

# Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento *in vitro* e *ex vitro*

## Micropropagation of pineapple with *in vitro* and *ex vitro* rooting

Yohana de Oliveira-Cauduro<sup>1</sup>, Valéria Rosa Lopes<sup>2</sup>, Claudine Maria De Bona<sup>3</sup>,  
Giovana Bomfim de Alcantara<sup>4</sup>, Luiz Antonio Biasi<sup>1</sup>

### RESUMO

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) é uma planta de propagação vegetativa de grande importância econômica para o Brasil. Entretanto, a dificuldade em se obter mudas saudáveis, de qualidade, em grande quantidade e de forma rápida é um entrave à expansão desta cultura. Dessa forma, o presente estudo visou estabelecer a regeneração *in vitro* de abacaxizeiro, seleção lapar 8. Para isto foi utilizado o meio MS e analisados fatores envolvidos na multiplicação, alongamento, enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e aclimatização. Para a multiplicação foram testados os tratamentos com 0, 1, 2 e 4 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzil-amino-purina (BAP) na presença de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA), combinados com duas consistências do meio de cultura (líquido e semi-sólido). Para o alongamento foram avaliadas três concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>): 0; 4,3 e 8,7 mg L<sup>-1</sup>. Para a avaliação do enraizamento *in vitro* foram testadas quatro concentrações de ácido indolbutírico (AIB) 0, 0,25, 0,50 e 1 mg L<sup>-1</sup>, seguidos da aclimatização das plantas em casa de vegetação, usando Plantmax<sup>®</sup> como substrato. Para o enraizamento *ex vitro* foram testados três diferentes substratos, Plantmax<sup>®</sup>, fibra de coco e vermiculita. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que a utilização de BAP no meio de cultura foi considerada eficiente, o que pode ser evidenciado pela formação de um grande número de brotações por explante, tanto no meio de cultura líquido como no semi-sólido. O meio de cultura líquido mostrou-se superior para o comprimento médio das brotações e para a formação de raízes. Não é necessária a presença de GA<sub>3</sub> no meio de cultura para alongamento das brotações. O uso do ácido indolbutírico não se mostrou eficiente para o enraizamento *in vitro* de plantas de abacaxizeiro e para a aclimatização das plantas em Plantmax<sup>®</sup>. O enraizamento *ex vitro* mostrou respostas similares para os substratos testados, com exceção da variável número de raízes, na qual o Plantmax<sup>®</sup> foi superior aos demais.

**Palavras chave:** Benzil-amino-purina, cultivo *in vitro*, fruticultura, cultura de tecidos vegetais.

### ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) is a vegetative propagated plant that displays a great economic importance to Brazil. However, the difficulty in obtaining healthy seedlings, with quality, in large quantities and quickly is an obstacle to the expansion of this crop. For these reasons, the present study aimed to establish the *in vitro* regeneration of the pineapple lapar Selection 8 genotype for its multiplication. The suitability of MS medium for the genotype micropropagation and other factors involved in its proliferation, elongation, rooting and acclimatization *in vitro* and *ex vitro* were studied. For multiplication, the treatments were 0, 1, 2 and 4 mg L<sup>-1</sup> benzyl-amino-purine (BAP) in the presence of 0.5 mg L<sup>-1</sup> naphthalene acetic acid (NAA), and two medium consistencies (liquid or semi-solid). Elongation was evaluated with three concentrations of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>): 0; 4.3 and 8.7 mg L<sup>-1</sup>. For the *in vitro* rooting, four Indol Butyric acid (IBA) concentrations (0, 0.25, 0.50 and 1 mg L<sup>-1</sup>) were tested, followed by the acclimatization in a greenhouse, using Plantmax<sup>®</sup> as substrate. Three different substrates (Plantmax<sup>®</sup>, coconut fiber and vermiculite) were tested for *ex vitro* rooting of the pineapple plantlets. Completely randomized experimental design was used in all experiments. According to the obtained results, the use of BAP in the culture medium was considered efficient, which can be evidenced by the formation of large number of shoots per explant, both in liquid as in semi-solid culture medium. The liquid medium was superior for both shoot length and root formation. Presence of GA<sub>3</sub> in the culture medium is not required for etiolation of the shoots. The use of the IBA was proven not to be efficient for the *in vitro* rooting of this pineapple genotype nor for its acclimatization in Plantmax<sup>®</sup> substrate. *Ex vitro* rooting response was similar in all substrates, except for the root number variable, where Plantmax<sup>®</sup> showed to be superior than the other substrates.

