



CAROLINA MARIANE MOREIRA

BIOTECNOLOGIA APLICADA AO CURAUÁ
(*Ananas comosus* var. *erectifolius*):
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
MICROPROPAGAÇÃO E EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM SEGMENTO FOLIAR

LAVRAS - MG

2011

CAROLINA MARIANE MOREIRA

**BIOTECNOLOGIA APLICADA AO CURAUÁ (*Ananas comosus* var.
erectifolius): CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
MICROPROPAGAÇÃO E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEGMENTO
FOLIAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Moreira, Carolina Mariane.

Biotechnology aplicada ao curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*): caracterização morfológica, micropropagação e embriogênese somática em segmento foliar / Carolina Mariane Moreira. – Lavras : UFLA, 2011.

112 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Diversidade genética. 2. Micropropagação. 3. Melhoramento genético. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

CAROLINA MARIANE MOREIRA

**BIOTECNOLOGIA APLICADA AO CURAUÁ (*Ananas comosus* var.
erectifolius): CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,
MICROPROPAGAÇÃO E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEGMENTO
FOLIAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA

Dra. Flávia Dionísio Pereira COMIGO

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

LAVRAS – MG

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo em minha vida, pela dádiva de uma vida feliz e cheia de realizações.

Aos meus amados pais, Conceição e Geraldo, meu irmão Jonas e ao meu noivo Elvis, pelo apoio, amizade e carinho, sem a ajuda deles não chegaria até aqui.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelo incentivo e grande conhecimento e dedicação, a quem aprendi a admirar, pelo seu otimismo, determinação e perseverança.

À professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela disposição em colaborar e ajudar no decorrer do mestrado.

A Helena Botelho de Andrade pela ajuda e amizade durante todo trabalho.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais e do Horto de Plantas Medicinais pela amizade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e aos professores da Genética (DBI), pelos ensinamentos e a oportunidade de cursar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização de mais esta importante etapa da minha vida profissional.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O curauá é uma bromeliaceae de origem Amazônica cuja principal utilização no agronegócio é a produção de fibras naturais que são empregadas em diversos setores como automobilísticos, manufaturados, papelaria, indústria têxtil, construção civil, e demais usos agrocomerciais. A realização deste trabalho teve como objetivo a caracterização morfológica do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental de acessos de 6 e 12 meses, micropropagação e a embriogênese somática de segmento foliar de curauá. A caracterização resultou em diferenças significativas em ambos os grupos. Comparando, simultaneamente, as médias das variáveis respostas comprimento e relação comprimento/largura, observou-se que para as plantas do grupo 1 as maiores médias foram dos acessos FMR 2600 e SRR 2500. Já para o grupo 2 incluem os acessos PEMATEC R, PAB 900, EMBRAPA R, PPR 400 e ANR 1200. No dendrograma de similaridade entre os 15 acessos de curauá, pode-se observar que há um grupo maior composto por 13 acessos constituído por 3 subgrupos e um grupo menor composto pelos acessos 1 e 2. Já no dendrograma de similaridade para o grupo 2, observou-se a formação de dois grandes grupos e dentro deles a formação de vários subgrupos. Na micropropagação, a indução de brotação *in vitro* em sistema estacionário e sob agitação do meio líquido em diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 mg.L⁻¹) e TDZ (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 mg.L⁻¹) indicou que um aumento na concentração de BAP foi eficiente no aumento do número de brotações e da biomassa fresca, já para o tamanho das brotações a ausência deste regulador proporcionou os melhores resultados. Com relação ao sistema de cultivo, o estacionário levou a um incremento da biomassa seca e dos teores de clorofila. Constatou-se que o aumento da concentração de TDZ também favoreceu o acréscimo da área e do diâmetro do aglomerado de brotações, e do número de plantas. Entretanto, em elevadas concentrações, o desenvolvimento *in vitro* foi inibido. Assim, recomenda-se, para propagação clonal em curauá, o cultivo em meio MS acrescido de 3,0 mg.L⁻¹ de TDZ sob sistema estacionário para obtenção de um maior número de brotações com menores custos. Para regeneração de brotos estiolados, a obtenção de uma grande quantidade de brotos e um maior diâmetro do aglomerado de brotações, o melhor resultado foi obtido na concentração de 0,5mg.L⁻¹ de TDZ. Para indução de calos embriogênicos e regeneração de plantas em curauá, recomenda-se o uso de meio MS/4 acrescido de 20µM de 2,4-D com 5µM de TDZ, mantendo os explantes em condições de escuro por 30 dias, seguido da transferência dos calos para meio MS na ausência de reguladores de crescimento e na presença de luz.

Palavras-chave: Diversidade genética. *Cultivo in vitro*. Reguladores de crescimento.

ABSTRACT

Curauá bromeliaceae is an Amazon whose main source used in agribusiness is the production of natural fibers that are used in various industries like automobiles, manufactured goods, stationery, textiles, construction, agribusinesses and other uses. The main purpose of this work is the morphological characterization of “Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental” of access from 6 and 12 months, micropropagation and the somatic embryogenesis of foliar segment in curauá. The characterization resulted in significant differences in both groups. The simultaneous comparison, the various means response of length and relation length/width, were observed that for group 1 plants the highest means were from accession FMR 2600 e SRR 2500. For the group 2 the accesses PEMATEC R, PAB 900, EMBRAPA R, PPR 400 e ANR 1200 were the highest. In the similarity dendrogram among 15 curauá access, can observed that there is one bigger group maid of 13 access of 3 subgroups and one smaller group of access 1 and 2. Similarity dendrogram for group 2, observed the formation of two bigger groups and among them the formation of many subgroups. In the micropropagation, *in vitro* shoot induction in the statical system and under shaking the liquid medium in differents BAP (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 mg.L⁻¹) e TDZ (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 mg.L⁻¹) concentration indicating that an increase in BAP concentration was efficient enhance the shoot number and fresh biomass, for the shoot length the regulator absence gave better results. In relation to the culture system, the statical on led to an increase of dry biomass and the chlorophysical levels. It was observed that the enhance of TDZ concentration also gave an increase in the area and diameter of shoot cluster, and plant numbers, however in higher concentration the *in vitro* development was inhibit. Thus, it is recommended for clonal propagation in curauá cultivation in MS medium supplemented with 3.0 mg.L⁻¹ TDZ under estatical system to obtain a higher number of shoots with lower costs. For elongation shoots regeneration, the great shoots quantity obtained and a higher cluster shoots diameter, the better result was obtained in 0.5 mg.L⁻¹ TDZ concentration. For embryogenic calluses induction and curauá plants regeneration it is recommended MS/4 medium plus 20 µM 2,4-D with 5 µM TDZ, keeping the explants in dark for 30 days, followed by transferring the calluses to MS medium without growth regulators and under light.

Keywords: Genetic diversity. *In vitro* culture. Growth regulations.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	9
1	INTRODUÇÃO GERAL	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A cultura do curauá	12
2.2	Caracterização e mercado de fibras naturais de curauá	13
2.3	Produção de mudas de curauá	14
2.4	Sistema de reprodução de ananas	16
2.5	Estratégias de melhoramento	16
2.6	Coleção de germoplasma	18
2.7	Caracterização de germoplasma	19
2.8	Cultivo <i>in vitro</i>	21
2.8.1	Organogênese direta	21
2.8.2	Embriogênese somática	23
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	25
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de curauá	30
1	INTRODUÇÃO	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	CAPÍTULO 3 Indução de brotação <i>in vitro</i> em curauá: sistema de cultivo e concentrações de BAP e TDZ	48
1	INTRODUÇÃO	50
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> de curauá	52
2.2	Influência do cultivo <i>in vitro</i> em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de BAP 53	
2.3	Influência do cultivo <i>in vitro</i> em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de TDZ	54
2.4	Delineamento experimental e análises estatísticas	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	56
3.2	Influência do cultivo <i>in vitro</i> em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de BAP 56	

3.3	Influência do cultivo <i>in vitro</i> em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de TDZ	65
4	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	CAPÍTULO 4 Indução de brotações adventícias em gemas de brotos estiolados <i>in vitro</i> de curauá	75
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	CAPÍTULO 5 Embriogênese somática em segmentos foliares juvenis de curauá	90
1	INTRODUÇÃO	92
2	MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1	Material vegetal	95
2.2	Ensaio I a: efeito dos reguladores de crescimento e concentrações na indução de calos	95
2.3	Ensaio I b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos	96
2.4	Ensaio II a: efeito do 2,4-D combinado com BAP ou TDZ na indução de calos	96
2.5	Ensaio II b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos	97
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1	Ensaio I a: efeito dos reguladores de crescimento e concentrações na indução de calos	99
3.2	Ensaio I b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos	104
3.3	Ensaio II a: efeito do 2,4-D combinado com BAP ou TDZ na indução de calos	106
3.4	Ensaio II b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos	107
4	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) é uma bromeliaceae de origem Amazônica cuja principal utilização no agronegócio é a produção de fibras naturais que são empregadas em diversos setores como automobilísticos, manufaturados (cordas, sacos e capacetes), papelaria (papeis, agendas, blocos, luminárias etc), indústria têxtil (sucédânea do linho), construção civil (caixas d'água, tanques, telhas e divisórias), e demais usos agrocomerciais. Na indústria automotiva, parte do revestimento interno de automóveis, freios, bancos, painéis, pára-choques e outros substitutos da fibra de vidro, estão sendo confeccionados por materiais de origem natural, sendo que a fibra do curauá é uma das matérias primas empregadas. As principais características da fibra de curauá que possibilitam estes usos múltiplos são a resistência à tensão, peso reduzido e maciez (ARAÚJO, 2003).

O atual interesse nos produtos com fibras naturais deve-se, entre outros fatores, à crescente preocupação mundial com a preservação do meio ambiente e utilização de matéria prima renovável. Há um grande interesse na busca por fibras naturais que possam substituir adequadamente as fibras sintéticas como, por exemplo, a fibra de vidro (DA SILVA et al., 2008).

Os principais argumentos que evidenciam a utilização de fibras de curauá em automóveis são a redução do peso do veículo, diminuição de risco de incêndios, conforto, valorização da renda agrícola, utilização de produto agroecológico, biodegradável e redução de custo (fibra de curauá é cerca de 10 vezes mais barata que a fibra de vidro). Mas, no entanto, a indústria automobilística se defronta com a reduzida oferta de fibra de curauá devido à falta desse produto no mercado. Outra aplicação importante das fibras de curauá

é no setor de papel e celulose, logo desenvolver tecnologias e incentivos para a produção de matérias primas como o curauá para a confecção de papel e celulose é importante para preservação do meio ambiente (DA SILVA et al., 2008).

A etapa de avaliação da variabilidade genética de uma espécie, seja dos materiais contidos em banco de germoplasma ou de amostras de populações naturais, é de extrema importância para se estabelecer estratégias de conservação da espécie, de coletas, organização dos bancos de germoplasma e no uso em programas de melhoramento.

A maioria dos programas de melhoramento envolve quatro etapas no desenvolvimento de novos genótipos: escolha dos genitores; cruzamentos artificiais; avanço das gerações segregantes; e teste do ajuste das constituições genéticas em diferentes ambientes. A etapa do avanço das gerações segregantes (devido aos efeitos não-aditivos) tem como desvantagens o aumento do número de anos de cada ciclo do programa de melhoramento e a demanda adicional de recursos humanos e financeiros. Essas limitações poderiam ser contornadas pela eficiente escolha dos genitores e efetividade do processo de seleção de constituições de elevado desempenho em gerações precoce.

A propagação convencional do curauá é por meio de rebentos que são emitidos entorno da planta, sendo esse método de reprodução assexual transmissor de doenças além da planta mãe produzir baixa quantidade de rebentos por planta (cerca de 40 rebentos/planta/ano). A técnica de cultura de tecidos vem sendo amplamente utilizada na obtenção de mudas com alta sanidade e em grande escala por meio da micropropagação de curauá. No entanto, as taxas de multiplicação em laboratórios comerciais podem ser feitas através de outros métodos de propagação assexual tais como embriogênese somática, micropropagação, estiolamento e outras mais.

Dentre as múltiplas ferramentas que compreendem a cultura de tecidos a embriogênese somática é uma técnica amplamente pesquisada em diversas espécies agrícolas visando maximizar o processo de produção de clones *in vitro*. De acordo com Guerra, Torres e Teixeira (1998), o processo de regeneração *in vitro* por embriogênese somática permite a obtenção de um número elevado de indivíduos com as mesmas características de genótipos superiores da planta matriz garantindo que genótipos ou matrizes com dificuldades de serem propagados convencionalmente possam ser clonados em larga escala, com a vantagem de serem rejuvenescidos. Atualmente plantas de bromélias do CCA-UFSC em Santa Catarina são todas propagadas por embriogênese somática sendo a taxa de multiplicação maior que na micropropagação.

O sucesso na aplicação dessa técnica depende de processos de indução, proliferação, diferenciação, maturação e regeneração de um novo indivíduo a partir de células somáticas que passam por um processo de dediferenciação originando uma massa celular denominada calo.

Os objetivos gerais desse trabalho foram realizar a caracterização morfológica e agrônômica dos acessos do banco de germoplasma de curauá e elaborar protocolos de micropropagação e embriogênese somática para o curauá visando maximizar o número de plântulas obtidas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do curauá

O curauá [*Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) COPPENS; LEAL (2003)] é uma planta monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae sendo caracterizada pela produção de fibras ligno-celulósicas de utilização múltipla e diversificada, incluindo as mais diferentes atividades e fins. As folhas, coriáceas e sem espinhos, com comprimento médio de 1,5 m, largura de 5 cm e espessura de 5 mm são os órgãos de interesse comercial. O sistema radicular é do tipo fascicular e superficial ao solo. A planta é monóica e as flores hermafroditas (REIS et al., 2007).

Apesar de ser uma espécie nativa e rústica, é uma bromeliácea ainda pouco conhecida e estudada. O centro de origem desta espécie é a Amazônia paraense, sendo seu habitat natural caracterizado por ser um solo arenoso e pouco fértil (RENDEIRO, 2007).

O curauá é cultivado nos estados do Pará, Acre, Mato Grosso, Goiás, Amapá e Amazonas principalmente por pequenos produtores da região do Lago Grande de Curuai no Município de Santarém, PA (RENDEIRO, 2007).

O plantio de curauá é feito através de mudas. Após um ano do plantio começa a produzir folhas maduras que são colhidas manualmente e processadas para produção da fibra natural do curauá. A folha é constituída de 6% de fibra e 94% de mucilagem que pode ser aproveitada como ração animal, adubo orgânico ou elaboração de anestésico. O custo de produção de 1 ha com cerca de 10.000 plantas é estimado em R\$ 3 mil a R\$ 4 mil, sendo o custo de cada muda em torno de R\$ 0,25 (RENDEIRO, 2007).

A planta, quando adulta, pode atingir de 1,0 m a 1,5 m de altura, sendo que cada planta é capaz de produzir de 12 a 15 folhas, onde são extraídos cerca

de 2 quilos de fibra (RAMALHO, 2007). O beneficiamento das fibras é feito pela mesma máquina que faz o desfibrilamento do sisal.

O curauá pode também ser cultivado em consórcio com vários tipos de culturas como cupuaçu, feijão, melancia, mandioca, hortaliças e também outras espécies florestais reduzindo substancialmente o custo de produção.

2.2 Caracterização e mercado de fibras naturais de curauá

O desenvolvimento de materiais corretos de maneira ecológica e a melhor adequação dos processos tem sido uma necessidade para minimizar os problemas ambientais no mundo. O uso de matérias-primas de fontes renováveis vem sendo objeto de diversos estudos e pesquisas, devido ao seu potencial na substituição de derivados petroquímicos. As fibras naturais tem um grande potencial de aplicação na indústria automobilística, na área de revestimento interno de automóveis, ônibus e caminhões, e na construção civil. As perspectivas futuras para as fibras naturais são muito boas também em outras áreas como, por exemplo, a indústria têxtil, atualmente com o seu mercado em expansão (ARAÚJO, 2003).

Por serem fonte de recurso natural renovável, as fibras naturais têm baixo custo, são biodegradáveis, recicláveis, não tóxicas e podem ser incineradas. Estão sendo utilizadas como reforço em polímeros e substituindo parcialmente as fibras sintéticas como amianto, Kevlar, boro, carbono, nylon e vidro que, apesar de possuírem boas características mecânicas, tem um custo elevado, são abrasivas aos equipamentos de processamento, possuem alta densidade, não são biodegradáveis, geram produtos com um custo muito alto de reciclagem, além de algumas dessas fibras comprometerem a saúde humana (ARAÚJO; MOTHE, 2003).

Dentre as fibras naturais com potencial de aplicação, destaca-se o curauá (*Ananas erectifolius*), cultivado às margens dos rios da Amazônia, que produz uma fibra de alta resistência, que quando misturada a polímeros, pode dar origem a produtos com menor densidade, podendo apresentar grandes aplicações (ARAÚJO; MOTHÉ, 2003).

O governo do Pará tem estimulado a implantação de projetos novos para utilizar melhor a fibra do curauá. Atualmente, há uma parceria com uma companhia do setor de automóveis para produzir esteiras do curauá.

A fim de aumentar a produção de matéria prima para atender a demanda, um programa foi criado para estimular a produção de fibras por pequenos produtores agricultores. Este tipo de projeto permite a inclusão de pequenos produtores em um processo que envolva alta tecnologia e, ao mesmo tempo, contribua para estabilização do homem no campo (SILVA; AQUINO, 2008).

A demanda por fibras de curauá pela indústria automobilística e têxtil gira em torno de 500 t/mês (RENDEIRO, 2007), evidenciando que este valor tem potencial de aumento linear de acordo com a demanda das indústrias.

2.3 Produção de mudas de curauá

As plantas de curauá são propagadas naturalmente por meio vegetativo através de rebentos que são emitidos pelas plantas no campo. Por ser um processo de propagação assexual, esse método em campo poderá aumentar a incidência de doenças ao longo de plantios sucessivos, além de produzir poucas mudas por planta (cerca de 40/ano). Desta forma, comercialmente, as mudas de curauá são propagadas em laboratórios via cultura de tecidos. De acordo com Rendeiro (2007) a Embrapa Amazônia Oriental produz cerca de 600 mudas/ano a partir de uma única gema.

A muda de qualidade é um fator importante para maximização de produtividade em diversos sistemas agrícolas. Assim, mudas oriundas de cultura de tecidos são caracterizadas pelo alto vigor, homogeneidade e sanidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecido tem sido um instrumento valioso na propagação de diversos tipos de plantas. Embora esse processo envolva diferentes etapas, depois de definido um protocolo de micropropagação, seja qual for a espécie, esse pode ser otimizado, no intuito de se obter plântulas de alta qualidade e com baixo valor de produção (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A Embrapa Amazônia Oriental é uma das pioneiras na produção de mudas micropropagadas de curauá. A principal técnica utilizada é a micropropagação que consiste em estabelecer *in vitro* rizomas de curauá e a partir das brotações obtidas, por meio da aplicação de reguladores de crescimento como o BAP (6-benzilaminopurina) são posteriormente enraizadas e aclimatizadas para o comércio.

