas de multiplicação. Nesse trabalho, as gemas retiradas variaram de 1,86 a 5,33. Esse tipo de informação é importante para se ter o detalhamento do material de partida a ser usado no experimento e possibilitar posteriormente a análise de correlação a fim de não comprometer a interpretação dos resultados obtidos no que se refere à capacidade morfogenética das plantas. Com relação ao número de brotos obtidos no 1º e 2º subcultivos, os valores variaram de 1,71 a 38 e 2,57 a 64 brotos, respectivamente. Os valores altos do CV, 120,43% e 133,03%, respectivamente para o 1º e 2º subcultivos, indicam a alta variabilidade do número de brotos entre plantas do mesmo cruzamento.

Tabela 1. Estatísticas descritivas da resposta morfogenética de 15 genótipos de abacaxizeiro oriundos do cruzamento entre Ananás São Bento x Primavera.

Variáveis aferidas nas plantas em campo	Média	Desvio Padrão	CV (%)	Mínimo	Máximo
Comprimento do caule (cm)	12,42	4,46	35,91	6,30	23,00
Diâmetro da base do caule (cm)	4,65	1,03	22,15	3,50	7,50
Diâmetro do meio do caule (cm)	4,43	0,88	19,86	3,00	6,50
Diâmetro do ápice do caule (cm)	2,69	0,84	31,23	1,50	5,00
Número de gemas por planta	18,20	5,24	28,79	10,00	30,00
Tamanho médio da gema ¹	3,80	1,01	26,58	1,86	5,33
Variáveis aferidas na etapa de cultivo <i>In vitro</i>					
Número de gemas viáveis	4,20	3,61	85,95	0,00	10,00
Número médio de folhas	2,38	1,74	73,11	0,00	4,75
Números de brotos do 1º subcultivo	8,50	10,24	120,43	1,71	38,00
Número de brotos do 2º subcultivo	13,16	17,51	133,03	2,57	64,00

¹ = extremamente pequena, 2 = muito pequena, 3 = pequena, 4 = média, 5 = grande, 6 = extremamente grande.

Na tabela 2 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis obtidas nas plantas e suas respectivas respostas morfogenéticas *in vitro*. Observou-se que o comprimento do caule apresenta uma correlação média e significativa ($P < 0,05$) com o número de explantes viáveis ($r = 0,68^{**}$) e com o tamanho médio da gema ($r = 0,61^*$). O diâmetro na base e no meio apresentou correlação média e altamente significativa com o comprimento do caule, $r = 0,55^*$ e $r = 0,65^{**}$, respectivamente. O número de gemas por planta apresentou correlação significativa ($P < 0,05$) e média com o diâmetro no ápice, $r = 0,63^*$. O número de gemas viáveis apresentou correlação média com o tamanho médio das mesmas ($r = 0,51^*$) e correlação alta com o número médio de folhas *in vitro* ($r = 0,79^{**}$). As demais correlações não foram significativas ($P > 0,05$). Verificou-se uma relação média, significativa e negativa entre as variáveis número médio de folhas *in vitro* e número de brotações do primeiro e segundo subcultivo, $r = -0,65^*$ e $r = -0,62^*$, respectivamente.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis da planta e variáveis obtidas *in vitro* de 15 genótipos de abacaxizeiro oriundos do cruzamento entre Ananás São Bento e Primavera.

	DB	DM	DA	NG	NV	TG	NF	BP	BS
CC	0,55*	0,65**	0,33	0,32	0,68**	0,61*	0,35	-0,41	-0,41
DB		0,88**	0,58*	0,37	0,42	0,23	0,21	-0,02	0,04
DM			0,52*	0,30	0,40	0,43	0,27	-0,15	-0,10
DA				0,63**	0,25	-0,17	0,08	0,02	0,03
NG					0,39	-0,24	0,41	-0,06	-0,07
NV						0,51*	0,79**	-0,49	-0,50
TG							0,20	-0,08	-0,10
NF								-0,65*	-0,62*
BP									0,99**

¹CC = comprimento do caule, DB = diâmetro da base, DM = diâmetro do meio, DA = diâmetro do ápice, NG = número de gemas por planta, NV = número de gemas viáveis, TG = tamanho médio da gema, NF = número médio de folhas, BP = número de brotos do primeiro subcultivo, BS = número de brotos do segundo subcultivo.

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

Esse tipo de estudo realizado em progênies, partindo-se do princípio que todas as plantas da progênie foram cultivadas sob as mesmas condições servem de auxílio para se estimar a variância genética e os estudos de herdabilidade no que se refere à capacidade morfogênica de plantas. Adicionalmente confirma o efeito de diversos fatores como a localização e o tamanho das gemas, dentre outros, para a morfogênese *in vitro*.

Trabalhos realizados com progênies de melão mostraram uma elevada variabilidade da capacidade morfogênica entre as plantas. Essa variabilidade observada foi considerada, pelos autores, de natureza genética devido às condições de experimentação estabelecida por eles (Molina & Nuez, 1995).

Visto que cada vez mais ferramentas biotecnológicas são inseridas nos programas de Melhoramento genético das espécies cultivadas e os protocolos de regeneração de plantas são a base para o uso dessas técnicas, o conhecimento e o controle sobre a capacidade morfogênica desses materiais é extremamente interessante.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que as diferenças observadas entre as plantas da progênie em condições de campo, são, em parte, responsáveis pelas diferenças que foram observadas no comportamento das gemas inoculadas *in vitro*. Dentre as variáveis que mais influenciaram os resultados obtidos, destaca-se o tamanho da planta (comprimento e diâmetro do caule), assim como o tamanho inicial da gema. Essas variáveis apresentaram uma correlação positiva com a viabilidade das gemas *in vitro*, refletindo inclusive no desenvolvimento das plantas obtidas.

AGRADECIMENTOS¹

LITERATURA CITADA

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

¹ A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e a CAPES, que contribuíram de forma direta e indiretamente para execução desse trabalho.

KOORNNEEF, M., BADE, J., HANHART, C., HORSMAN, K., SCHEL, J., SOPPE, W., VERKERK, R., ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, v.3, p.131-141, 1993.

MOLINA, R.V. & NUEZ, F. Characterization and classification of different genotypes In a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. *Planta Cell Tissue and Organ Culture*. v. 43. p. 249-257. 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.

SAS, Statistical Analysis System. **User's Guide**. Statistics. 5. ed. Cary: SAS Institute, 2000. 1028p.

SOUZA, F.V.D.; CABRAL, J.R.S.; CARDOSO, J.L.; BENJAMIN, D.A. Minimum growth conditions for the in vitro conservation of pineapple germplasm. **Acta Horticulturae**. Leuven. 702, february. p. 41-47. 2006.

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

PALAVRAS-CHAVE: *Ananas comosus* var. *bracteatus*, *Ananas comosus* var. *comosus*, micropropagação, cultura de tecidos.