**Keywords:** *In vitro* culture, fruticulture, plant tissue culture.

## INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) é uma fruta muito apreciada, sendo consumida *in natura* ou de forma industrializada, é originária da América tropical e

subtropical, e possui grande importância econômica para o Brasil. É uma planta perene, propagada comercialmente de forma vegetativa, pois suas sementes são geralmente vestigiais (Crestani et al., 2010).

Recebido em 30 de Junho 2016 e aprovado em 22 de Novembro de 2016

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná/UFPR, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba/CODEVASF, Brasília, DF, Brasil

<sup>3</sup>Instituto Agrônomo do Paraná/IAPAR, Curitiba, PR, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal do Paraná/UFPR, Departamento de Ciências Florestais/DECIF, Curitiba-PR, Brasil

\*Autor para Correspondência: yohanacauduro@gmail.com

A propagação é feita por meio do uso de diversas estruturas da planta adulta, denominadas coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão (Simão, 1998; Crestani et al., 2010). Entretanto, o uso deste tipo de muda despande muito de material vegetal, mão-de-obra e tempo, podendo aumentar os custos de produção, além de gerar material propagativo desuniforme em tamanho e vigor. (Moreira et al., 1999; Garita; Gómez, 2000; Santos et al., 2011). Além disso, essa forma de propagação normalmente gera mudas de qualidade sanitária duvidosa, uma vez que acaba favorecendo a disseminação de pragas, como cochonilhas (*Dysmicoccus brevipes*) e doenças, como a fusariose (*Fusarium subglutinans* f. sp. ananas). Esta última responsável por perdas de produção acima de 30%, e perdas de material vegetativo em torno de 20% (Aquiye et al., 2010).

Nesse sentido, a cultura de tecidos tem sido utilizada na propagação do abacaxizeiro visando à obtenção de mudas livres de doenças e no aumento da taxa de multiplicação de genótipos elites (Dias, 2011). Além disso, a aplicação de reguladores vegetais, como as auxinas e as citocininas, tem sido fundamental para promover maior taxa de multiplicação (George, 1993; Macêdo et al., 2003).

Almeida et al. (2002) usando a técnica de micropropagação com a cultivar 'Pérola' de *Ananas comosus* conseguiram produzir 161.080 plantas de abacaxi após oito meses, partindo-se de apenas uma planta com oito mudas e 10 gemas axilares cada. Esse grande número de plantas obtido deve-se à otimização do protocolo de micropropagação utilizando o meio MS (Murashige; Skoog, 1962) líquido com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina).

Alguns estudos relacionados com o estado físico do meio de cultura em bromeliáceas também têm sido realizados, principalmente com abacaxizeiro (Escalona et al., 1999; Feuser et al., 2001; Oliveira et al., 2007), com o objetivo de facilitar o preparo e manipulação da cultura e, especialmente, para baratear os custos deste sistema de propagação.

Ademais, a utilização do estiolamento de brotações *in vitro* também tem sido utilizada. Esta é uma técnica de cultivo na ausência da luz, que resulta na indução do alongamento dos entrenós, proporcionando

maior eficiência para obtenção de brotos dos explantes, pois evita injúria na zona de regeneração e impede a formação de calos (Kiss et al., 1995; Praxedes et al., 2001; Carvalho et al., 2009; Santos et al., 2009; Hartmann; Kester, 2011). Isso se deve ao fato de que o nível endógeno de citocininas no escuro é maior do que na presença de luz, fator que pode resultar em aumento do número de brotações (Suzuki, 1999). Este efeito ainda poderia ser maior com a aplicação de Giberelinas, uma vez que esse regulador vegetal pode promover uma hiperalongação do caule pelo estímulo à divisão e alongamento das células (Sponsel; Hedden, 2004; Dias et al., 2011).

No entanto, existem outros fatores primordiais na produção de mudas, como a aclimatização e o estabelecimento dessas plantas, uma vez que grandes perdas são observadas nessa fase devido ao estresse causado pela mudança do ambiente e às condições *ex vitro*. Dessa forma, o uso de substratos adequados e reguladores vegetais (auxinas) na indução do enraizamento também podem auxiliar na produção das mudas garantindo o sucesso do protocolo de regeneração (Silva et al., 1998; Mengesha et al., 2013).