Pesquisas na Universidade Federal de Lavras-UFLA mostraram que é também possível micropropagar o curauá a partir de plantas estioladas. Pereira et al. (2008) relatam que plantas estioladas são excelentes fontes de propágulos, evidenciando que essa também é uma alternativa na produção de mudas nessa espécie.

A embriogênese somática é uma das ferramentas da cultura de tecidos que vem despertando o interesse de muitos pesquisadores no mundo inteiro. A produção de embriões somáticos idênticos ao explante mãe vem sendo considerada uma estratégia para a produção de mudas de variadas espécies em escala comercial.

2.4 Sistema de reprodução de ananas

O sistema de reprodução pode ser definido pela co-existência de um sistema de reprodução sexual alógamo e funcional e de um sistema de propagação vegetativa dominante e muito eficiente. A reprodução sexuada tem grande importância na variabilidade genética que se observa no gênero Ananas. A contribuição das mutações somáticas pode ser considerada importante no surgimento de certas características de valor econômico, porém é ínfima em comparação aos efeitos da recombinação (COPPENS D'EECKENBRUGGE; DUVAL, 1995).

2.5 Estratégias de melhoramento

Pode optar-se por estratégias de melhoramento baseadas na reprodução vegetativa ou por métodos fundamentados na reprodução sexuada, sendo que as mais utilizadas são as seguintes:

- a) utilização direta dos recursos genéticos: A caracterização e avaliação de germoplasma de curauá podem indicar genótipos com potencial para o uso direto pelos produtores, desde que esses genótipos sejam adaptados às condições climáticas locais e satisfaçam às exigências do mercado (CABRAL; SOUZA; FERREIRA, 2005);
- b) seleção clonal: A seleção clonal objetiva explorar a variabilidade intravarietal. Um procedimento que pode ser adotado consiste na seleção das melhores plantas em uma população de uma determinada cultivar. As plantas selecionadas são multiplicadas para produzir novo material de plantio (CABOT, 1987). Outro procedimento fundamenta-se na seleção de uma só planta que tem

- um fenótipo excepcional, a qual é multiplicada para constituir em novo clone (COPPENS D'EENCKENBRUGGE; DUVAL, 1995);
- c) hibridação direta: Estabelecidos os objetivos do programa de melhoramento que se deseja desenvolver e o critério de seleção, definem-se os parentais para se realizar as hibridações. Considerando-se a heterozigose dos parentais que normalmente são utilizados nas hibridações e o grande número de caracteres usados na seleção, torna-se necessária a produção de populações híbridas muito grandes, para aumentar as chances de sucesso na seleção (CABRAL; SOUZA; FERREIRA, 2005).

Normalmente, os cruzamentos envolvem uma cultivar local e um parental que tem uma característica desejada que se quer incorporar à cultivar local, para produção de uma progênie F1, na qual é realizada a seleção dos genótipos promissores (CABRAL; SOUZA; FERREIRA, 2005).

Os genótipos selecionados no ciclo de propagação sexual são submetidos a três avaliações clonais para se observar a estabilidade das características desses genótipos. Os melhores genótipos selecionados nas avaliações preliminares são multiplicados para avaliações posteriores, envolvendo um maior número de plantas e, se possível, em vários ambientes. Outras estratégias de melhoramento, fundamentadas na mutagênese, poliploidia, cultura de tecidos e transformação genética podem ser utilizadas (CABRAL; SOUZA; FERREIRA, 2005).

2.6 Coleção de germoplasma

A conservação de recursos genéticos é composta de ações estabelecidas para resgatar e manter disponível o potencial utilitário da biodiversidade ou diversidade genética dos organismos. A conservação pode ser *in situ*, quando se preserva a espécie em suas áreas de ocorrência, ou *ex situ*, quando se mantêm coleções ou bancos de germoplasma em instituições de pesquisa. A conservação *ex situ* pode ser na forma de banco de sementes, cultura de tecidos, criopreservação e na forma de plantações. A necessidade de espaço e atenção contínuos faz deste último método de conservação um dos mais caros, restritos e vulneráveis (BROWN, 1992). Entretanto, ele facilita a avaliação genética dos materiais e o uso direto do germoplasma em programas de melhoramento.

O termo germoplasma representa a coleção de genótipos de uma espécie. O órgão oficial de recursos genéticos denomina como todo o material que constitui a base física da herança de uma espécie e que se transmite de uma geração para outra por meio de células reprodutivas (INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES – IBPGR, 1991). O objetivo do banco é representar todos os alelos contidos nas áreas de ocorrência natural da espécie. Entretanto, a eficiência dessa representação depende de fatores como a biologia da espécie, sua estrutura genética e do grau de dificuldade proporcionado pelo posicionamento geográfico das áreas de coleta (SOUSA; SOUZA, 2001).

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, ou áreas de ocorrência. Nessa distribuição os alelos e os genótipos ocorrem de maneira heterogênea (não aleatória) no espaço e no tempo, sendo resultado da ação de forças evolutivas como a mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população. O conhecimento dessa

estrutura é um importante passo para se estabelecer as estratégias de coleta e conservação do germoplasma. Segundo Brow (1992), as primeiras coletas devem se basear na grande diversidade entre regiões, para se coletar em um máximo de locais e a partir dessas coletas estudarem a distribuição genética. Após esse estudo, poder-se-ia, então, montar estratégias mais eficientes de coleta.

2.7 Caracterização de germoplasma

A divergência genética é um dos mais importantes parâmetros avaliados por melhoristas de plantas na fase inicial de um programa de melhoramento genético. Em programas que envolvem hibridações, esses estudos fornecem parâmetros para identificação de genitores que, quando cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie (CARVALHO et al., 2003).

Há duas maneiras básicas para se inferir na diversidade genética: uma de natureza quantitativa e outra preditiva (CRUZ; CARNEIRO, 2003). Segundo esses autores, dentre os métodos quantitativos têm-se as análises dialélicas, mas, em plantas perenes, a aplicação não é apropriada, por ser extremamente trabalhosa e de alto custo. Já os métodos preditivos são viáveis e tomam por base as diferenças morfológicas, agrônomicas e moleculares, quantificando-as por alguma medida de dissimilaridade que expressa o grau de diversidade genética entre os genótipos. Assim, três medidas de dissimilaridades podem ser aplicadas para representar a diversidade em coleções de germoplasma, que se diferenciam com o tipo de variável obtida, ou seja, se quantitativas, binárias ou multicategóricas (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

Os métodos preditivos de diversidade genética têm sido bastante utilizados, sobretudo pelo fato de que, ao se basearem em diferenças morfológicas e fisiológicas dos genitores, dispensam a obtenção das

combinações híbridas entre eles, o que é vantajoso, especialmente quando o número de genitores cujas diversidades se deseja conhecer é elevado. Entre os métodos preditivos estão aqueles que quantificam a diversidade por meio de medidas de dissimilaridade, entre as quais encontra-se a distância generalizada de Mahalanobis e a Euclidiana, a última têm sido a mais utilizada, já que a primeira necessita de repetições para ser estimada (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

A distância euclidiana pode ser estimada tomando-se por base dados sem repetições, como é o caso de dados oriundos do banco ativo de germoplasma, tornando-se viável a sua aplicação. No caso de bancos de germoplasma, o número de acessos é relativamente grande e os dados são coletados, geralmente, no campo, em fileiras simples, sem repetições, em que os acessos são instalados sem atender às prerrogativas de um delineamento experimental (casualização e controle local). A distância euclidiana é baseada no teorema de Pitágoras e aplicada a múltiplos eixos ortogonais, e segundo Cruz e Carneiro (2003) torna-se mais eficiente se obtida de variáveis padronizadas, por não permitir a alteração da distância pelas diferentes escalas de mensuração e nem pelo número de caracteres, obtendo-se, então, a distância euclidiana média padronizada.

Segundo Ferreira et al. (2003), geralmente, os programas de melhoramento têm por finalidade obter cultivares aprimoradas para um conjunto de caracteres. Por isso, o conhecimento da natureza e magnitude das correlações entre os caracteres de interesse é de fundamental importância. As relações existentes entre os caracteres são, em geral, avaliadas por meio de correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais. A correlação fenotípica é estimada diretamente de medidas fenotípicas, sendo resultante, portanto de causas genéticas e ambientais. O conhecimento prévio das relações existentes entre caracteres de plantas, como estimados pelas correlações, tem sido de grande importância nos trabalhos de melhoramento vegetal (CRUZ; REGAZZI, 1997).

2.8 Cultivo *in vitro*

A técnica da cultura de tecidos de plantas é considerada eficaz na propagação de várias espécies, permitindo o crescimento de células, tecidos e órgãos isolados da planta-mãe, em condições assépticas e controlada. Constitui um promissor instrumento para o desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam formas alternativas para a produção de mudas, conservação e melhoramento do material genético (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2000).

A regeneração de um novo indivíduo, em condições assépticas, pode ocorrer a partir de uma única célula. Cada célula carrega a informação genética necessária para regeneração de um novo indivíduo. Tal processo é conhecido por totipotência celular e é característico de tecidos jovens e meristemáticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

A micropropagação pode ser conduzida por uma destas três maneiras: multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares; multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo); e por último multiplicação via embriogênese somática (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

2.8.1 Organogênese direta

O estabelecimento e a propagação *in vitro* de uma espécie estão submetidos a diversos fatores. Entre os mais importantes citam-se os nutrientes minerais e reguladores de crescimento no meio de cultura que, em combinação com outros fatores, como o estado físico, proporciona a propagação efetiva de cada espécie. A alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento de plântulas *in vitro*. Segundo Souza et al. (1999), a iniciação

da cultura de bromélias ocorre mais facilmente quando se utiliza meio de cultura líquido.

Assim, o maior contato dos explantes com meio, que acontece nos cultivos em meio líquido, pode aumentar a absorção de água e nutriente quando comparado ao meio semi-sólido, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação de brotos e, ainda, acúmulo de massa seca (MENGARDA et al., 2009). No entanto, o cultivo em meio líquido requer, normalmente, um suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante em meio de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para induzir o crescimento dos explantes *in vitro*, recomenda-se a adição de uma citocinina ao meio de cultura inicial, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada e a mais efetiva para um grande número de cultivares. As citocininas são utilizadas para estimular a divisão celular, atuando desta forma na morfogênese. A concentração e o tipo de citocinina, para a melhor proliferação de brotações, podem variar entre os diferentes genótipos; contudo, as concentrações muito elevadas também são prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e hiper-hídricas (AYUB et al., 2010).

Atualmente tem sido grande a utilização do tidiazuron (TDZ) (N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ilureia) como regulador de crescimento no meio de cultura. Embora tenha sido desenvolvido para ser utilizado como desfoliante para o algodão, com o nome comercial de Dropp, o TDZ possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações (MOK et al., 1982). A superior potencialidade do TDZ sobre as citocininas do tipo das adeninas, em particular 6 benzilaminopurina e zeatina, ficou comprovada em bioensaios com cultura de calos de *Phaseolus* (MOK et al., 1982). O tidiazuron tem sido utilizado para a multiplicação de gemas axilares durante a micropropagação.

2.8.2 Embriogênese somática

A embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1998), sendo essa técnica já empregada para inúmeras espécies.

A embriogênese somática é também um método importante para propagação de plantas elite *in vitro*, em escala comercial. As principais vantagens da embriogênese somática comparada com outros sistemas de propagação *in vitro* são as altas taxas de multiplicação obtidas, possibilidade de criopreservação de calos embriogênicos, uso de biorreatores além da possível elaboração de sementes sintéticas (SILVEIRA et al., 2004).

Segundo Merkle, Parrot e Flinn (1995), a indução de embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estavam envolvidas no processo embriogênico. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e qualidade do explante (BYESSE; GOFFLOT; MICHAUX-FERRIERE, 1993).

Os primeiros resultados dessa técnica foram obtidos na década de 60 por Steward, Mapes e Mears (1958). Atualmente muitos protocolos de embriogênese somática foram estabelecidos e aplicados na obtenção de plantas em várias espécies de importância econômica

Os estudos com embriogênese somática na família Bromeliaceae tem-se expandido muito nos últimos anos devido à necessidade de recuperação e preservação de alguns genótipos desta família ameaçados de extinção como as bromélias, o que pode ser evidenciado nas pesquisas de Alves, Vesco e Guerra

(2006) e também aplicações em espécies com potencial valor comercial como o curauá.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com esse trabalho tornou-se possível desenvolver a caracterização morfológica, a micropropagação e embriogênese somática em segmento foliar jovem de curauá.

Um ponto interessante é que no estudo de embriogênese somática, notou-se, no início, um grande escurecimento dos explantes e conseqüentemente morte do tecido. Visando solucionar esse problema, foram feitos testes preliminares com diferentes partes do explante em contato com o meio e diferentes concentrações de sais do meio MS.

Baseado em informações geradas nesse trabalho, acredita-se que a produção de mudas, tanto por micropropagação quanto por embriogênese somática, são viáveis economicamente, já que as metodologias se complementam, possibilitando uma grande produção de mudas em pouco tempo.

Além disso, nesse trabalho, obteve-se pela primeira vez a indução de brotações adventícias em segmentos foliares jovens de curauá, protocolo que pode ser de grande utilidade na transformação genética de plantas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. M.; VESCO, L. L. D.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the endemic bromeliad *Vriesea reitzii* troght nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, p. 204-207, Oct. 2006.
- ARAÚJO, C. R. **Cinética de decomposição térmica de compósitos poliméricos com fibras de curauá**. 2003. 220 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)—Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- ARAÚJO, C. R.; MOTHÉ, C. G. Uso de programa computacional aliado às técnicas de análise térmica para determinação de parâmetros cinéticos de compósitos de PU/fibra de curauá. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 37-43, 2003.
- AYUB, R. A. et al. Indução de multibrotação *in vitro* em videira cv. Bordô. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 675-681, set. 2010.
- BROWN, A. H. D. Human impact on plant gene pools and sampling for their conservation. **Oikos**, Copenhagen, v. 63, n. 1, p. 109-118, Feb. 1992.
- BYESSE, D.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 71, n. 11, p. 1496-1502, 1993.
- CABOT, C. Amélioration génétique de l'ananas: I. considérations préalables aux recherches conduites en cote d'Ivoire. **Fruits**, Paris, v. 42, n. 10, p. 567-577, 1987.
- CABRAL, J. R. S.; SOUZA, J. da S.; FERREIRA, F. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro: viabilidade genética e melhoramento de abacaxi**. 2005. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/abacaxi.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2010.
- CARVALHO, L. P. de et al. Análise da divergência genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1149-1155, 2003.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; DUVAL, M. F. Bases genéticas para definir una estratégia de mejoramiento de la piña. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracay, v. 21, n. 3/4, p. 95-118, 1995.

COPPENS, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2003. Disponível em: <<http://home.tiscali.nl/leodg/ht/lists-species2000+.html>>. Acesso em: 01 jun. 2010.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2003. v. 2.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.

DA SILVA, R. V. et al. Desenvolvimento de um compósito laminado híbrido com fibras natural e sintética. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 154-161, 2008.

FERREIRA, M. A. J. F. et al. Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente entre dez caracteres de melancia e suas implicações para o melhoramento genético. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 438-442, jul./set. 2003.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 501 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 533-568.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES.
Consultative Group on International Agricultural Research. **Report of the third external review of the International Board for Plant Genetic Resources**. Rome, 1991. 85 p.

MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de Bromeliaceae. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 6, p. 469-474, nov./dez. 2009.

MERKLE, S.; PARROT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed). ***In vitro embryogenesis in plants***. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.

MOK, M. C. et al. Cytokinin activity of N- phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, New York, v. 21, n. 7, p. 1509-1511, 1982.

PEREIRA, F. D. et al. Micropropagation of the fiber-rich amazonian species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae). **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 2134-2137, Dec. 2008.

RAMALHO, E. **A folha amazônica que virou arte**. 2007. Disponível em: <http://www.rfi.fr/actubr/articles/068/article_124.asp> Acesso em: 15 abr. 2009.

REIS, I. et al. Trocas gasosas e alocação de biomassa em plantas jovens de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) submetidas ao alagamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 507-509, jul. 2007. Supl. 2.

RENDEIRO, R. **Embrapa de Belém é finalista nacional do prêmio Finep**. 2007. Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/noticias/banco_de_noticias/2003/outubro/>. Acesso em: 25 abr. 2007.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 2, p. 91-120, 2000.

SILVA, R. V.; AQUINO, E. M. F. Curaua fiber: a new alternative to polymeric composites. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, London, v. 27, n. 1, p. 103-112, 2008.

SILVEIRA, V. et al. Effect of plant growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 53-60, 2004.

SOUSA, N. R.; SOUZA, A. das G. C. Conservação ex-situ e utilização de espécies nativas. In: _____. **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p. 180-200.

SOUZA, C. M. et al. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 830-835, out./dez. 1999.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured carrots: II. organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal Botany**, Saint Louis, v. 45, n. 10, p. 705-708, Dec. 1958.

CAPÍTULO 2

Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de curauá

RESUMO

O curauá é uma espécie com grande potencial do uso de fibras com o revestimento na indústria automobilística. Objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização morfológica e agrônômica de dois grupos de acessos de curauá do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. A coleta dos dados foi realizada em Julho de 2010, os acessos foram avaliados separadamente, de acordo com a idade das plantas, sendo que para 6 meses (grupo 1) e 12 meses (grupo 2), foram coletados dados de 15 e 26 acessos, respectivamente. Relação dos descritores: folha (comprimento, largura, relação comprimento/largura, número e cor). Utilizaram-se, em média, cinco plantas por acesso para a coleta dos dados. Os resultados para os caracteres quantitativos foram submetidos à análise de variância e ao emprego do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados também foram submetidos à análise de agrupamento e de componentes principais. Os acessos foram analisados separadamente de acordo com a idade. Para todas as variáveis analisadas, a análise de variância resultou em diferenças significativas em ambos os grupos. Observaram-se que as plantas com folhas brancas para os acessos com 6 meses de idade foram os que tiveram os melhores resultados, diferente do comportamento dos acessos de 12 meses de idade, nos quais plantas com folhas roxas tiveram as maiores médias. Comparando, simultaneamente, as médias das variáveis respostas comprimento e relação comprimento/largura, observou-se que para as plantas do grupo 1 as maiores médias foram dos acessos FMR 2600 e SRR 2500. Já para o grupo 2 incluem os acessos PEMATEC R, PAB 900, EMBRAPA R, PPR 400 e ANR 1200. No dendrograma de similaridade entre os 15 acessos de curauá, pode-se observar que há um grupo maior composto por 13 acessos constituído por 3 subgrupos e um grupo menor composto pelos acessos 1 e 2. Já no dendrograma de similaridade para o grupo 2, observou-se a formação de dois grandes grupos e dentro deles a formação de vários subgrupos. De forma geral, a análise de componentes principais mostrou grupos semelhantes aos observados no dendrograma.