Nesse sentido o presente estudo teve como objetivo, desenvolver um protocolo de multiplicação de abacaxi, seleção lapar 8. O protocolo incluiu a multiplicação *in vitro* através do estiolamento na ausência de luz e tratamento com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>); enraizamento *in vitro* com o uso de reguladores vegetais e o enraizamento *ex vitro* com o uso de diferentes tipos de substrato na aclimatização das mudas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e desinfestação

Foram utilizadas brotações oriundas de plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), seleção lapar 8, estabelecidas *in vitro*, originalmente produzidas pela cultura de gemas axilares excisadas de coleção de mudas mantidas em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), em Londrina, PR. As brotações foram submetidas ao processo de desinfestação com solução com Metiltiofan na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>, seguida por tríplice lavagem em água destilada, aplicação de Streptomicina a 2,4 g L<sup>-1</sup>, por 15 minutos, tríplice lavagem

em água destilada, hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos seguido de nova lavagem tríplice com água destilada.

### **Multiplicação *in vitro***

Após desinfecção as brotações foram cultivadas em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) líquido e semi-sólido, suplementados com quatro concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0, 1, 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>), combinados com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA). As plantas foram mantidas sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 30 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 h a 25 °C ± 2 °C e UR de 55%. A avaliação do experimento ocorreu aos 30 dias da data de instalação e as variáveis analisadas foram número de brotações, comprimento médio das brotações e presença de raízes.

### **Alongamento e estiolamento *in vitro***

As brotações provenientes do melhor tratamento (1 mg L<sup>-1</sup>) foram então colocados em tubos de ensaio contendo meio MS sólido suplementado com três concentrações (0, 4,3 e 8,7 mg L<sup>-1</sup>) de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). As plantas foram mantidas no escuro, a 25 °C ± 2 °C e UR de 55%. A avaliação do experimento ocorreu aos 30 dias da data de instalação e as variáveis analisadas foram número de brotos por explante (NB), comprimento dos brotos (CB), número total de folhas do explante (NF), e presença de calo (C) e raiz (R).

### **Enraizamento *in vitro***

As plantas obtidas pelo melhor tratamento, após multiplicação, foram então submetidas aos tratamentos para enraizamento *in vitro* que constituiu no uso de diferentes concentrações de ácido indol butírico (AIB): 0; 0,25; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup>. Após 30 dias de cultivo *in vitro* as plantas foram avaliadas quanto ao número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das três maiores raízes em cm (C3R), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e número de brotos (NB). Após a avaliação, as plantas foram então aclimatizadas em casa de vegetação com nebulização intermitente, em tubetes (115 cm<sup>3</sup>) contendo Plantmax<sup>®</sup> como substrato. Após 30 dias na casa de vegetação foram avaliadas a porcentagem de plantas enraizadas (PE%), número de raízes (NR), comprimento das três maiores

raízes em cm (C3R), altura da parte aérea (APA) e massa fresca da planta inteira em gramas (MFP).

### **Enraizamento *ex vitro***

Nesse experimento foram utilizadas plantas multiplicadas em meio MS líquido sem suplementação com reguladores de crescimento. As plantas sem raízes foram acondicionadas em tubetes (115 cm<sup>3</sup>) e aclimatizadas em três diferentes substratos, fibra de coco, vermiculita e Plantmax<sup>®</sup>, e mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente por 30 dias. As plantas foram então avaliadas quanto aos seguintes parâmetros: número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das três maiores raízes (C3R), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR).

### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial para a multiplicação *in vitro* e o inteiramente casualizado para os demais experimentos, com 5 repetições e 10 explantes por unidade experimental, em todos os experimentos. Para testar a homogeneidade das médias utilizou-se o teste de Bartlett e para a comparação de médias, os dados foram submetidos ao Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico Sisvar<sup>®</sup> (Ferreira, 2008).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Multiplicação *in vitro***

Houve efeito significativo da interação entre as concentrações de BAP testadas e a consistência do meio de cultura (líquido e semi-sólido) para as variáveis número de brotações, comprimento médio das brotações e formação de raízes (Tabela 1).

A utilização de BAP no meio de cultura foi considerada eficiente para a multiplicação *in vitro* do abacaxi, o que pode ser evidenciado pela formação de um grande número de brotações por explante, tanto no meio de cultura líquido (10,78, 10,28 e 9,32 para 1, 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) como no semi-sólido (11,25, 12,15 e 9,32 para 1, 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente).

Entretanto, não houve diferenças estatísticas entre as doses de BAP testadas (Tabela 1) para esta variável. A aplicação de BAP também apresentou efeito significativo para o comprimento médio das brotações e formação de raízes (Tabela 1).