Palavras-chave: *Ananas comosus* var. *erectifolius*. Caracterização. Similaridade genética. Análise de agrupamento.

ABSTRACT

Curauá is a species with great potential of using the coated fibers in the automotive industry. This work had the purpose to carry out the morphological and agronomical characterization of two curauá groups access from “Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental”. The data collection was done in July 2010, the accesses were evaluated separately according to the plants age, for 6 months (group 1) and 12 months (group 2), were collected data from 15 and 26 access, respectively. List of descriptors: leaf (length, width, length / width, number and color). Were used five plants means per access for the date collection. The results for the quantitative characters were under analyses of variance and Scott-Knott test ($p < 0.05$). The data also under analyses of group and main components. The accesses were evaluated separately according to the age. For all analysed variables the analyse of variance resulted in significative differences in both groups. Observed that plants with white leaves for access with 6 months old were the ones that showed better results, different from the behavior of access 12 months old, where plants with purple leaves showed higher means. Comparing, simultaneously, the variables means responses length and relation length/width observed that plants from group 1 higher means accesses FMR 2600 e SRR 2500. For the group 2 the accesses PEMATEC R, PAB 900, EMBRAPA R, PPR 400 e ANR 1200 were the highest. In similarity dendrograma among the 15 curauá access could be observed that there is one larger group with 13 access made by 3 subgroup and one smaller group made of access 1 and 2. In similarity dendrograma for group 2, it was observed the formation of two larger groups and from them the formation of many subgroups. In general, the analyse of main components showed similar groups to the observed in the dendrograma.

Keywords: *Ananas comosus var. erectifolius*. Characterization. Genetic similarity. Cluster analysis.

1 INTRODUÇÃO

O curauá [*Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) COPPENS; LEAL (2003)] é planta da família bromeliácea de origem Amazônica cuja principal utilização no agronegócio é a produção de fibras naturais. As fibras são empregadas em diversos setores como manufaturados, na produção de cordas, sacos e capacetes, papelaria, indústria têxtil, como sucedânea do linho, construção civil, automobilísticos e demais usos agrocomerciais (ARAÚJO, 2003).

Recentemente na indústria automotiva, parte do revestimento interno de automóveis, freios, bancos, painéis, pára-choques e outros substitutos da fibra de vidro estão sendo confeccionados por materiais de origem natural, sendo que a fibra do curauá é uma das matérias primas empregadas. As principais características da fibra de curauá que possibilitam esses usos múltiplos são a resistência à tensão, peso reduzido e maciez (RAMALHO, 2005).

A crescente demanda na utilização de fibras naturais deve-se, principalmente, ao aumento da preocupação mundial com a preservação do meio ambiente e a utilização de matéria prima renovável. Há um grande interesse na busca por fibras naturais que possam substituir adequadamente as fibras sintéticas como, por exemplo, a fibra de vidro (DA SILVA et al., 2008).

Informações a respeito da diversidade genética de uma coleção de germoplasma servem para aumentar a eficiência dos trabalhos de melhoramento das espécies cultivadas. O estudo de divergência permite conhecer o grau de seleção da variabilidade genética das populações vegetais e subsidia a seleção de genitores geneticamente mais divergentes, que poderão ser utilizados em intercruzamentos com possibilidade de aumentar a probabilidade de recuperação de segregantes superiores em gerações avançadas (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

As técnicas de análises multivariadas têm sido empregadas para a quantificação da divergência genotípica e fenotípica em várias espécies (VIEIRA et al., 2010). Os métodos preditivos de diversidade genética têm sido bastante utilizados, sobretudo pelo fato de que, ao se basearem em diferenças morfológicas e fisiológicas dos genitores, dispensam a obtenção das combinações híbridas entre eles, o que é vantajoso, especialmente quando o número de genitores cujas diversidades se deseja conhecer é elevado.

Diante do grande interesse comercial que envolve a cultura do curauá e da falta de informações a respeito dessa espécie, a caracterização morfológica e agrônômica dos acessos de um Banco de Germoplasma possibilita a diferenciação fenotípica entre os mesmos, servindo como importante instrumento para a eliminação de duplicidades de acessos. Assim, trabalhos de caracterização e avaliação do germoplasma de curauá são fundamentais para a sua utilização mais eficiente nos trabalhos de melhoramento, possibilitando a identificação de cultivares com características superiores e herdáveis.

Desta forma, objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização morfológica e agrônômica de dois grupos com diferentes tempos de crescimento (6 e 12 meses) de acessos de curauá do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados acessos de curauá pertencentes à coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA (1°27'21"S e 48°30'16", com altitude de 10,8m). O clima local, segundo classificação de Koppen, corresponde ao tipo quente e úmido, caracterizado por estação chuvosa com precipitação média de 2.740mm, temperatura média de 26 °C e umidade relativa do ar próxima de 90%.

A coleta dos dados foi realizada em julho de 2010 em acessos com 6 e 12 meses de idade, os quais apresentavam características fenotípicas diferentes (folha branca e roxa). Os descritores avaliados foram: comprimento da maior folha (cm), largura da maior folha (cm), relação comprimento/largura e número de folhas por planta. Foram utilizadas em média cinco plantas por acesso para a coleta dos dados. Os acessos foram avaliados separadamente, de acordo com a idade das plantas, sendo que para 6 meses (grupo 1) e 12 meses (grupo 2), foram coletados dados de 15 e 26 acessos, respectivamente.

O caráter cor da folha, por ser qualitativo, não entrou na análise estatística.

A fim de verificar a existência de variabilidade genética entre os acessos, os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

Para realizar uma análise exploratória dos dados foi feita uma Análise de Componente Principal (PCA-Principal Component Analysis). A PCA foi aplicada aos valores médios das variáveis de respostas de cada tratamento, sendo realizada uma PCA para cada grupo de acessos. Para o grupo de 6 meses de idade, foi tratada uma matriz 15x4 (15 acessos x 4 variáveis de respostas) e

para o grupo de 12 meses de idade, foi tratada uma matriz 26x4 (26 acessos x 4 variáveis respostas).

Os dados foram pré-processados empregando autoescalonamento e os resultados estão demonstrados pelos gráficos dos escores e dos pesos, com duas componentes principais (PC) explicadas pelas suas variâncias. Os cálculos foram feitos no *software* “MATLAB® 7.5”.

Na técnica de agrupamento foi utilizada a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade e na delimitação dos grupos foi utilizado o método hierárquico das médias das distâncias (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre os acessos para todos os caracteres avaliados, o que indica a grande variabilidade genética observada nas populações de *Ananas comosus* var. *erectifolius*, bem como seu potencial para uso em programas de melhoramento visando a ampliação da base genética (Tabelas 1 e 2).

Por ter um grande potencial para produção de fibras naturais, plantas com folhas grandes e em grande quantidade são características de grande importância para os produtores. Em aspecto geral, os acessos apresentam características desejáveis para as variáveis que afetam a produção de fibras em curauá, possuindo em média, um alto comprimento foliar (66,20 e 80,80 cm) e alto número de folhas por planta (19,60 e 18,90), plantas do grupo 1 e grupo 2, respectivamente.

Para o caráter cor da folha o material avaliado foi polimórfico. Sendo que tanto para acessos com 6 meses de idade, quanto para acessos com 12 meses houve predominância de plantas com coloração foliar branca, 9 e 15 acessos, respectivamente.

Os acessos com 6 meses de idade com coloração branca apresentaram, na maioria, as maiores médias. Por outro lado, maiores médias nos com 12 meses de idade foram obtidas nos de coloração roxa.

Comparando, simultaneamente, as médias das variáveis de respostas comprimento e relação comprimento/largura, observou-se que para as plantas do grupo 1 as maiores médias foram dos acessos FMR 2600 e SRR 2500, ambos com médias idênticas para as duas variáveis (88,4 e 23,8, respectivamente). Já para o grupo 2 incluem os acessos PEMATEC R (122,6 e 25,6), PAB 900 (109,5 e 24,9), EMBRAPA R (105,3 e 26,3), PPR 400 (104,2 e 24,3) e ANR 1200 (107,7 e 26,3).

Com relação ao número de folhas os acessos avaliados tiveram uma média de 19,6 e 18,9, respectivamente, para os grupos 1 e 2, sendo que os acessos AMR 2300 (24,5), FNR 2100 (26,0), JPB 1401 (22,8), NLR 2200 (21,1) e SA 1701 (21,2) foram os que apresentaram as maiores médias para o grupo 1. Já pra o grupo 2, os melhores acessos foram: PEMATEC R (22,0), EMBRAPA R (26,9), PPR 400 (28,4), TR 300 (23,6), PEMATEC B (20,4), ANR 1200 (26,7), AB 101 (22,6), MFR 800 (22,3), BFR 600 (21,0) e ANB 1201 (21,2). Resultados distintos a este estudo foram obtidos por Ramalho (2005) em estudos com essa espécie, o qual obteve entre 12 e 15 folhas, das quais foram extraídas cerca de 2 quilos de fibras.

Tabela 1 Características de acessos de curauá (*Ananas comosus var. erectifolius*) com idade de 6 meses (grupo 1) do Banco de Germoplasma Embrapa Amazônia, Belém, PA., 2010

Número do acesso	Acesso	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Comp/larg	Número de folhas	Cor da folha
1	FMR 2600	88,4 a*	3,7 b	23,8 a	16,3 b	B
2	SRR 2500	88,4 a	3,7 b	23,8 a	16,3 b	B
3	AMR 2300	74,7 b	4,5 a	16,6 b	24,5 a	B
4	FNR 2100	74,5 b	5,2 a	14,4 b	26,0 a	R
5	JPB 1401	71,7 b	4,8 a	14,9 b	22,8 a	B
6	NLR 2200	67,0 b	4,8 a	13,95 b	21,1 a	B
7	SA 1701	64,0 b	4,7 a	13,6 b	21,2 a	B
8	NFB 1901	62,2 b	5,0 a	12,5 b	16,2 b	B
9	LAB 1801	61,5 b	4,5 a	13,7 b	20,5 a	R
10	EF 1501	60,2 b	4,2 b	14,4 b	18,8 b	B
11	HBR 2400	56,3 b	4,0 b	14,0 b	16,0 b	R
12	NMB 1301	56,1 b	4,6 b	12,2 b	22,6 a	R
13	HBB 2401	55,0 b	4,7 a	11,7 b	20,3 a	B
14	JR 1601	47,2 c	4,4 b	10,8 b	14,6 b	R
15	ASB 201	42,7 c	4,3 b	9,9 b	17,0 b	R
	Média geral	66,2	4,5	14,7	19,6	
	CV (%)	17	12,5	17,9	23,3	

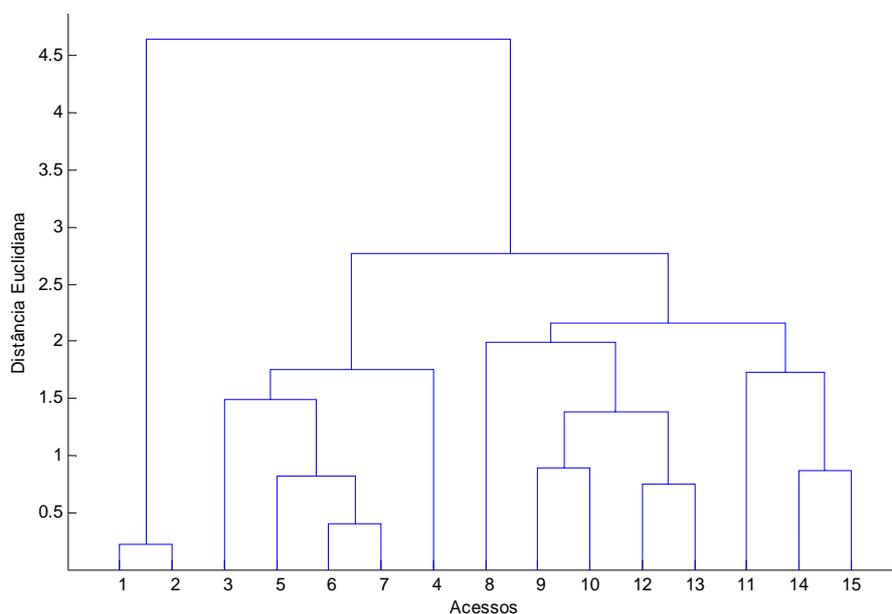
*Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). B- folha branca/ R- folha roxa

Tabela 2 Características de acessos de curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) com idade de 12 meses (grupo 2) do Banco de Germoplasma Embrapa Amazônia, Belém, PA., 2010

Número do acesso	Acesso	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Comp/larg	Número de folhas	Cor da folha
1	PEMATEC R	122,6 a*	4,7 a	25,6 a	22,0 a	R
2	PAB 900	109,5 a	4,4 a	24,9 a	14,0 b	R
3	DR 500	106,7 a	5,0 a	21,3 b	24,4 a	R
4	EMBRAPA R	105,3 a	4,0 a	26,3 a	26,9 a	R
5	PPR 400	104,2 a	4,3 a	24,3 a	28,4 a	R
6	TR 300	101,4 a	4,6 a	22,0 b	23,6 a	R
7	PEMATEC B	93,8 b	3,8 b	24,7 a	20,4 a	B
8	ANR 1200	107,7 a	4,1 a	26,3 a	26,7 a	R
9	AB 101	85,2 b	3,6 b	23,8 a	22,6 a	B
10	NVR 1000	93,0 b	3,6 b	25,8 a	17,7 b	R
11	RSB 1101	72,8 c	4,0 a	18,5 b	16,7 b	B
12	MFR 800	86,0 b	4,1 a	21,0 b	22,3 a	R
13	RSR 1100	107,0 a	4,8 a	22,1 b	14,8 b	R
14	BFR 600	74,7 c	3,9 a	19,3 b	21,0 a	R
15	ANB 1201	88,1 b	3,4 b	25,9 a	21,2 a	B
16	NVB 1001	63,9 c	3,1 b	20,7 b	14,0 b	B
17	PAB 901	78,97 c	3,7 b	21,4 b	17,5 b	B
18	EMBRAPA B	78,7 c	3,6 b	21,9 b	15,0 b	B
19	PPB 401	68,8 c	3,5 b	19,6 b	18,8 b	B
20	MFB 801	62,7 c	3,2 b	19,6 b	18,3 b	B
21	DB 501	51,3 d	3,0 b	17,1 c	13,3 b	B
22	MB 002	67,2 c	3,2 b	21,0 b	18,0 b	B
23	TB 301	62,1 c	3,7 b	16,8 c	16,2 b	B
24	CB 201	46,8 d	3,0 b	15,6 c	13,8 b	B
25	BB 701	43,0 d	2,9 b	14,8 c	9,2 b	B
26	BFB 601	39 d	2,2 b	17,8 c	9,5 b	B
	Média geral	80,8	3,7	20,7	18,9	
	CV (%)	25,6	17,6	17,1	28	

*Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). B- folha branca/ R- folha roxa

Pela análise do dendrograma obtido com base na distância Euclidiana, pode-se observar pela distância média entre os genótipos que há um grupo maior composto por 13 acessos constituídos por 3 subgrupos e um grupo menor composto pelos acessos 1 e 2 (Gráfico 1). Observa-se pelo dendrograma que os acessos 1 e 15 foram os mais contrastantes e o 1 e o 2 os mais similares. Os resultados apresentados indicam que num programa de melhoramento os acessos dos 3 subgrupos (3 a 7; 8, 9, 10, 12 e 13; 11, 14 e 15) que tiveram as maiores similaridades, a fim de maximizar a heterose, não poderiam ser cruzados entre si.



1	JR1601	6	HBB2401	11	AMR2300
2	ASB201	7	NFB1901	12	FNR2100
3	NMB1301	8	LAB1801	13	JPB1401
4	HB 2400	9	NLR2200	14	SRR2500
5	HB 2400	10	SA1701	15	FMR2600

Gráfico 1 Agrupamento dos acessos de curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) com idade de seis meses (grupo1) pelo método UPGMA, com base na diversidade genética expressa pela Distância Euclidiana média

Pela análise de componentes principais utilizando quatro caracteres, a variância acumulada pelos dois primeiros componentes foi de 94,22% da variação total observada, sendo que a primeira componente principal explica 59,62% e a segunda 34,60% (Gráfico 2). Segundo Mardia, Kent e Bibby (1979), se os primeiros componentes acumularem uma porcentagem relativamente alta da variação total, em geral, acima de 80%, eles explicam satisfatoriamente a variabilidade manifestada entre os indivíduos avaliados.

De forma geral, a análise de componentes principais mostrou grupos semelhantes aos observados no dendrograma do Gráfico 1. Observa-se no Gráfico 2 que o gráfico de escores tem a separação marcante dos acessos 1 e 2, mantendo-se como um grupo mais distante e isolado dos demais.

Também pode-se notar pelo gráfico de escores (Gráfico 2) que houve a formação de subgrupos característicos àqueles do dendrograma (Gráfico 1) para os acessos que compuseram o maior grupo, como os que unem os acessos 3, 5, 6, 7 e 11, 14 e 15. Pela análise do gráfico de pesos sobre o gráfico de escores (Gráfico 2) observa-se que os caracteres que determinaram a separação desses dos últimos subgrupos foram o número e a largura das folhas.

Como já foi observado pelo teste de médias na tabela (1), houve diferença expressiva dos acessos 14 e 15. Assim, comparando esse dado com a análise de componentes principais demonstrada pelo Gráfico 2, o caractere de maior encargo foi dado pela relação comprimento/largura.

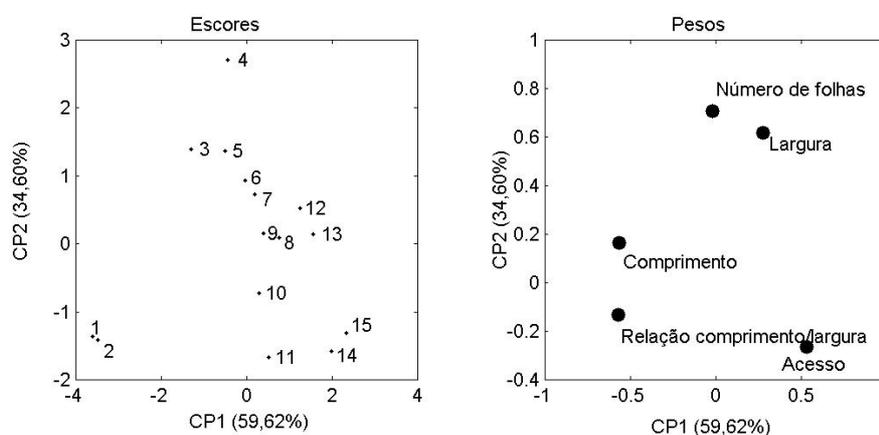
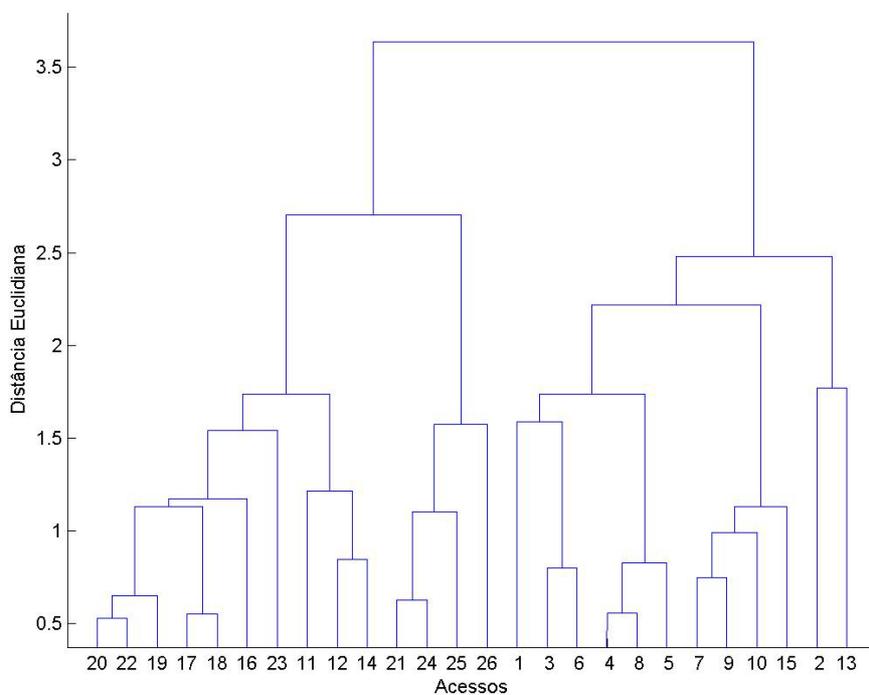


Gráfico 2 Representação gráfica da análise de componentes principais de 15 acessos de curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) com idade de seis meses (grupo 1) a partir das quatro variáveis. Utilize a legenda do Gráfico 1 para identificar os acessos

No dendrograma de similaridade, obtido pela distância Euclidiana, entre os 26 acessos de curauá (grupo 2) observou-se a formação de dois grandes grupos e dentro deles a formação de vários subgrupos, sendo os grandes grupos formados por 14 acessos e 12 acessos (Gráfico 3). Observam-se pelo dendrograma que os acessos MFB 801 (acesso 20) e RSR 11 (acesso 13) foram os mais contrastantes, e os acessos MFB 801 (acesso 20) e MB 002 (acesso 22) os mais próximos geneticamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Costa, Lameira e Yosbino (2002), em estudo com curauá. Utilizando marcadores RAPD, observou que os acessos PAB 900 e RSR 1100 também apresentam alta distância genética em relação aos outros grupos de acessos.



1	PEMATEC R	11	RSB 1101	21	DB 501
2	PAB 900	12	MFR 800	22	MB 002
3	DR 500	13	RSR 1100	23	TB 301
4	EMBRAPA R	14	BFR 600	24	CB 201
5	PPR 400	15	ANB 1201	25	BB 701
6	TR 300	16	NVB 1001	26	BFB 601
7	PEMATEC B	17	PAB 901		
8	ANR 1200	18	EMBRAPA B		
9	AB 101	19	PPB 401		
10	NVR 1000	20	MFB 801		

Gráfico 3 Agrupamento dos acessos de curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) com idade de doze meses pelo método UPGMA, com base na diversidade genética expressa pela distância euclidiana média

Foi obtida a representação gráfica das 4 variáveis e a distribuição dos 26 acessos sobre os dois primeiros componentes principais, sendo que a variância acumulada pelos dois primeiros componentes foi de 90,10% da variação total observada, sendo que a primeira componente principal explica 80,11% e a segunda 9,99% (Gráfico 4).

Os acessos MFB801 (acesso 20) e MB002 (acesso 22) estão próximos no gráfico de escores, resultado coincidente com o do dendrograma. O dendrograma e a análise de componentes principais também corroboram quanto à separação do acesso BFB601 (acesso 26).

A representação gráfica da análise de componentes principais dos 15 acessos com 6 meses de idade mostrou a distribuição dos acessos de forma mais semelhante à apresentada no agrupamento UPGMA do que a representação gráfica dos componentes principais dos 26 acessos de 12 meses de idade.

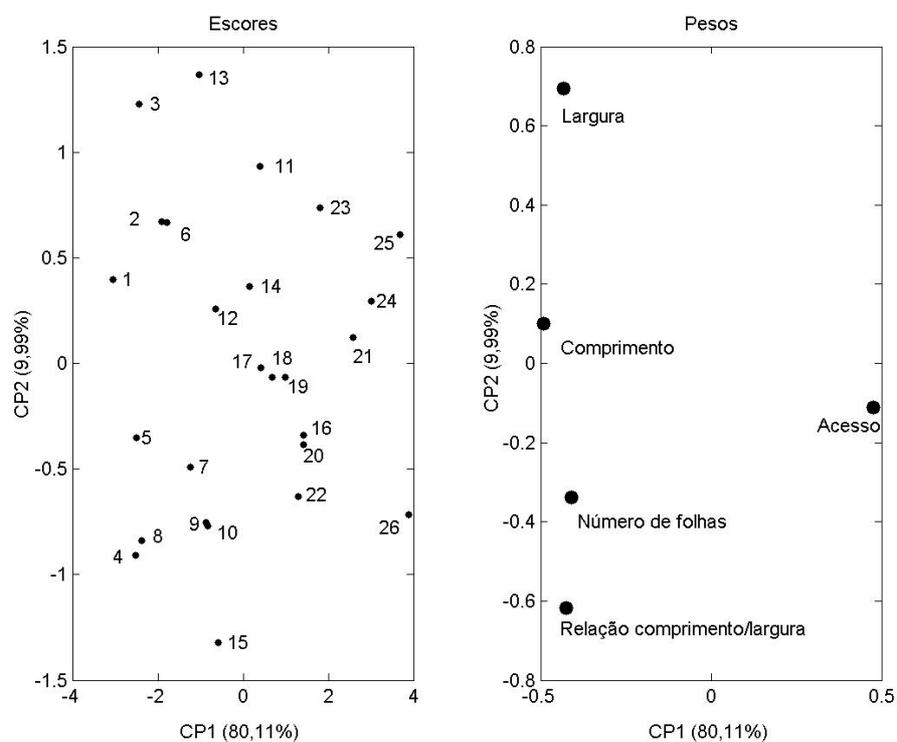


Gráfico 4 Representação gráfica da análise de componentes principais de 26 acessos de curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) com idade de doze meses a partir das quatro variáveis. Utilize a legenda do Gráfico 3 para identificar os acessos

De modo geral, os resultados podem ser úteis na identificação de populações divergentes, direcionando os cruzamentos entre acessos classificados em grupos distintos e com genótipos favoráveis para produção de fibras.

Embora a caracterização morfo-agronômica seja vista com uma medida indireta da variabilidade total dos acessos, neste trabalho ela foi capaz de detectar acentuada diversidade entre todos os caracteres e entre todos os acessos. Entretanto, vale ressaltar a importância da avaliação do germoplasma do curauá visando subsidiar programas de melhoramento.

4 CONCLUSÃO

Foi possível encontrar ampla variabilidade genética entre os acessos de *Ananas comosus* var. *erectifolius* com a utilização dos descritores morfológicos, tanto para os acessos do grupo 1 quanto para os acessos do grupo 2, o que indica que esses descritores podem ser utilizados em programas de melhoramento genético de curauá. Recomendam-se cruzamentos entre acessos superiores de grupos diferentes, devido a sua alta divergência.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. R. **Cinética de decomposição térmica de compósitos poliméricos com fibras de curauá**. 2003. 220 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)–Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- COPPENS, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2003. Disponível em: <<http://home.tiscali.nl/leodg/ht/lists-species2000+.html>>. Acesso em: 01 jun. 2010.
- COSTA, M. R.; LAMEIRA, O. A.; YOSBINO, V. C. Caracterização genética do curauá (*Ananas erectifolius*) através de marcadores RAPD. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 26, p. 28-30, maio/jun. 2002.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2003. v. 2.
- DA SILVA, R. V. et al. Desenvolvimento de um compósito laminado híbrido com fibras natural e sintética. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 154-161, 2008.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 5.0. Lavras: UFLA, 2007.
- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic, 1979. 521 p.
- RAMALHO, E. **A folha amazônica que virou arte**. 2005. Disponível em: <http://www.rfi.fr/actubr/articles/068/article_124.asp>. Acesso em: 15 out. 2010.
- VIEIRA, L. D. J. et al. Caracterização morfológica de acessos de abacaxizeiro. **Revista Eletrônica da FAINOR**, Vitória da Conquista, v. 3, n. 1, p. 68-77, jan./dez. 2010. Disponível em: <<http://srv02.fainor.com.br/revista/index.php/memorias/article/viewFile/74/69>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

CAPÍTULO 3

Indução de brotação *in vitro* em curauá: sistema de cultivo e concentrações de BAP e TDZ

RESUMO

O curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) é uma planta de utilização múltipla e empregada na indústria automobilística, celulósica e outras, devido à presença de fibras lignocelulósicas em suas folhas. É uma bromeliácea nativa da Amazônia, caracterizada por uma planta rústica que cresce até em solo arenoso e pouco fértil, chegando a atingir entre um metro e um metro e meio de altura. Diante do grande interesse comercial que envolve a cultura do curauá e da carência de estudos sobre sua propagação, objetivou-se comparar a eficiência do cultivo *in vitro* de curauá em sistema estacionário e sob agitação em meio líquido sob efeito de BAP ou TDZ na indução de múltiplos brotos. Para o experimento que avaliou a influência das concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg. L⁻¹) em diferentes sistemas de cultivo, os resultados indicaram que um aumento na concentração desse regulador foi eficiente no aumento do número de brotações (5,0) e da biomassa fresca, já para o tamanho das brotações a ausência deste regulador proporcionou os melhores resultados. Com relação ao sistema de cultivo, o estacionário levou a um aumento da biomassa seca e dos teores de clorofila. Já para o experimento que avaliou as diferentes concentrações de TDZ (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg. L⁻¹) sob dois sistemas de cultivo, constatou-se que o aumento da concentração de TDZ também favoreceu o aumento da área (135,03 mm²) e do diâmetro da massagem (14,47 mm), e do número de brotações (60), entretanto elevadas concentrações inibiram o desenvolvimento *in vitro*. Assim, recomenda-se para propagação clonal em curauá o cultivo em meio MS acrescido de 3,0 mg L⁻¹ de TDZ sob sistema estacionário para obtenção de um maior número de brotações com menores custos.

Palavras-chave: Reguladores de crescimento. Micropropagação. Fibras vegetais.

ABSTRACT

Curaua (*Ananas comosus* var. *erectifolius*) is a multiple used plant in the car industry, cellulose and others due to its lignocellulose fibres in their leaves. It is an Amazon native bromeliaceae been a rustic plant that grows even in sand an unfertile soil, it can reach from one to one and half meter high. Due to the great trade interest that involves curauá culture and the lack of works about its propagation, the present work had as purpose to compare the curauá culture efficiency *in vitro* static system and under shaking in liquid medium under BAP e TDZ effect leading to multiple shoots. For the experiment evaluating the influence of concentrations of BAP (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg. L⁻¹) in different cropping systems, the results showed that increasing concentration of this regulator the numbers of shoots (5.0) and fresh biomass increased, without grow regulator the size of the shoots were better. Related to the culture system the static one increased the dry biomass and the chlorophyll levels. As for the experiment that evaluated different concentrations of TDZ (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg. L⁻¹) under two cropping systems, increasing TDZ concentration the area and cluster shoots diameter and the plants numbers also increased (135.0.mm²), (14.47mm) and (60), respectively, although higher concentration inhibit the *in vitro* development. Thus, it is recommended for clonal propagation in curauá cultivation in MS medium supplemented with 3.0mgL⁻¹ TDZ under stationary system to obtain a higher number of shoots with lower costs.

Keywords: Growth regulations. Micropropagation. Vegetable fiber.

1 INTRODUÇÃO

O uso de matérias-primas naturais vem sendo objeto de diversos estudos e pesquisas, devido ao seu grande potencial na substituição de derivados petroquímicos. As fibras vegetais são úteis na indústria automobilística para o revestimento interno de automóveis, ônibus e caminhões, e na construção civil (MOTHE; ARAÚJO, 2004). Entre as espécies da Região Amazônica com potencial para produção de fibras, destaca-se o curauá [*Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) COPPENS; LEAL (2003)]. No Brasil e no exterior, a fibra de curauá tem sido amplamente estudada, e tem resultados significativos, o que torna essa espécie uma das mais promissoras entre as espécies da Amazônia Brasileira.

Nas bromélias, a propagação clonal por divisão natural de brotações laterais é de baixa frequência, originando poucos rebentos/planta/ano; já a propagação por meio da cultura de tecidos tem muitas vantagens, principalmente com a obtenção de mudas uniformes, de alta qualidade e livres de doenças, permitindo a multiplicação rápida e geneticamente confiável (RECHI FILHO, 2003).

O estabelecimento e a propagação *in vitro* de uma espécie são influenciados por vários fatores. Entre os mais importantes estão os nutrientes minerais e reguladores de crescimento no meio de cultura que, em combinação com outros fatores, como o estado físico, proporciona a propagação efetiva de cada espécie (FORTES; PEREIRA, 2001).

A alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento de plântulas *in vitro* (CHEN; ZIV, 2001). Assim, o maior contato dos explantes com meio, que acontece nos cultivos em meio líquido, pode aumentar a absorção de água e nutrientes quando comparado ao meio semi-

isólido, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação de brotos e, ainda, acúmulo de massa seca (PEREIRA; FORTES, 2003).

Alguns estudos relacionados com o estado físico do meio de cultura em bromeliáceas têm sido realizados, principalmente com abacaxizeiro (ESCALONA et al., 1999; FEUSER; NODARI; GUERRA, 2001; OLIVEIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008), com o objetivo de otimizar protocolos de propagação e, especialmente de reduzir os custos deste sistema. No entanto, poucas espécies de bromélias tem protocolo estabelecido e otimizado para micropropagação.

Para induzir o crescimento dos explantes *in vitro*, recomenda-se a adição de uma citocinina ao meio de cultura inicial (MACHADO et al., 2006), sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada e a mais efetiva para um grande número de cultivares (AYUB et al., 2010; MORAES et al., 2010). O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de apresentar um custo acessível com relação a outras citocininas.

O TDZ tem propriedades biológicas similares àquelas das citocininas (MOK et al., 1987) quando adicionado ao meio nutritivo, é eficiente para proliferação e diferenciação de gemas axilares e está sendo muito utilizado na propagação clonal de bromélias (HUANG et al., 2010; PAIVA et al., 2009).

Considerando a carência de estudos sobre a propagação desta espécie, objetivou-se comparar a eficiência do cultivo *in vitro* de curauá em sistema estacionário e sob agitação do meio líquido sob efeito de BAP e TDZ na indução de múltiplos brotos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro* de curauá

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Plantas matrizes de curauá, acesso EMBRAPA R, cultivadas em casa de vegetação com idade de 24 meses, foram utilizadas como doadoras dos explantes.

Para obtenção dos explantes foram selecionadas plantas com cerca de 50-60 cm de comprimentos, contendo gemas apicais e axilares de aproximadamente, 3-4 mm. O material vegetal foi lavado sob água corrente e retiradas as raízes e folhas, ficando apenas o tolete. As gemas foram então retiradas com auxílio de um bisturi, desinfestadas por imersão em solução etanólica 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 30 minutos.

Em seguida, sob câmara de fluxo laminar, após três lavagens utilizando água destilada e autoclavada, as gemas foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo cerca de 12,0 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose e 3,5 mg.L⁻¹ de BAP. O meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e, em seguida, autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 20 min.

Os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob 25 µmol m⁻²s⁻¹ de intensidade luminosa, temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro.

Após o estabelecimento, as plântulas foram mantidas *in vitro* em meio MS líquido livre de reguladores de crescimento.

2.2 Influência do cultivo *in vitro* em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de BAP

Das plântulas de curauá preestabelecidas *in vitro*, conforme descrito no estabelecimento, foram retiradas folhas, cuja porção basal medindo, aproximadamente, 1,5 cm foi utilizada como explante.

Os explantes foram inoculados em frascos de 250 mL (9,5 X 5,5 cm) contendo 15 mL de meio MS líquido suplementado com 4 concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg. L⁻¹).

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro, sendo 2 as variações do sistema de cultivo (estacionário e agitação contínua a 110 rpm aproximadamente).

Após 30 dias, foram transferidos para meio MS livre de reguladores, visando o alongamento das brotações e, após 45 dias, avaliou-se o número médio de brotações formadas, o comprimento médio das brotações (cm), as biomassas fresca e seca (mg) e teores de clorofilas a, b e total.

O comprimento das plantas foi determinado com o auxílio de uma régua, a medição foi feita da base da planta até o ápice da maior folha. Para determinação da biomassa fresca, as brotações foram mensuradas em balança analítica (Modelo Mettler AE100) com precisão de 0,0001mg, imediatamente após a sua remoção de dentro do frasco. Para determinação da biomassa seca, as brotações foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 5 dias. Após esse período o material vegetal foi mensurado em balança analítica.

Os teores de clorofila foram avaliados em extratos obtidos após a maceração de 0,1 g de matéria fresca de folhas. As amostras foram maceradas em almofariz com 5 mL de acetona (80%), sendo o extrato filtrado e o volume completado para 10 mL, em sala escura mantida com luz verde. A absorbância dos extratos foi mediada em 663 e 645 nm para clorofila a e b, respectivamente, empregando acetona como branco. O teor de clorofila total foi calculado conforme a metodologia de Arnon (1949).

2.3 Influência do cultivo *in vitro* em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de TDZ

Porções basais de curauá com aproximadamente 1 cm, obtidas a partir de plântulas preestabelecidas *in vitro* (item 3.1) foram inoculadas em frascos de 250 mL (9,5 x 5,5 cm) contendo 15 mL de meio líquido suplementado com 4 concentrações de TDZ (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg. L⁻¹).

Os frascos foram mantidos sob as mesmas condições descritas para o experimento do item 3.2. Depois de 30 dias foram transferidos para meio MS livre de reguladores, visando o alongamento das brotações e, após mais 45 dias, avaliou-se o número médio de brotações formadas, o diâmetro do aglomerado de brotações (mm), a área do aglomerado de brotações (mm²) e a biomassa seca (mg).

O diâmetro e a área do aglomerado de brotações foram mensurados empregando captura de imagem através do microscópio digital Dino-Lite[®] Pro-AM413T e recursos de medição utilizando *software* Dino-Video Capture Application[®] versão 3.3.0.0

Para determinação da biomassa seca, as brotações foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar a 60

°C por 5 dias. Após esse período o material vegetal foi mensurado em balança de analítica.