Outros autores também obtiveram resultados melhores na multiplicação de abacaxi, quando usaram meio com BAP. A adição do BAP também foi necessária para a indução de brotações *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus* cv. Cayenne) (Kiss *et al.*, 1995), abacaxizeiro ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus* Lindl.) (Santos *et al.*, 2008), *Ananas bracteatus* cv. *striatus* (Costa; Zaffari., 2005) e abacaxi 'Smooth Cayenne' (Araujo *et al.*, 2008). Sá *et al.* (2000) propagaram, por meio de segmentos estiolados, abacaxizeiro comestível, e registraram as maiores médias para o número de brotos (6,0) no meio contendo 10 $\mu$ M de ANA e de BAP. O tratamento com BAP a 2 mg L<sup>-1</sup> foi mais eficiente para regenerar propágulos de *Ananas comosus* (híbrido PE x SC-52), independentemente do número de nós nos brotos, obtendo-se em média 10,4 propágulos por broto estiolado. Quando se associou ANA a 1,86 mg L<sup>-1</sup> ao BAP, o número médio de propágulos regeneradas por broto caiu para 8,2. Os valores médios de propágulos regenerados em meio com cinetina foram estatisticamente iguais aos obtidos com ANA + BAP. Em meio sem reguladores, a regeneração de propágulos foi inferior à dos demais tratamentos (2,9 propágulos por broto) (Barboza; Caldas, 2001), corroborando com o presente estudo, onde o número de brotações foi de 2,75 e 3,0 (meio líquido e

semi-sólido, respectivamente) no meio sem adição de BAP.

O meio de cultura líquido mostrou-se superior para o comprimento médio das brotações e para a formação de raízes (tratamentos com 0 e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP) (Tabela 1).

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 propágulos *in vitro* (Chen; Ziv, 2001). Assim, o maior contato dos explantes com o meio, que acontece nos cultivos em meio líquido, pode aumentar a absorção de água e nutrientes quando comparado ao meio semi-sólido, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação de brotos e, ainda, acúmulo de massa seca (Pereira; Fortes, 2003). O estado físico do meio de cultura, portanto, pode estar relacionado ao desempenho assimilatório das plantas durante o período de cultivo do material vegetal (Ziv, 1995). Isso pode explicar o melhor desempenho das plantas cultivadas em meio líquido quanto às variáveis, número de raízes e comprimento das brotações.

#### Alongamento e estiolamento *in vitro*

O GA<sub>3</sub> apresentou efeito significativo para a variável comprimento médio das brotações, entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas de 4,3 e 8,7 mg L<sup>-1</sup>. Para as variáveis número de brotações, número de folhas e presença de raízes o uso de GA<sub>3</sub> não foi considerada eficiente (Tabela 2).

O uso do meio MS contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico foi uma estratégia eficiente para alongar as brotações pelo sistema de imersão temporário,

Tabela 1 - Multiplicação *in vitro* de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) submetidas a diferentes concentrações de BAP e dois tipos de meio de cultura (líquido e semi-sólido), para número de brotações, comprimento médio das brotações (cm) e presença de raízes, após 30 dias de cultivo.

BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Número de brotações		Comprimento médio das brotações (cm)		Raízes	
	Líquido	Semi- sólido	Líquido	Semi- sólido	Líquido	Semi-sólido
0	2,75 bA	3,00 bA	2,27 aA	0,86 aB	1,40 aA	0,00 bB
1	10,78 aA	11,25 aA	2,27 aA	0,72 aB	1,00 aA	1,00 aA
2	10,78 aA	12,15 aA	2,27 aA	0,28 bB	1,00 aA	0,00 bB
4	9,32 aA	9,45 aA	1,65 bA	0,25 bB	0,23 bA	0,00 bA
CV (%)	34,23		19,31		57,02	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para concentração de BAP e maiúscula na horizontal, para consistência do meio, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

entretanto, segundo os autores houve a necessidade de se alcançar a diferenciação das brotações antes do ácido giberélico agir sobre as brotações (Escalona et al. 1999). Dias et al. (2011) também obteve maior comprimento da parte aérea de brotos de abacaxi quando adicionou 1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> ao meio de cultura, no entanto, esse valor não diferiu significativamente da concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

Moreira et al. (2003) testaram diferentes combinações de ácido naftaleno acético (ANA) e BAP em meio MS, combinado a condição de escuro, para indução de estiolamento de brotações do abacaxizeiro cv. Pérola. Esses autores obtiveram maior estiolamento, com comprimento médio de brotações de 18,86 cm, em meio sem reguladores, mas o escuro foi essencial. Souza et al. (2010) testaram a influência de ANA e GA<sub>3</sub> no estiolamento e regeneração de abacaxizeiros cultivados *in vitro* e observaram que a auxina promoveu maior estiolamento de brotações do que a giberelina, todavia, apresentou baixo nível de regeneração.