2.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos correspondentes aos itens 4.2 e 4.3 foram conduzidos em esquema fatorial 2 x 4, sendo 2 as variações do sistema de cultivo (estacionário e agitação contínua a cerca de 110 rpm, aproximadamente) e 4 concentrações dos reguladores de crescimento, totalizando 8 tratamentos em cada experimento. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 8 repetições, sendo 4 explantes por frasco.

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$). Para comparação do sistema de cultivo as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para comparação das concentrações de TDZ foi utilizada a Regressão Polinomial a 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

A fim de realizar uma análise exploratória dos dados foi realizada uma Análise de Componente Principal (PCA-Principal Component Analysis) em ambos os experimentos. A PCA foi aplicada aos valores médios das variáveis de respostas de cada tratamento. Foi tratada uma matriz 8x4 (8 tratamentos x 4 variáveis de respostas). Os dados foram pré-processados empregando autoescalamento e os resultados estão demonstrados pelos gráficos dos escores e dos pesos, com duas componentes principais (PC) explicadas pelas suas variâncias. Os cálculos foram feitos no *software* “MATLAB[®] 7.5”.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro*

No estabelecimento *in vitro* de gemas de curauá, a porcentagem de contaminação por fungos e bactérias foi pequena (5-10%). Esse resultado indica a eficiência do processo de assepsia utilizado.

As gemas apresentaram maior desenvolvimento quando cultivadas em meio MS sólido suplementado com 3,5 mg.L⁻¹ de BAP, sendo possível a obtenção de plântulas para os demais experimentos.

3.2 Influência do cultivo *in vitro* em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de BAP

O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode ser observado no Gráfico 1. A interação foi não significativa para o número médio de brotações. Apenas a concentração do regulador de crescimento influenciou essa variável resposta, sendo que, com o aumento das concentrações de BAP, resultou em um comportamento linear crescente para o número de brotações.

Resultados similares aos de Brum, Silva e Pasqual (2002) que relatam a ação desse regulador na divisão celular e quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical. Quando se utilizou 3,0 mg L⁻¹ do regulador alcançou-se o número máximo de brotações (5) por explante.

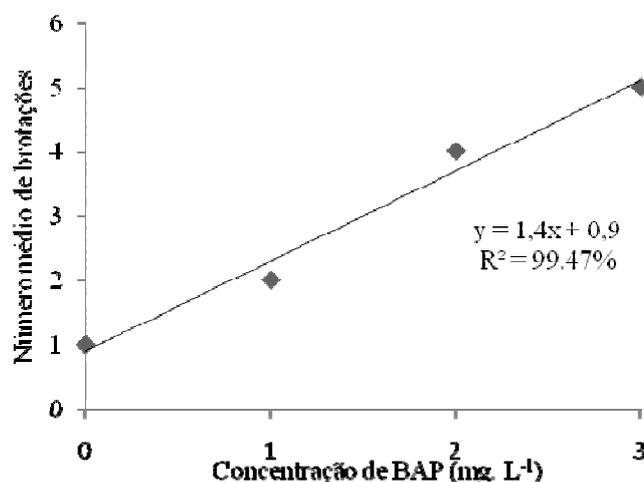


Gráfico 1 Número médio de brotações em *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias

Resultados similares foram obtidos por Vicente, Almeida e Carvalho (2009), avaliando a influência de concentrações de BAP em *Vernonia condensata*, constataram-se que maiores concentrações do regulador proporcionaram a melhor resposta com relação ao número de brotações por explantes. Já, Flores et al. (2009), estudando o comportamento de ginseng brasileiro, obtiveram um número médio de brotações de 2,6 em concentrações de 2,6 μ M de BAP.

Pasqual et al. (2008) estudando a micropropagação do abacaxizeiro também observaram que o aumento das concentrações de BAP, na ausência de ágar, promoveu aumento linear no número de brotos e quando se utilizou 1,5 mg L⁻¹ do regulador alcançou-se o número máximo de 21 brotações por explante.

Quanto ao comprimento das brotações, houve interação entre o sistema de cultivo e a concentração de BAP, sendo que tanto o sistema de cultivo estacionário quanto o de agitação contínua apresentaram comportamento quadrático (Gráfico 2). Em ambos os casos, o aumento da concentração de BAP levou a uma redução do comprimento das brotações de curauá. O maior

crescimento dos explantes na ausência de BAP pode ser atribuído ao efeito desse regulador de crescimento na morfogênese *in vitro*, pois o mesmo aumenta a taxa de multiplicação dos explantes, porém reduz o crescimento das brotações (VILLA, 2008).

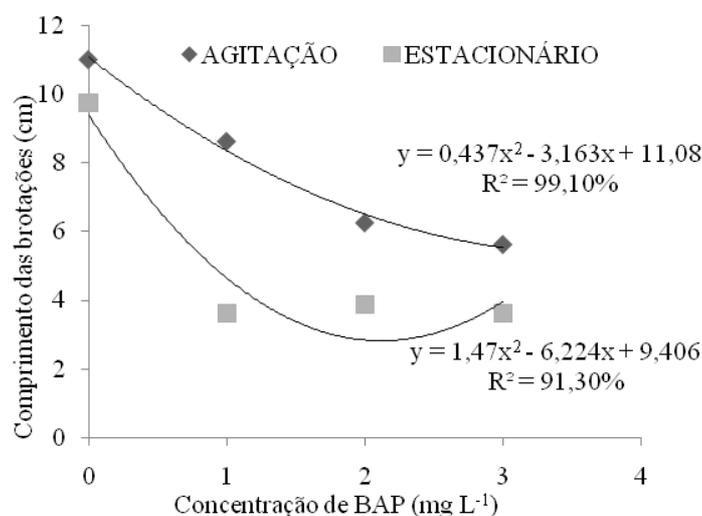


Gráfico 2 Comprimento médios das brotações de *Ananas comosus* var. *erectifolius* em sistema estacionário e sob agitação contínua (shaker) submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias

No sistema sob agitação, as plântulas tiveram comprimento médio de 11,0 cm sem regulador de crescimento e 5,8 cm com a suplementação de 3,0 mg L⁻¹ de BAP. No sistema estacionário, foi de 9,7 cm sem regulador e 3,9 com a suplementação de 3,0 mg L⁻¹ de BAP. Esta diferença de tamanho nas brotações nos sistemas de cultivo pode ser atribuída à maior aeração no sistema de agitação em relação ao estacionário.

Pasqual et al. (2008) avaliando a influência de diferentes concentrações de BAP observaram que, para a variável altura média dos brotos, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 2,5 g L⁻¹ de ágar na ausência de BAP,

registrando-se 9,60 cm. Esses autores verificaram que doses crescentes de BAP levaram a redução na altura média de brotos.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, a exemplo de Paiva et al. (1997) que, trabalhando com gloxínia, observaram redução do tamanho de brotos com o aumento das concentrações de BAP. Moreira (2001), trabalhando com abacaxizeiro cv. Pérola, observou resultados semelhantes, sendo que o meio MS sem regulador de crescimento mostrou-se mais eficiente para se obter melhor desenvolvimento das plantas.

Dessa forma, a diminuição no comprimento causado por altas concentrações de BAP, provavelmente, deve-se a uma maior divisão celular levando a um menor tamanho das células, e essa maior quantidade de células e de brotações, pode levar a uma competição entre elas, menor disponibilidade de nutrientes, justificando assim um menor comprimento das brotações.

As plântulas cultivadas em meio líquido com agitação cresceram mais que as que foram mantidas em estado estacionário (Gráfico 2). Segundo Alvard, Cote e Teisson (1993) e Grattapaglia e Machado (1998), geralmente, cultivos em meio líquido requerem um suporte ou agitação. Por tal razão, é provável que a agitação do meio líquido tenha favorecido melhor a condição de aeração necessária para a respiração do explante, controlando com maior eficiência as condições do ambiente *in vitro*, proporcionando, assim, maior crescimento do explante.

Também trabalhando com curauá, Pereira et al. (2008), avaliando a influência da consistência do meio de cultivo na obtenção de mudas, provenientes de brotos estiolados, concluiu que o tratamento em meio líquido com agitação contínua foi o que produziu as maiores plântulas (4,5 cm), seguido do meio líquido sem agitação (2,7) e por último meio solidificado com ágar a 0,6 % (1,8 cm).

Para a variável biomassa fresca, a interação sistema de cultivo e concentração de BAP foi significativa, sendo que o sistema mantido sob agitação proporcionou maior hidratação observado pelo comportamento linear crescente com o aumento das doses de BAP (Gráfico 3).

O sistema de cultivo estacionário apresentou uma constante, não havendo diferença estatística entre as concentrações de BAP na biomassa fresca das plantas (1771,56 mg).

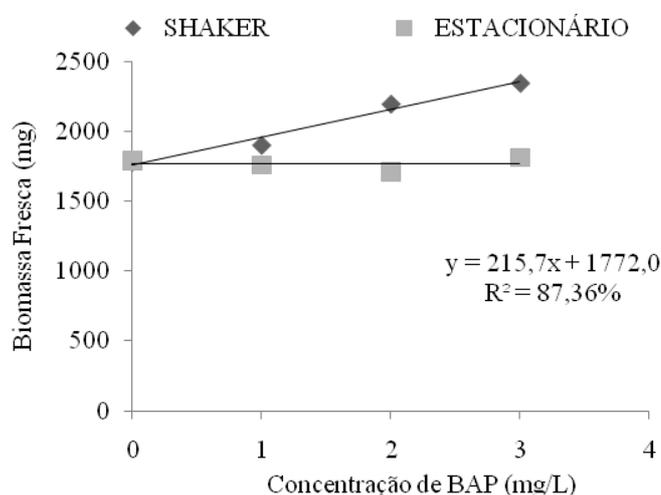


Gráfico 3 Biomassa fresca das plantas de *Ananas comosus* var. *erectifolius* em sistema estacionário e sob agitação contínua (shaker) submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias

A variável biomassa seca de brotação não teve interação. Houve efeito significativo para o sistema de cultivo, no qual o estacionário teve a maior biomassa seca (119,94 mg), seguido do agitação com 100,94 mg (Tabela 1). Esse dado confirma o estado hiperhídrico demonstrado para as brotações, que foram mantidas sob agitação, uma vez que apresentaram menor biomassa seca.

Tabela 1 Valores médios da biomassa seca das brotações (BS) nos diferentes sistemas de cultivo de *Ananas comosus* var. *erectifolius*

Sistema	BS (mg)
Estacionário	119,94 a*
Agitação	100,94 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Foi possível observar diferença de coloração entre as plantas desenvolvidas em sistema de cultivo estacionário e sob agitação contínua (Figura 1), as plântulas mantidas no *shaker* tiveram uma coloração verde mais clara que as do estacionário. Para confirmar os dados fenotípicos realizaram-se análises de teores de clorofila, os quais corroboraram com os resultados apresentados anteriormente (Tabela 2).



Figura 1 Brotações de *Ananas comosus* var. *erectifolius* sob agitação contínua (1) e em sistema estacionário (2) cultivadas em meio MS suplementado com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, aos 45 dias

O crescimento da plântula *in vitro* pode ser afetado pelos fatores inerentes das condições de cultivo (CO_2 , O_2 , etileno, meio de cultivo) tanto na região aérea como na da raiz. No sistema estacionário, as plântulas apresentaram maiores teores de clorofila que as plântulas desenvolvidas sob agitação contínua.

Apesar de não terem sido mensuradas as taxas de CO₂ e O₂ dentro dos frascos, pode-se inferir que a agitação proporcionou maiores concentrações de O₂ e menores concentrações de CO₂. Assim, houve menor síntese de clorofila, tanto para clorofila b quanto para total, no sistema com agitação em relação ao estacionário. Tanaka, Watanabe e Shimada (1991), mostraram que uma redução do O₂ aumentou a taxa fotossintética em plântulas de *Chrysanthemum*.

Tabela 2 Teores de clorofila b e total das brotações nos diferentes sistemas de cultivo de *Ananas comosus* var. *erectifolius*

Sistema	Teor de clorofila b ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Teor de clorofila total ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
Estacionário	1,00 a*	2,33 a
Agitação	0,42 b	1,42 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Também foi possível verificar diferença estatística para teores de clorofila a e total, para as diferentes concentrações de BAP. Com o aumento da concentração do regulador houve uma queda nos teores de clorofila a e total, representado pelo comportamento linear negativo observado no Gráfico 4.

Essa redução nos teores de clorofila pode estar relacionada com o fato de um aumento da concentração de BAP levar a uma maior quantidade de brotações, criando assim, um ambiente de competição e stress entre as mesmas, podendo ter ocorrido uma ausência parcial de luz, acarretando menores teores de clorofila nas brotações desenvolvidas em altas concentrações de citocinina.

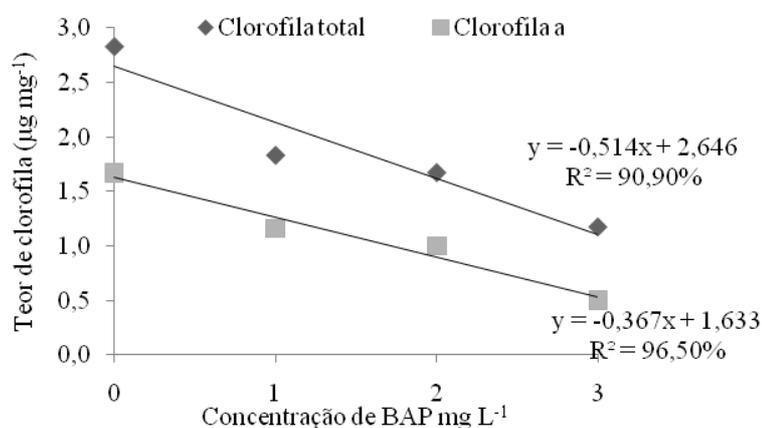


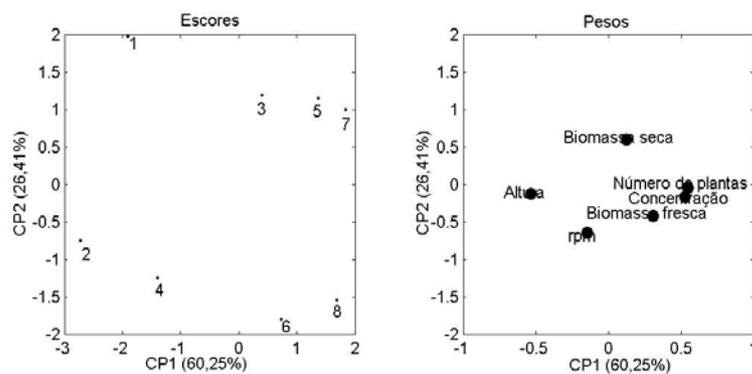
Gráfico 4 Teor de clorofila total das plantas de *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidas a diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias

O resultado das análises de componentes principais apresentou duas componentes que descrevem 86,66% dos dados, sendo que a primeira componente principal explica 60,25% e a segunda 26,41%. O gráfico de escores e pesos apresentado pela relação das duas componentes principais ($CP1 \times CP2$) é mostrado no Gráfico 5. Para os tratamentos que foram mantidos em sistema estático, observa-se nítida separação entre aqueles que contêm doses de reguladores de crescimento daqueles isentos de regulador. Já para os tratamentos que foram mantidos sob agitação observa-se pelo gráfico de escores que os tratamentos com ausência e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP foram agrupados em um grupo e com $2,0$ e $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em outro grupo, cujos dados são explicados pela CP1.

O gráfico de pesos para o modelo PCA foi construído para se observar a importância de cada variável nas PC1 e PC2, visto que essas apresentaram maior variância explicada. Nota-se no Gráfico 5 (gráfico de pesos) que o fator concentração de regulador foi determinante para a multiplicação de curauá, pois se observa a proximidade das variáveis número e biomassa seca das brotações

com a concentração. Sobrepondo o gráfico de pesos sobre o de escores, observa-se que, apesar da presença do regulador crescimento nos tratamentos 6 e 8, a agitação não contribuiu para a multiplicação *in vitro* de curauá.

Os resultados da PCA corroboram com àqueles observados para as análises estatísticas convencionais, pois essa última demonstrou que as maiores concentrações de BAP em sistema estático induziram a melhor multiplicação das brotações, mas a PCA destaca que as variáveis número e biomassa seca dos brotos foram as respostas mais restritivas para esse resultado.



Tratamento	rpm	BAP (mg L ⁻¹)	Tratamento	rpm	BAP (mg L ⁻¹)
1	0	0	5	0	2
2	110	0	6	110	2
3	0	1	7	0	3
4	110	1	8	110	3

Gráfico 5 Análise de componentes principais da avaliação de crescimento *in vitro* de *Ananas comosus* var. *erectifolius*, aos 45 dias

3.3 Influência do cultivo *in vitro* em sistema estacionário e sob agitação do meio de cultura sob diferentes concentrações de TDZ

Observou-se o crescimento e desenvolvimento de brotações axilares em todos os tratamentos experimentais. A interação foi significativa apenas para a variável biomassa seca das brotações. Para as demais variáveis analisadas (número de brotações, diâmetro e área do aglomerado de brotações) os fatores sistema de cultivo e concentração de TDZ foram significativos apenas quando analisados separadamente.

A concentração de TDZ é um fator importante a ser considerado no cultivo *in vitro* de curauá. Como pode ser observado no Gráfico 6, o aumento da concentração do regulador levou a um maior número de brotações, sendo que a concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ proporcionou o maior número de plântulas (60).

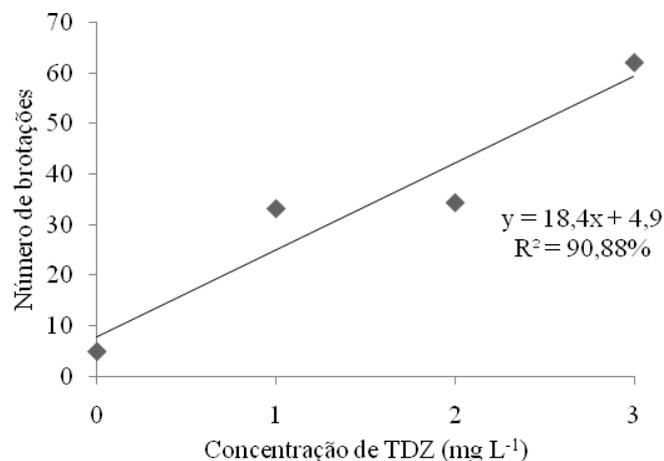


Gráfico 6 Número médio de brotações em *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidas a diferentes concentrações de TDZ, aos 45 dias

Como TDZ induziu um grande número de microbrotações no explante, decidiu-se fazer uma medição da massagema para avaliar o efeito do TDZ.

Apesar da maior concentração do TDZ avaliada ter apresentado o maior número de brotações, o maior diâmetro da massagema não foi observado nessa concentração. Observou-se um comportamento quadrático para essa variável de resposta, onde o ponto máximo foi observado no diâmetro de 14,47 cm com uma concentração de TDZ de 1,96 mg L⁻¹ (Gráfico 7).

Segundo Alves, Lemos e Costa (1995), o TDZ é mais ativo na multiplicação que outras citocininas, por causa do aumento da atividade da enzima fosfatase ácida, que promove a interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas, tornando-as biologicamente mais ativas, podendo manifestar-se como inibidor do crescimento, quando utilizado na mesma concentração de outras citocininas.

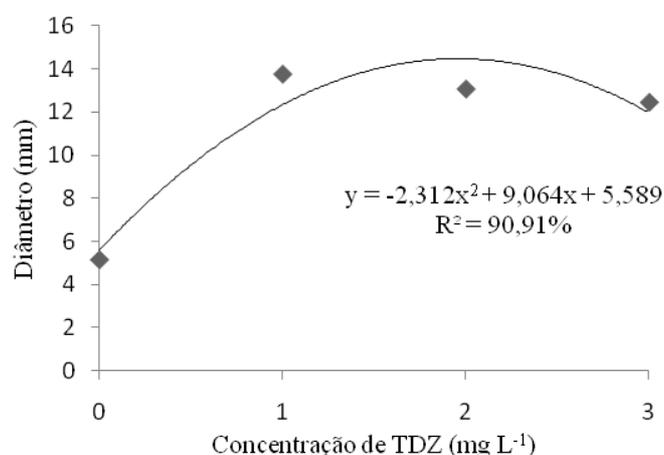


Gráfico 7 Diâmetro médio da massagema em *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidas a diferentes concentrações de TDZ, aos 45 dias

Assim, como o diâmetro do aglomerado de brotações, o aumento da concentração do regulador de crescimento também promoveu um aumento na área da massagem o qual apresentou um ponto máximo em 135,37mm, com uma concentração de 2,04 mg L⁻¹ de TDZ, a partir do qual sofreu um decréscimo (Gráfico 8).

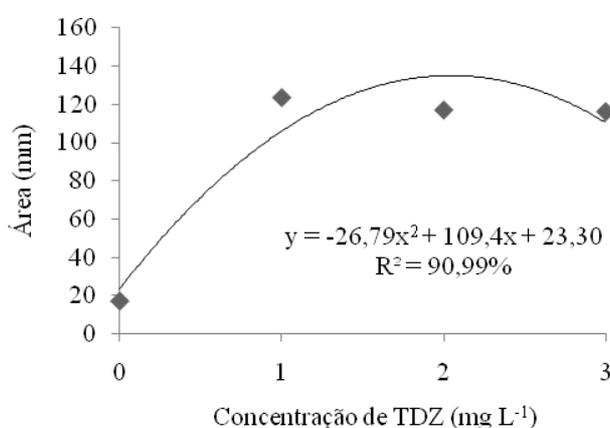


Gráfico 8 Área média da massagem em *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidas a diferentes concentrações de TDZ, aos 45 dias

Já para a biomassa seca (BS) da massagem, houve interação significativa entre o sistema de cultivo e a concentração de TDZ (Gráfico 9). A BS foi maior na ausência de TDZ para ambos os sistemas de cultivo avaliados. No entanto, o sistema de cultivo estacionário apresentou valores de biomassa seca maiores que o de agitação, sendo que na ausência do regulador, os valores foram de 182,3 e 97,54 mg, respectivamente.

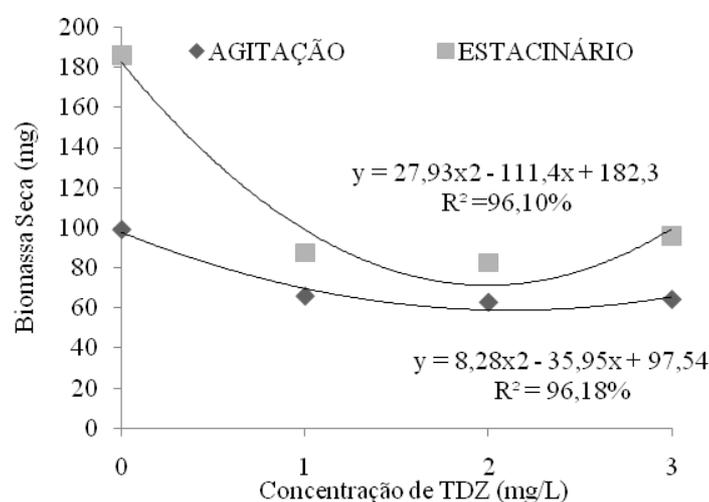
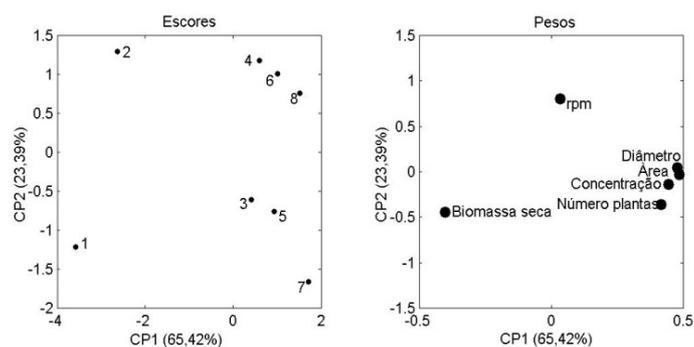


Gráfico 9 Biomassa seca da massagem em *Ananas comosus* var. *erectifolius* submetidas a diferentes concentrações de TDZ, aos 45 dias

A PCA apresentou duas componentes com variância acumulada de 88,81%, sendo que a primeira componente principal explica 65,42% e a segunda 23,39%. O gráfico de escores e pesos apresentado pela relação das duas componentes principais (CP1 \times CP2) é mostrado no Gráfico 10. Observa-se nítida separação, explicada pela CP1 (gráfico de escores), entre os tratamentos que contêm doses de reguladores de crescimento daqueles isentos de regulador e explicados pela CP2 dos tratamentos que foram mantidos na presença ou ausência de agitação. Já no gráfico de pesos observa-se que a CP2 isola o fator agitação, demonstrando assim como foi observado para o experimento com doses de BAP (item 5.2) que a concentração do regulador exerce maior influência na multiplicação de curauá que o fator agitação.

Comparando os gráficos de pesos e escores, observa-se que os tratamentos 3 ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e 5 ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) são os que tiveram melhores respostas para a indução de múltiplos brotos. Os resultados da PCA corroboram

com os resultados que apresentaram comportamento quadrático nas análises estatísticas convencionais.



Tratamento	rpm	TDZ (mg L ⁻¹)	Tratamento	rpm	TDZ (mg L ⁻¹)
1	0	0	5	0	2
2	110	0	6	110	2
3	0	1	7	0	3
4	110	1	8	110	3

Gráfico 10 Análise de componentes principais da avaliação de crescimento *in vitro* de *Ananas comosus* var. *erectifolius*, aos 45 dias

4 CONCLUSÃO

O aumento da concentração do BAP proporcionou maior número de brotações e maior biomassa fresca, porém inibiu o crescimento das brotações. O sistema de cultivo estacionário favoreceu o aumento da biomassa seca das brotações, assim como os teores de clorofila total.

Já para o TDZ, o aumento da concentração também favoreceu o aumento da área e do diâmetro do aglomerado de brotações, e do número de plantas, entretanto em elevadas concentrações inibe o desenvolvimento *in vitro*.

Recomenda-se para propagação clonal em curauá o cultivo em meio MS acrescido de 3,0 mg L⁻¹ de TDZ sob sistema estacionário para obtenção de um maior número de brotações com menores custos.

REFERÊNCIAS

- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid médium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 55-60, Jan. 1993.
- ALVES, R. M. M.; LEMOS, G. B.; COSTA, M. P. Efeitos do thidiazuron na atividade da fosfatase ácida durante a micropropagação da arnica (*Solidago microglosa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1995. p. 196.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.
- AYUB, R. A. et al. Indução de multibrotação *in vitro* em videira cv. Bordô. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 675-681, 2010.
- BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 1403-1409, 2002.
- CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture *Narcissus*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2001.
- COPPENS, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2003. Disponível em: <<http://home.tiscali.nl/leodg/ht/lists-species2000+.html>>. Acesso em: 01 jun. 2010.
- ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 9, p. 743-748, 1999.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 5.0. Lavras: UFLA, 2007.

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**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 6-10, 2001.

FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2001.

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

HUANG, P. L. et al. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 3, p. 267-402, Sept. 2010. Doi: 10.1007/s11240-010-9843-0.

MACHADO, M. P. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira VR 043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 648-655, 2006.

MOK, M. C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivates in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1194-7, 1987.

MORAES, A. B. de et al. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 932-936, 2010.

MOREIRA, M. A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola**. 2001. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MOTHE, C. G.; ARAUJO, C. R. de. Thermal and mechanical characterization of polyurethane composites with Curaua fibers. **Polímeros**, São Carlos, v. 14, n. 004, p. 274-278, 2004.

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

OLIVEIRA, M. K. T. et al. Propagação *in vitro* da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 3, p. 167-171, 2007.

PAIVA, P. D. de O. et al. *In vitro* propagation of *Nidularium fulgens* Lem. **Interciencia**, Caracas, v. 34, n. 8, p. 594-596, Aug. 2009.

PAIVA, P. D. de O. et al. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.

PASQUAL, M. et al. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 045-049, 2008.

PEREIRA, F. D. et al. Micropropagation of the fiber-rich amazonian species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae). **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 2134-2137, Dec. 2008.

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

RECHI FILHO, A. R. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 66 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

TANAKA, F.; WATANABE, Y.; SHIMADA, N. Effect of O₂ concentrations on photorespiration in *Chrysanthemum morifolium* plantlets *in vitro* cultured photoautotrophically and photomixotrophically. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 8, n. 2, p. 87-93, 1991.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.

VILLA, F. **Micropropagação e avaliação da tolerância ao alumínio em porta-exertos de videira**. 2008. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CAPÍTULO 4

Indução de brotações adventícias em gemas de brotos estiolados *in vitro* de curauá

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho a indução de brotações adventícias em gemas de brotos estiolados de curauá em diferentes meios de cultura, com Benzilaminopurina (BAP) e Tidiuron (TDZ), em concentrações de 0; 0,5; 1,0mg.L⁻¹. Os brotos estiolados foram seccionados em segmentos contendo apenas um nó aproximadamente e inoculados horizontalmente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, seguindo um esquema fatorial 3 x 3, sendo 3 concentrações de TDZ (0,0; 0,5; 1,0 mg. L⁻¹) e 3 concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 mg. L⁻¹) totalizando 9 tratamentos. Aos 30 dias, avaliou-se a porcentagem de explantes regenerados dos segmentos estiolados, e estes foram transferidos para meio MS líquido livre de reguladores. Após 45 dias, avaliou-se o número médio de brotações formadas, o diâmetro do aglomerado de brotações (mm), a área do aglomerado de brotações (mm²) e a biomassa seca (mg). O meio suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ levou a maior proliferação dos brotos e melhor desenvolvimento das brotações.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Reguladores de crescimento. Regeneração.

ABSTRACT

This work had as purpose the induction of adventitious shoots on buds of curaua elongation shoots recovering in different culture medium with BAP and TDZ, in 0, 0.5, 1.0 mgL⁻¹ concentrations. The elongation shoots were sectionated in segments having only on knot and inoculated horizontally in flasks. Randomized complete design was with 10 replication, following factorial (3x3 schemes, with 3 TDZ (0.0; 0.5; 1.0 mg. L⁻¹) concentrations and 3 BAP (0.0; 0.5; 1.0 mg. L⁻¹) concentration, in a total 9 treatments. The evaluation was 30 days after inoculation, when it was evaluated the elongation segments recovered explants and those were transferred to liquid MS medium free of regulators. After 45 days the mean numbers of the shoots, the clusters shoots diameter (mm), the shoots number area (mm²) and dry biomass, were evaluated. The medium supplemented with 0.5 mgL⁻¹ TDZ induced greater proliferation of shoots and better development of shoots.

Keywords: Tissue culture. Growth regulators. Regeneration.

1 INTRODUÇÃO

O curauá [*Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) COPPENS; LEAL (2003)] é uma planta monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae sendo caracterizada pela produção de fibras ligno-celulósicas de utilização múltipla e diversificada, incluindo diferentes atividades e fins. As folhas, coriáceas e sem espinhos, com comprimento médio de 1,5 m, largura de 5 cm e espessura de 5 mm são os órgãos de interesse comercial. O sistema radicular é do tipo fascicular e superficial ao solo.

Estudos recentes têm demonstrado o grande potencial do uso das fibras dessa planta como revestimento na indústria automobilística, porém o grande problema é que não há suprimento suficiente de matéria-prima para atender à indústria automobilística, pois o curauá é fiel às suas origens amazônicas e só se desenvolve apenas em clima quente e úmido, o que acarreta problemas para a aquisição de mudas fora dessa região (SILVA; AQUINO, 2008).

A propagação convencional do curauá é por meio de rebentos que são emitidos ao redor da planta, sendo esse método de reprodução assexual transmissor de doenças, além da planta mãe produzir baixa quantidade de rebentos por planta (cerca de 40 rebentos/planta/ano).

Portanto, a micropropagação utilizando técnicas de cultura de tecidos tem sido um valioso instrumento na propagação de diversos tipos de plantas. Embora este processo envolva diferentes etapas, depois de definido um protocolo de micropropagação, seja qual for a espécie, este pode ser otimizado, no intuito de se obter plântulas de alta qualidade e com baixo valor de produção (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Assim, a técnica de cultura de tecidos pode ser amplamente utilizada na obtenção de mudas com alta sanidade e em grande escala por meio da micropropagação de curauá. O estiolamento, segundo Kiss et al. (1995), é o

desenvolvimento de brotos, ramos ou partes desses em ausência de luz, o que causa crescimento geralmente alongado, produzindo tecidos de coloração amarela ou branca devido à ausência de clorofila.

A grande vantagem da utilização do estiolamento na multiplicação *in vitro* é que esse método pode apresentar maior alongamento entre os internós, proporcionado aumento na obtenção de brotos por explante além de diminuir as variações somaclonais e contaminações virais (MAYNARD; BASSUK, 1996).

A regeneração de plantas está intimamente ligada ao uso de reguladores de crescimento no meio de cultura, e na grande maioria das vezes, quando o objetivo é a regeneração de gemas e brotos e quebra da dominância apical, utiliza-se uma citocinina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O Tidiazuron (TDZ) é um regulador de crescimento, utilizado inicialmente como um desfolhante em algodão (CHAUHAN; SRINIVAS; PARAMJIT, 2007), que tem sido utilizado positivamente na morfogênese *in vitro* por promover a proliferação de múltiplos brotos (KHURANA; BHATNAGAR; KUMARI, 2005).

Outro regulador de crescimento muito utilizado é a 6-benzilaminopurina (BAP) que tem sido muito eficaz na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas axilares e brotos em diversas espécies (REIS et al., 2009).

Desta forma, objetivou-se com este trabalho a indução de brotações adventícias em gemas de brotos estiolados de curauá submetidas a diferentes concentrações e reguladores de crescimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para indução de brotações adventícias em gemas de brotos estiolados de curauá foram utilizados, como explantes, brotos estiolados *in vitro*, aos 60 dias de cultivo no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sólido, 6,0 mgL⁻¹ ágar, na presença de 2,0 mg.L⁻¹ ANA, em condições de escuro. Os brotos estiolados foram seccionados em segmento nodal, contendo uma gema por segmento, inoculados na posição horizontal, em frascos com capacidade de 250 mL (9,5 x 5,5 cm) contendo 30 mL de meio de cultura sólido (6,0 mgL⁻¹) ágar suplementado com 3% de sacarose e 3 concentrações de BAP ou TDZ (0,0; 0,5; 1,0 mg. L⁻¹).

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com 25 µmol m⁻²s⁻¹ de intensidade luminosa, temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Após 30 dias, avaliou-se a porcentagem de explantes regenerados das gemas dos brotos estiolados e, estes, foram transferidos para meio MS líquido sem reguladores, visando o alongamento das brotações. Após 45 dias de incubação nas mesmas condições de regeneração dos segmentos estiolados, avaliou-se a proliferação de brotos pela determinação do número, da biomassa seca (mg), do diâmetro (mm) e da área (mm²) do massagema.

O diâmetro e a área da massagema foram mensurados empregando captura de imagem através do microscópio digital Dino-Lite[®] Pro-AM413T e recursos de medição utilizando *software* Dino-Video Capture Application[®] versão 3.3.0.0

Para determinação da biomassa seca, as brotações foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar a 60

°C por 5 dias. Após esse período o material vegetal foi mensurado em balança de analítica.

O experimento apresentou um esquema fatorial 3 x 3, sendo 3 concentrações de TDZ (0,0; 0,5; 1,0 mg. L⁻¹) e 3 concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 mg. L⁻¹) totalizando 9 tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições, sendo 4 explantes por frasco.

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o *software* Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todos os brotos estiolados observou-se que houve respostas diferenciadas e interação entre os fatores quanto à porcentagem de explantes regenerados.

Na ausência tanto de BAP ou TDZ os segmentos nodais estiolados apresentaram a menor porcentagem de regeneração (30%) (Tabela 1). Isso sugere que para a indução de brotações no explante estiolado (segmento nodal) há necessidade da suplementação de uma citocinina ao meio de cultura.

Observando a Tabela 1, pode-se perceber que não houve diferença estatística na porcentagem de regeneração com a suplementação dos reguladores de crescimento BAP e TDZ. No entanto, analisando apenas a porcentagem média, quando se utilizou o TDZ a regeneração foi de 75% de regeneração e quando utilizou apenas o BAP essa foi de 62,5%. Para a interação (BAP x TDZ) apresentou em média 70% de regeneração.

Esse resultado sugere que para a regeneração dos brotos estiolados não há necessidade da interação entre BAP e TDZ para induzir brotações e que a suplementação do meio de cultura com apenas uma citocinina já é satisfatório. A utilização de altas doses de reguladores de crescimento, do grupo das citocininas, pode induzir brotos mais hiperhídricos e também variações somaclonais.

Schuch e Peters (2002), avaliando a regeneração de brotações em macieira, também obtiveram a maior porcentagem de regeneração (85,37%) em concentrações intermediárias de TDZ.

Tabela 1 Valores médios da porcentagem de regeneração dos brotos estiolados na interação da concentração de BAP e TDZ, aos 30 dias

Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)	Concentração de TDZ (mg.L ⁻¹)		
	0	0,5	1,0
0,0	30,0 b B*	82,5 a A	67,5 a A
0,5	70,0 a A	70,0 a A	67,5 a A
1,0	55,0 a A	75,0 a A	70,0 a A

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas na linha

Para a variável número de brotações a interação não foi significativa. O maior número de plântulas foi obtido com doses de 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (24 e 25 plântulas, respectivamente) os quais não diferiram estatisticamente (Gráfico 1), quando se aumentou a concentração de BAP ocorreu a formação de massas de gemas por nó, o que indica a formação de gemas adventícias, proporcionando um incremento nas taxas de multiplicação.

O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina, por excelência, para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de seu custo ser menor (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Avaliando a influência de diferentes concentrações de BAP para a micropropagação de bromélias do gênero *Dyckia*, Silva et al. (2008) também observaram que maiores concentrações do regulador proporcionam a maior taxa de multiplicação das gemas.

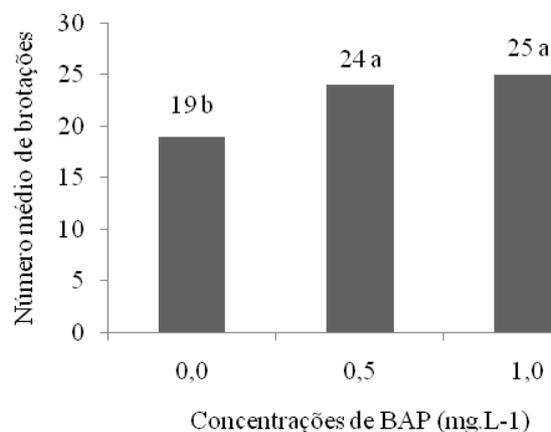


Gráfico 1 Valores médios do número de brotações de *Ananas comosus* var. *erectifolius* em diferentes concentrações de BAP (mg.L⁻¹). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Pasqual et al. (2008), estudando a micropropagação do abacaxizeiro, demonstraram que o aumento das concentrações de BAP, na ausência de ágar, promoveu aumento linear no número de brotos e quando se utilizou 1,5 mg.L⁻¹ do regulador alcançou-se o número máximo de 21 brotações por explante.

Diferenças no desenvolvimento dos brotos estiolados também foram observadas por Barboza e Caldas (2001), trabalhando com abacaxizeiro híbrido PE X SC-52, utilizaram brotos estiolados em meio MS sem regulador de crescimento, com BAP a 2 mg.L⁻¹, ANA a 1,86 mg.L⁻¹ + BAP a 2 mg.L⁻¹ e CIN a 5 mg.L⁻¹. O BAP promoveu maior número de plântulas regeneradas por broto, com média de 10,4 plântulas por broto estiolado.

Em relação às diferentes concentrações de TDZ, os resultados obtidos mostraram que esta variável também influenciou o número médio de brotações em curauá, sendo que a concentração intermediária deste regulador proporcionou o número máximo de 35 brotações por explante (Gráfico 2).

Porém, é possível observar que a maior concentração de TDZ avaliada diminuiu o número de brotações. Este regulador é mais ativo na multiplicação de plantas que outras citocininas, podendo ser considerado um inibidor de crescimento quando utilizado em altas concentrações (ALVES; LEMOS; COSTA, 1995). O TDZ não é degradável pelas oxidases como o BAP, assim pode ser utilizado em menor quantidade.

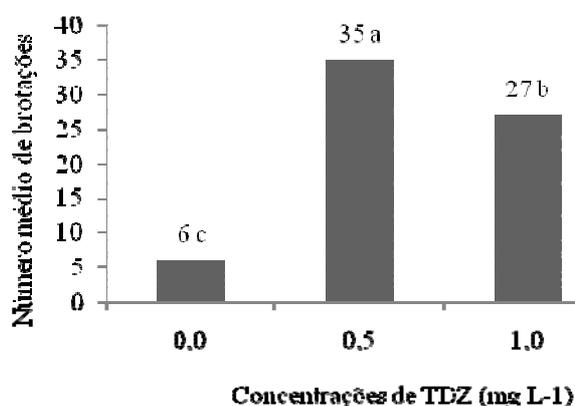


Gráfico 2 Valores médios do número de brotações de *Ananas comosus* var. *erectifolius* em diferentes concentrações de TDZ, aos 45 dias. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Na proliferação das brotações em curauá, observou-se que os fatores reguladores de crescimento e concentração do regulador afetaram significativamente ($p < 0,05$) a variável diâmetro da massagem, sendo que a interação não foi significativa. Para o BAP as melhores concentrações foram de 0,5 e 1,0 mg. L⁻¹ (12 e 11 mm), respectivamente, as quais não diferiram estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios do diâmetro da massagema cultivada em meios com BAP e TDZ em diferentes concentrações, aos 45 dias

Regulador	Concentração do regulador (mg.L⁻¹)	Diâmetro do aglomerado de brotações (mm)
BAP	0,0	10 b*
	0,5	12 a
	1,0	11 a
TDZ	0,0	7,0 c
	0,5	15 a
	1,0	12 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) para cada regulador de crescimento

No meio suplementado com o TDZ, o diâmetro da massagema na concentração de 0,5 mg L⁻¹ foi superior em relação às demais concentrações (Tabela 2). Como pode ser visto na tabela (2), o diâmetro da massagema entre as concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de TDZ foram estatisticamente diferentes. A superioridade da concentração de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, pode ser claramente vista pela Figura 1, não apenas pelo maior diâmetro da massagema, mas também pelo maior desenvolvimento das brotações em relação a dose de 1,0 mg L⁻¹ de TDZ.

Este efeito provavelmente seja consequência de algum efeito fitotóxico da concentração de TDZ no meio de cultura, já que a citocinina proporcionou um efeito benéfico até um determinado ponto, acima do qual seu excesso foi inibitório.



Figura 1 Massagemas de *Ananas comosus* var. *erectifolius* cultivadas *in vitro*, aos 45 dias. A) MS + 0,5 mg.L⁻¹ TDZ B) MS + 1,0 mg.L⁻¹ TDZ

Com relação à variável área da massagema, apenas o TDZ influenciou significativamente os resultados. Os maiores valores foram obtidos na concentração intermediária de 0,5 mg.L⁻¹ (164 mm²), assim como no diâmetro o aumento da concentração do regulador de crescimento levou a uma redução da área (Tabela 3).

Já para a variável peso seco das plântulas, não houve diferença estatística entre os tratamentos, com média geral de 12,05 mg. Resultados semelhantes foram obtidos por Pasqual et al. (2008) estudando a influência de concentrações de BAP e ANA na micropropagação de abacaxizeiro ornamental.

Tabela 3 Valores médios da área da massagema em diferentes concentrações de TDZ, aos 45 dias

Concentração de TDZ (mg.L ⁻¹)	Área da massagema (mm ²)
0,0	47 c*
0,5	164 a
1,0	126 b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05)

4 CONCLUSÃO

Para a produção de mudas *in vitro* em escala comercial, os acréscimos obtidos na regeneração dos brotos estiolados é um fator de grande importância para uma tomada de decisão quanto ao tipo e concentração de citocinina a ser utilizada.

Logo, para indução de brotos adventícios em segmentos nodais estiolados com obtenção de grande quantidade de brotos e um maior diâmetro e área da massagem é indicado a utilização de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. M. M.; LEMOS, G. B.; COSTA, M. P. Efeitos do thidiazuron na atividade da fosfatase ácida durante a micropropagação da arnica (*Solidago microglosa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1995. p. 196.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 417-423, mar. 2001.
- CHAUHAN, H.; SRINIVAS, A. D.; PARAMJIT, K. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 91, n. 3, p. 191-199, 2007.
- COPPENS, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2003. Disponível em: <<http://home.tiscali.nl/leodg/ht/lists-species2000+.html>>. Acesso em: 01 jun. 2010.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 5.0. Lavras: UFLA, 2007.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.
- KHURANA, P.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, S. Thidiazuron and woody plant tissue culture. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2005.
- KISS, J. et al. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127-129, 1995.
- MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Stock plant etiolation, banding and shading effects on the histology of adventitious rooting in stems of *Carpinus betulus* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 5, p. 853-860, 1996.

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

PASQUAL, M. et al. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 045-049, 2008.

REIS, É. S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. GALA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 301-305, ago. 2002.

SILVA, A. L. L. da et al. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 135-138, jan./jun. 2008.

SILVA, R. V.; AQUINO, E. M. F. Curaua fiber: a new alternative to polymeric composites. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, Westport, v. 27, n. 1, p. 103-112, 2008.

CAPÍTULO 5

Embriogênese somática em segmentos foliares juvenis de curauá

RESUMO

Dois ensaios foram conduzidos com o objetivo de avaliar o potencial de formação de calos e a conversão dos calos em brotações, utilizando como explantes segmentos foliares jovens de curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*). No primeiro experimento foram avaliados diferentes reguladores de crescimento (2,4-D, TDZ, 2-ip, BAP e Picloram) em diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μM). No segundo ensaio foram avaliadas diferentes concentrações de BAP (0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μM) e TDZ (0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μM) em combinação com 20,0 μM 2,4-D. Aos 30 dias, observou-se a frequência de indução de calos, presença ou ausência de raiz ou necrose nos explantes dos ensaios I e II. Após a avaliação da indução de calos aos 30 dias dos ensaios I e II, esses foram transferidos para o meio de cultura MS destituído de regulador de crescimento. A observação da diferenciação dos calos foi feita aos 30 dias, sendo avaliada a frequência de regeneração dos brotos. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas na indução de calos a partir de explantes foliares em curauá, em função dos diferentes reguladores de crescimento. Explantes foliares jovens na parte basal, cultivados *in vitro* por 30 dias, apresentam potencial morfogenético para formação de calos. O meio MS acrescido de 5 μM de 2,4-D, 10 μM de TDZ ou 2,5 μM de picloram são os que apresentaram maiores taxas de indução de calos. Já para o meio com a combinação de 20 μM de 2,4-D com diferentes concentrações de BAP ou TDZ, verificou-se efeito positivo na utilização de 2,4-D com TDZ na calogênese de explantes foliares em curauá, sendo que com o aumento da concentração dessa citocinina houve uma maior frequência de indução de calos. Houve regeneração dos calos em brotações para os diversos reguladores de crescimento, com exceção do picloram, sendo que calos cultivados em meio suplementado com TDZ apresentaram uma maior proporção de diferenciação. Portanto, o uso do meio MS/4 acrescido de 20 μM de 2,4-D com 5 μM de TDZ, mantendo os explantes em condições de escuro por 30 dias, seguido da transferência dos calos para meio MS na ausência de reguladores de crescimento e na presença de luz, não só resultou em uma maior frequência de indução de calos como de regeneração de brotos. Esses resultados demonstraram que as capacidades de indução e regeneração de calos podem ser induzidas ou melhoradas ajustando-se às condições de cultura.

Palavras-chave: regulador de crescimento. Regeneração de plântulas. Propagação clonal.

ABSTRACT

Two trials were conducted to evaluate the potential of callus formation and the conversion of callus in shoots using leaf segments as explants young curaua (*Ananas comosus* var. *erectifolius*). In the first trial were evaluated different growth regulators (2,4-D, TDZ, 2-ip, and BAP Picloram) at different concentrations (0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μM). The second trial evaluated different concentrations of BAP (0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μM) and TDZ (0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μM) combined with 20.0 μM 2,4-D. At 30 days, we observed the frequency induction callus, presence or absence of necrosis or root explants in the trials I and II. Following evaluation of callus induction at 30 days of trials I and II, these were transferred to MS medium devoid of growth regulator. The observation of callus differentiation was done at 30 days, then evaluated the shoots regeneration frequency. Statistically significant differences were found in callus induction from leaf explants in curaua, according to the different growth regulators. Young leaf explants in the basal part, cultured in vitro for 30 days had a morphogenetic potential of callus formation. The MS medium supplemented with 5 μM 2,4-D, 10 μM TDZ or 2.5 μM picloram are the ones that showed higher rates of induction. Already in the middle with the combination of 20 μM 2,4-D with different concentrations of BAP or TDZ, there was positive effect on the use of 2,4-D with TDZ on callus induction from leaf explants in curaua, and with the BAP concentration increased there was a higher induction frequency. There was regeneration of calluses on shoots for various plant growth regulators, except for picloram, and callus cultured in medium supplemented with TDZ showed a higher differentiation proportion. Therefore, the use of MS / 4 plus 20 μM to 5 μM 2,4-D with TDZ, the explants maintained under dark for 30 days, followed by transfer of callus to MS medium in the absence of growth regulators and the presence of light, not only resulted in a higher callus induction frequency as also the shoots regeneration. These results demonstrated that the induction and regeneration capacity of callus can be induced or improved by adjusting the culture conditions.

Keywords: Growth regulator. Shoots regeneration. Clonal propagation.

1 INTRODUÇÃO

O curauá [*Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) COPPENS; LEAL (2003)] é uma planta fibrosa, nativa da Amazônia Paraense, e produz fibra vegetal considerada uma das mais resistente. Devido a sua importância econômica pela utilização das fibras de alta resistência pela indústria têxtil, automotiva e de celulose, muitos estudos tem sido realizados com essa espécie. Entretanto, não há matéria prima suficiente para a demanda do mercado, já que o curauá é fiel as suas origens e só apresenta um bom desenvolvimento em clima quente e úmido, criando assim um problema na produção de mudas (SILVA, 2010).

Naturalmente, as plantas de curauá são propagadas por meio vegetativo através de rebentos que são emitidos pelas plantas no campo. Por ser um processo de propagação assexual, este método em campo poderá aumentar a incidência de doenças ao longo de plantios sucessivos, além de produzir poucas mudas por planta (cerca de 40/ano). Desta forma, comercialmente, as mudas de curauá são propagadas em laboratórios via cultura de tecidos (SILVA, 2010).

A embriogênese somática consiste no processo de regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro*, em que células somáticas ou haplóides desenvolvem-se em diferentes estádios embriogênicos, formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de gametas. É considerada um sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores, com aplicações biotecnológicas potenciais, tais como sementes sintéticas, micropropagação e transformação genética (BISPO; GRANDO; SUZIN, 2007; FERNANDES et al., 2008).

É também um método importante para propagação de plantas elite *in vitro*, em escala comercial. As principais vantagens da embriogênese somática comparada com outros sistemas de propagação *in vitro* são as altas taxas de

multiplicação obtidas, possibilidade de criopreservação de calos embriogênicos, uso de biorreatores, além da possível elaboração de sementes sintéticas (SILVEIRA et al., 2004).

Segundo Merkle, Parrot e Flinn (1995), a indução de embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estavam envolvidas no processo embriogênico. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e qualidade do explante (BYESSE; GOFFLOT; MICHAUX-FERRIERE, 1993).

Os reguladores de crescimento, como as auxinas e citocininas, têm um papel fundamental neste sistema de cultivo. Evidenciando a importância das auxinas, conforme Komamine et al. (1992), elas são, geralmente, utilizadas em altas dosagens (acima de 1 mgL^{-1}), com o objetivo de induzir competência às células necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência de células competentes.

Dentre as auxinas, o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais empregados em estudos de embriogênese (ALVES; VESCO; GUERRA, 2006; RAHARJO; LITZ, 2007; VENGADESAN et al., 2005). Estudos de Valenzuela et al. (2006) evidenciaram que para a espécie *Agave tequilana* a maior porcentagem de calos embriogênicos foram obtidos com o 2,4-D em comparação ao ácido naftaleno acético (ANA).

O uso do Picloram também tem sido investigado em várias espécies, a formação direta de embriões somáticos em *Paspalum scrobiculatum* ocorreu com a utilização de altos níveis de Picloram, isoladamente ou em combinação com cinetina (KAUR; KOTHARI, 2004). Picloram também foi efetivo na indução de embriogênese somática em eucalipto, nas concentrações de 5,0 e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (TITON et al., 2007).

Outros importantes fitorreguladores como TDZ (Tiadizuron), 2-ip (2-isopentenil) e BAP, também têm significativa importância na indução de embriões somáticos (CHUNG; CHEN; CHANG, 2005; GOMES et al., 2006; LIN et al., 2006; ZHANG; CHEN; HENNY, 2005). Lin et al. (2006) observaram que para *Epipremnum aureum* cerca de 30 a 100 brotos/explante foram obtidos por meio de embriogênese direta utilizando-se o TDZ.

Estudando o efeito de 2-ip na indução de embriões somáticos de bromélia (*Vriesea reizii*), Alves, Vesco e Guerra (2006) concluíram que houve a indução de embriões somáticos e, o conseqüente desenvolvimento desses em plântulas, quando explantes basais foram cultivados em meio com 2-ip.

Os estudos com embriogênese somática na família Bromeliaceae têm-se expandido muito nos últimos anos devido à necessidade de recuperação e preservação de alguns genótipos desta família ameaçados de extinção como as bromélias, o que pode ser evidenciado nas pesquisas de Alves, Vesco e Guerra (2006) e, também, em espécies com potencial valor comercial como o curauá.

Objetivou-se induzir embriões somáticos utilizando segmento foliar jovem em meio de cultura suplementado com diferentes reguladores de crescimento e concentrações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Como fonte de explantes, utilizou-se segmentos foliares juvenis provenientes de plântulas de curauá pré-estabelecidas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido com 3% de sacarose, sem adição de reguladores de crescimento e mantidas em condições de $25\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 Ensaio I a: efeito dos reguladores de crescimento e concentrações na indução de calos

O ensaio foi dividido em 5 etapas, em cada etapa foi utilizado um regulador de crescimento diferente (2,4-D, TDZ, 2-ip, BAP, Picloram) utilizando um gradiente de concentração (0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 μM).

O meio indutor de calos foi o MS/4 com 3% de sacarose, solidificado com Phytigel a 0,2%, pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e suplementação com os respectivos reguladores e concentrações.

Das plântulas de curauá estabelecidas *in vitro* foram retirados explantes constituídos de fragmentos da região basal de folhas juvenis com tamanho de 0,5 x 1,0 cm. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 10 mL de meio semissólido com os respectivos tratamentos e mantidos em sala de crescimento no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada visualmente aos 30 dias, observando-se a presença ou ausência de calos, raiz ou necrose nos explantes.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos por ensaio, com 7 repetições e a parcela experimental de 5 tubos. A

frequência de indução de calos foi determinada pela expressa porcentagem de presença de calos em relação ao número total de explantes não contaminados ($F = \%calos / n^{\circ} exp$).

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

2.3 Ensaio I b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos

Após a avaliação da indução de calos aos 30 dias, calos originados dos explantes foliares foram transferidos para o meio de cultura MS semissólido destituído de regulador de crescimento. Os calos foram mantidos em condições de $25 \mu M m^{-2} s^{-1}$ de intensidade luminosa, temperatura de $25 \pm 1^{\circ}C$ para maturação dos embriões somáticos. A observação visual da conversão dos embriões foi feita aos 30 dias, sendo avaliada frequência de regeneração dos brotos, dada pela porcentagem dos explantes com calos que produziram brotos em relação ao número total de calos ($F = \%calos\ com\ brotos / n^{\circ} calos$).

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

2.4 Ensaio II a: efeito do 2,4-D combinado com BAP ou TDZ na indução de calos

Visando à indução de embriões somáticos em curauá e a comparação com o resultado obtido no ensaio anterior, nesse ensaio avaliaram-se diferentes

concentrações de BAP (0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μM) e TDZ (0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 μM) em combinação com 20,0 μM 2,4-D.

Explantos constituídos da região basal de folhas juvenis (0,5 x 1,0 cm) foram inoculados em tubos de ensaio com 10 mL de meio MS/4 contendo 3% de sacarose, solidificado com Phytigel a 0,2%, suplementado com os respectivos tratamentos e mantidos em sala de crescimento no escuro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A presença ou ausência de calos, raiz ou necrose foram mensuradas aos 30 dias após o estabelecimento, utilizando-se avaliação visual.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos por ensaio, constituído por 7 repetições e a parcela experimental de 5 tubos. A frequência de indução de calos foi determinada pela porcentagem de explantes com calos pelo número total de explantes ($F = \frac{\%calos}{n^\circ exp}$).

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007).

2.5 Ensaio II b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos

Após a avaliação da indução de calos aos 30 dias, calos originados dos explantes foliares foram transferidos para o meio de cultura MS semissólido destituído de regulador de crescimento. Os calos foram mantidos em condições de $25 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para maturação dos embriões somáticos. A observação da conversão dos embriões foi feita aos 30 dias, sendo avaliada a frequência de regeneração dos brotos, expressa pela porcentagem dos explantes com calos que produziram brotos em

relação ao número total de calos, utilizando-se a avaliação visual ($F = \frac{\%calos\ com\ brotos}{n^o\ calos}$).

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.0 (FERREIRA, 2007). A frequência de regeneração foi expressa pela porcentagem dos explantes com calos que produziram brotos pelo número total de calos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio I a: efeito dos reguladores de crescimento e concentrações na indução de calos

Em estudos preliminares, dados não mostrados, avaliou-se a influência de diferentes explantes na indução de calos (parte basal, mediana e apical de folhas jovens e adultas). Nesses estudos determinaram que o segmento basal jovem apresentou a maior indução, dados não mostrados, e, por isso, foram utilizados como explantes.

Ao avaliar o efeito de diferentes reguladores e concentrações na indução de calos, a partir de explantes foliares jovens de curauá, observou-se que houve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na frequência de indução de calos (Tabela 1).

Tabela 1 Influência de diferentes reguladores e concentrações na indução de calos e regeneração de brotos em curauá a partir de segmentos foliares jovens

Reguladores de crescimento	Concentração (µM)	N. explantes	N. de calos	Frequência de indução de calos (%)	Frequência de regeneração de brotos (%)
2,4-D	0	35	0	0,00 b*	0,00 a
	2,5	35	6	17,14 b	0,00 a
	5	35	11	31,43 a	2,86 a
	10	35	14	40,00 a	0,00 a
	20	35	12	35,00 a	2,86 a
TDZ	0	35	0	0,00 b	0,00 b
	2,5	35	12	34,28 a	31,71 a
	5	35	8	24,28 a	24,28 a
	10	35	12	35,71 a	35,71 a
	20	35	8	24,28 a	18,57 a
2ip	0	35	1	2,86 a	2,86 a
	2,5	35	3	8,57 a	8,57 a
	5	35	5	14,28 a	14,28 a
	10	35	6	17,14 a	11,43 a
	20	35	4	11,43 a	8,57 a

Tabela 1, conclusão

BAP	0	35	0	0,00 a	0,00 a
	2,5	35	1	2,86 a	0,00 a
	5	35	2	5,71 a	0,00 a
	10	35	1	2,86 a	2,86 a
	20	35	2	5,57 a	2,86 a
Picloram	0	35	0	0,00 b	0,00 a
	2,5	35	17	48,57 a	0,00 a
	5	35	14	40,00 a	0,00 a
	10	35	9	25,71 a	0,00 a
	20	35	9	27,14 a	0,00 a

*Médias seguidas da mesma letra, para cada regulador, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Neste estudo foi possível observar, que altas concentrações de 2,4-D, (5,0 a 20,0 μM), proporcionaram as maiores frequências médias de indução de calos em segmentos foliares jovens (Tabela 1), os efeitos positivos causados pelo 2,4-D na indução de calos em curauá, provavelmente, devem-se ao fato dessa auxina ser a mais frequentemente usada na indução de calogênese. As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular (LI; MIZE; CAMPBELL, 2010).

Conforme George (1996), o 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento, podendo induzir a proliferação celular desordenada.

Já para o TDZ, apenas o tratamento controle não induziu a formação de calos, as demais concentrações exibiram comportamentos semelhantes, proporcionando uma frequência de indução de calos de 24,28 % a 35,71%.

O TDZ é uma das mais ativas substâncias da classe das citocininas na estimulação da divisão celular e altamente utilizada na cultura de tecidos. O TDZ foi mais efetivo na indução de calos que o BAP, mesmo em baixas concentrações, corroborando com Li, Mize e Campbell (2010) que relatam que o TDZ é mais biologicamente ativo que o BAP.

Em relação ao comportamento do TDZ, o diferencial da ação dessa citocinina na embriogênese pode estar relacionado à modulação das auxinas. De acordo com Thomas e Katterman (1986), as auxinas críticas para indução de embriões podem ser sintetizadas pelo tecido cotiledonar ou foliar, tratado com TDZ, em modelo similar àquele descrito pela biossíntese de citocininas induzidas pelo TDZ.

Os reguladores 2-ip e BAP tiveram baixas frequências de indução de calos em curauá, apresentando valores médios de 17,14% e 5,71%, respectivamente, para as concentrações de 10 μM de 2-ip e 5 μM de BAP (Tabela 1).

Bispo, Grando e Suzin (2007), avaliando a indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia, observaram que a presença da citocinina BAP no meio de cultura também não obteve efeito sobre a embriogênese nos diferentes genótipos e explantes de aveia avaliados.

O Picloram teve comportamento semelhante ao TDZ, apresentando uma maior frequência de indução de calos (48,57%), em valor absoluto, na concentração de 2,5 μM . Nas maiores concentrações de Picloram avaliadas (10 e 20 μM), a frequência de indução de calos foi reduzida, em valores absolutos.

A alta indução de calos observada em explantes foliares cultivados em meio com Picloram, pode ser atribuída ao fato dessa auxina ser utilizada para a formação de calos embriogênicos, assim como para induzir e/ou manter calos ou cultura de suspensão celular (LI; MIZE; CAMPBELL, 2010).

Quanto à indução de calos em baixas concentrações de Picloram, George (1996) afirma que a concentração requerida desse regulador de crescimento é, geralmente, menor que a necessária para outras auxinas.

Estudando o efeito dos reguladores de crescimento dicamba e Picloram em *Eucalyptus grandis*, Titon et al. (2007) também observaram estruturas embriogênicas nos explantes após 30 dias de inoculação em meio de cultura com Picloram.

Com base na Figura 1a é possível observar que houve formação de calos na parte proximal da folha jovem, que estava em contato direto com a plântula. Também houve a formação de dois tipos de calos, um de coloração mais amarelado e de aspecto friável (Fig. 1a e 1e) outro mais esbranquiçado e de consistência compacta (Fig. 1b, 1c e 1d).

Os calos mais mucilaginosos, cultivados em meio com 2,4-D e Picloram, tiveram as menores capacidades de regeneração, enquanto que os mais compactos, cultivados em TDZ, 2-ip e BAP, possuíram maior capacidade de diferenciação em brotações, sugerindo calos com alto potencial embriogênico.

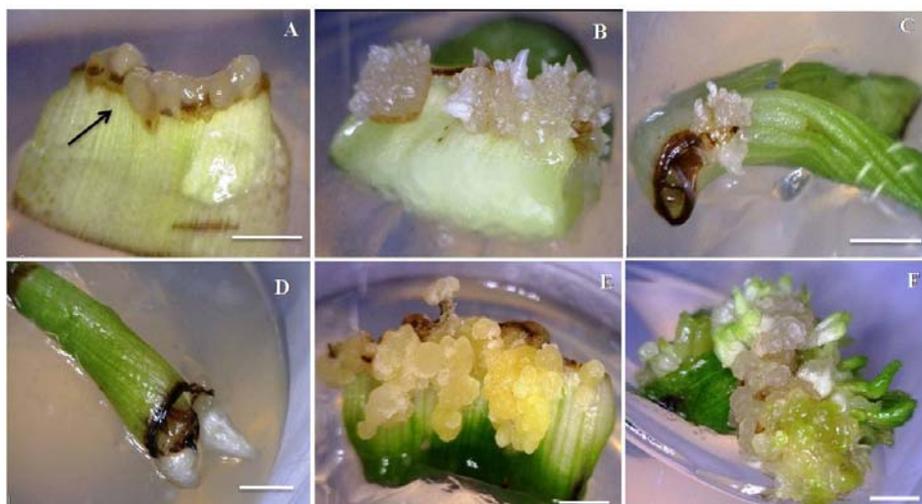


Figura 1 Efeito dos diferentes reguladores de crescimento na indução de calos e regeneração usando segmentos foliares jovens como explante. Calos vindos de 10 μ M de a) 2,4-D; b) TDZ; c) 2-ip; d) BAP; e) Picloram. F) Regeneração de brotos de calos cultivados em meio com 10 μ M de TDZ. Barra=2mm

3.2 Ensaio I b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos

A transferência dos calos, cultivados, principalmente na presença de 2,4-D, TDZ e 2-ip, para o meio MS desprovido de regulador de crescimento proporcionou a conversão de embriões somáticos em brotações (Tabela 1). Embora os meios de indução suplementados com 2,4-D e Picloram terem apresentado maior frequência de calos, os calos cultivados nesses meios apresentaram baixa (2,4-D) ou nenhuma (Picloram) capacidade de regeneração de brotos.

O comportamento do 2,4-D pode ser explicado, provavelmente devido ao tempo de exposição do explante ao regulador de crescimento. Aliado ao efeito do tipo e concentração de regulador de crescimento, outro fator de grande importância é o período em que os explantes ficam expostos ao regulador de

crescimento, denominado de “período de choque”. De acordo com Guerra, Torres e Teixeira (1999) choques auxínicos em períodos variando de 1 a 32 semanas foram testados visando identificar o período mínimo de competência embriogênica das células.

Portanto, um ensaio avaliando diferentes tempos de choque do explante ao 2,4-D poderá levar a melhores resultados de frequência de regeneração de brotações.

A maior frequência de regeneração dos brotos ocorreu para os calos vindos de meios suplementados com TDZ (27,57% em média) e 2-ip (10,70% em média). A maior regeneração ocorreu em calos obtidos de meios suplementados com TDZ, sendo que na concentração de 10 μ M houve uma frequência de 35,71% de regeneração dos brotos (Tabela 1). A regeneração dos calos obtidos de meios suplementados com 10 μ M de TDZ pode ser observada na Figura (1f).

Para calos provenientes de meios com 2,4-D e BAP a porcentagem de regeneração foi inferior a 2,86% e para o Picloram não ocorreu. Essa falta de regeneração pode ser devido à pobre resposta dos calos à mudança para um meio sem reguladores de crescimento (VELANKAR; HEBLE, 2004) ou devido à perda da totipotencialidade logo após a iniciação dos calos (HEYSER et al., 1983).

Embora a presença do TDZ no meio de indução de calos não tenha sido a que apresentou a maior porcentagem de indução, a regeneração dos calos foi mais expressiva para esse regulador, quando comparado com os demais. Com isso, pode-se afirmar que o melhor regulador de crescimento para produção de brotos de curauá foi o TDZ.

Já para a variável presença ou ausência de necrose no explante foliar, apenas os explantes cultivados em meio com 2,4-D e 2-ip apresentaram necrose, porém a porcentagem foi muito pequena 2,85 e 1,14% respectivamente.

O desenvolvimento de raízes nos explantes foliares foi observado apenas nos segmentos cultivados em meio com 2,4-D, com uma porcentagem média de 17,28%.

Esse fato pode ser explicado pelas auxinas serem reguladores de crescimento com maior efetividade na promoção de enraizamento, podendo ser utilizada isoladamente ou combinadas no processo de indução de raízes, em concentrações variadas conforme a espécie, cuja função está relacionada à divisão celular em cultura de tecido, estimulando a síntese ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, resultando em aumento da plasticidade da membrana (SORACE et al., 2007).

Resultados similares foram obtidos em estudo de indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Para esta espécie a utilização de 2,4-D também induziu a rizogênese (FERREIRA et al., 2005).

3.3 Ensaio II a: efeito do 2,4-D combinado com BAP ou TDZ na indução de calos

A frequência de indução de calos em explantes foliares de curauá frente à interação de 20 μ M de 2,4-D e gradientes de concentrações (0; 2,5; 5; 10 e 20 μ M) das citocininas TDZ e BAP, aos 30 dias de cultivo foi maior quando os explantes foram inoculados na presença de TDZ (Tabela 2). Esse resultado corrobora com o ensaio I, pois também evidenciou que a presença desta citocinina é essencial no processo de indução de calos em curauá.

Foi possível observar que com o aumento da concentração de TDZ, houve um aumento na porcentagem de indução de calos, em valores absolutos. Como a indução de calo é dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas, no caso do curauá, provavelmente, o fornecimento da

auxina e citocinina no meio de cultura foram suficientes para induzir a embriogênese somática.

Em estudo da regeneração de lírio (*Hermerocallis*) a partir de segmentos foliares jovens, Li, Mize e Campbell (2010) também observaram a maior frequência de indução de calos em altas concentrações de 2,4-D combinadas com altas concentrações de TDZ.

3.4 Ensaio II b: regeneração de brotos a partir de calos embriogênicos

Com relação à frequência de regeneração, pode-se observar na Tabela 2 que os calos cultivados em meio de interação de 2,4-D com TDZ em maiores concentrações, se diferenciaram-se em brotos em maior porcentagem (31,7% em média). Já os calos cultivados em meio com 2,4-D e BAP, em concentrações intermediárias de BAP a regeneração foi pequena, e em concentrações extremas a frequência de brotos foi nula.

Tabela 2 Influência do 2,4-D combinado com diferentes concentrações de BAP ou TDZ na indução de calos e regeneração de brotos em curauá a partir de segmentos foliares jovens

2,4-D (µM)	BAP (µM)	TDZ (µM)	N. explantes	N. de calos	Frequência de indução de calos (%)	Frequência de regeneração de brotos (%)
20	0	0	35	3	10,00 b*	0,00 b
20	2,5	0	35	12	35,00 b	15,00 a
20	5	0	35	12	35,00 b	15,00 a
20	10	0	35	10	30,00 b	5,00 a
20	20	0	35	9	25,00 b	0,00 b
20	0	0	35	7	20,00 b	0,00 b
20	0	2,5	35	17	50,00 a	10,00 b
20	0	5	35	19	55,00 a	40,00 a
20	0	10	35	14	40,00 a	20,00 a
20	0	20	35	21	60,00 a	35,00 a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

Com relação à presença de necrose nos explantes foliares em curauá, foi possível observar que apenas no tratamento com 5 μ M de TDZ ocorreu a morte do tecido foliar (5%), já para a combinação de 2,4-D com BAP não houve presença de necrose nos explantes em nenhum tratamento.

Em nenhuma das combinações de 2,4-D com BAP e TDZ observou-se rizogênese.

Estes resultados demonstraram que as capacidades de indução e regeneração de calos podem ser induzidas ou melhoradas ajustando-se as condições de cultura.

Com a realização deste trabalho foi possível observar, pela primeira vez, a indução de embriogênese somática proveniente de segmento foliar juvenil, sendo que esse protocolo de indução e regeneração de calos pode auxiliar em trabalhos de transformação genética de plantas.

4 CONCLUSÃO

Aproximadamente, 27,57 % dos calos tipo embriogênicos (vindos de TDZ) se diferenciaram em brotações após transferidos das condições do escuro para condições de luz e para meio MS livre de reguladores de crescimento. Em contrates, os calos mucilaginosos (2,4-D) apresentaram baixa capacidade de regeneração (2,86%). Portanto o uso do meio MS/4 acrescido de 20 μ M de 2,4-D com 5 μ M de TDZ, mantendo os explantes em condições de escuro por 30 dias, seguido da transferência dos calos para meio MS na ausência de reguladores de crescimento e na presença de luz, não só resultou em uma maior frequência de indução de calos como de regeneração de brotos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. M.; VESCO, L. L. D.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the endemic bromeliad *Vriesea reitzii* troght nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 204-207, 2006.
- BISPO, N. B.; GRANDO, M. F.; SUZIN, L. A. M. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 890-893, maio/jun. 2007.
- BYESSE, D.; GOFFLOT, A.; MICHAUX-FERRIERE, N. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 71, n. 11, p. 1496-1502, 1993.
- CHUNG, H. H.; CHEN, J. T.; CHANG, E. C. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium chiengmai* Pink and subsequent plant regeneration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 765-769, 2005.
- COPPENS, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). **The pineapple: botany, production and uses**. Wallingford: CABI, 2003. Disponível em: <<http://home.tiscali.nl/leodg/ht/lists-species2000+.html>>. Acesso em: 01 jun. 2010.
- FERNANDES, E. H. et al. Embriogênese somática a partir de embriões imaturos em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2604-2607, 2008.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 5.0. Lavras: UFLA, 2007.
- FERREIRA, M. das et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, 2005.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1: the technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

- GOMES, F. L. A. F. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 15-21, 2006.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v. 2, p. 553-568.
- HEYSER, J. W. et al. High-frequency, long-term regeneration of rice from callus-culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 29, p. 175-182, Apr. 1983.
- KAUR, P.; KOTHARI, S. L. In vitro culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 2, p. 73-79, 2004.
- KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures. Physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 28, n. 6, p. 11-14, 1992.
- LIN, C. S. et al. Albino inflorescence proliferation of *Dendrocalamus latiflorus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 42, n. 4, p. 331-335, 2006.
- LI, Z.; MIZE, K.; CAMPBELL, F. Regeneration of daylily (*Hemerocallis*) from young leaf segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 199-204, 2010.
- MERKLE, S.; PARROT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 155-203.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- RAHARJO, S. H. T.; LITZ, R. E. **Clonal regeneration of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) via somatic embryogenesis**. 2007. Disponível em: <http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=738_61>. Acesso em: 15 nov. 2010.

SILVA, C. **País pesquisa mais fibras naturais para carros**. 2010. Disponível em:
<http://www.sebrae_sc.com.br/novos_destaquos/opportunidade/default.asp?matéria=8356>. Acesso em: 15 out. 2010.

SILVEIRA, V. et al. Effect of plant growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, n. 2, p. 53-60, 2004.

SORACE, M. et al. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 195-200, 2007.

THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, n. 2, p. 681-683, 1986.

TITON, M. et al. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007.

VALENZUELA, K. K. et al. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 42, n. 4, p. 336-340, 2006.

VELANKAR, M. H.; HEBLE, M. R. Biotransformation of externally added vanillin related compounds by multiple shoot cultures of *Vanilla planifolia* L. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, p. 153-156, 2004.

VENGADESAN, G. et al. Transfer and expression of npt II and bar genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v. 41, n. 1, p. 17-21, 2005.

ZHANG, Q.; CHEN, J.; HENNY, R. J. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, petiole and stem explants of Golden Pothos. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 587-595, Nov. 2005.