Névola et al. (2005) induziram estiolamento em brotações de abacaxizeiro somente transferindo-as para condição de escuro por dois meses. Em maçã, a fase de alongamento de brotações *in vitro* foi testada em diferentes consistências do meio MS/2, acrescido de combinações de benzilaminopurina (BAP), ácido indol 3 butírico (AIB) e GA<sub>3</sub>. Brotações mais longas foram obtidas em meio duplafase, com BAP e AIB, sendo que a presença de GA<sub>3</sub> teve pouca influência (Ribas; Zanette, 1992).

Aparentemente, o escuro tem sido o fator mais importante e suficiente para o estiolamento, ou possivelmente, níveis endógenos de giberelina já estão presentes e são suficientes para o alongamento. No

entanto, ainda falta a diferenciação das brotações, o que justificaria a ausência de diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos com GA<sub>3</sub> na multiplicação, mas não no comprimento médio das brotações (Tabela 2).

#### Enraizamento *in vitro* e aclimatização

Embora tenha ocorrido 100% de sobrevivência das mudas, o uso do ácido indolbutírico não se mostrou eficiente de forma geral para o enraizamento *in vitro* de plantas de abacaxizeiro (Tabela 3) e para a aclimatização das plantas em Plantmax® (Tabela 4). Verificou-se ainda que plantas não tratadas com AIB obtiveram maior número e comprimento de raízes, e maior comprimento e massa seca da parte aérea após a aclimatização que plantas tratadas.

Os mesmos resultados também foram observados para *Ananas comosus* L. (Sripaoraya et al. 2003), sendo comum a aclimatização de abacaxi sem o prévio enraizamento *in vitro* (Kiss et al., 1995; Almeida et al., 2002; Carvalho et al., 2012).

#### Enraizamento *ex vitro*

Isto ocorre, provavelmente, devido à concentração endógena satisfatória de ácido 3-indolacético (IAA), que atua na formação de raízes. Esta auxina natural, que é produzida nas folhas e brotações, move-se basipetamente, aumentando a sua concentração na base da planta, juntamente com outras substâncias endógenas, estimulando a formação das raízes (Lone et al., 2010; Hartmann et al. 2011).

Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos no enraizamento *ex vitro*, com exceção da variável número de raízes, na qual o Plantmax® foi superior (Tabela 5).

Tabela 2 - Alongamento *in vitro* de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), submetidas a diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>, para número de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número de folhas e formação de raízes, após 30 dias de cultivo.

GA <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Número de brotações	Comprimento médio das brotações (cm)	Número de folhas	Raízes
0	1,60 A	3,43 B	5,06 A	0,90 A
4,3	1,64 A	4,32 A	4,06 A	0,76 A
8,7	1,62 A	4,54 A	3,95 A	0,90 A
CV (%)	33,83	18,39	24,14	15,03

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para concentração de GA<sub>3</sub>.

Tabela 3 – Enraizamento *in vitro* de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), submetidas a diferentes concentrações de AIB, para número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das três maiores raízes em cm (C3R), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca das raízes (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e número de brotos (NB), após 30 dias.

AIB (mg L <sup>-1</sup> )	NF	NR	C3R (cm)	MFPA	MFR	MSR	MSPA	NB
0	10,28 c	9,24 ab	10,31 a	2,45 a	0,54 a	0,60 a	0,53 a	0,60 a
0,25	10,32 c	10,12 b	8,45 a	2,38 a	0,44 a	0,05 b	0,20 b	0,08 b
0,5	11,36 b	9,60 ab	9,01 a	1,86 b	0,41 a	0,04 b	0,17 b	0,12 b
1	12,56 a	11,12 a	9,56 a	2,19 a	0,40 a	0,05 b	0,19 b	0,08 b
CV (%)	3,86	7,72	25,22	18,8	18,8	3,11	29,72	62,58

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para concentração de AIB.

Tabela 4 – Aclimatização em Plantmax® de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), submetidas a diferentes concentrações de AIB enraizadas *in vitro*, para porcentagem de plantas enraizadas (PE%), número de raízes (NR), comprimento das três maiores raízes em cm (C3R), altura da parte aérea (APA) e massa fresca da planta inteira em gramas (MFP).

AIB (mg L <sup>-1</sup> )	PE%	NR	C3R (cm)	APA (cm)	MFP (g)
0	100 a	14,04 a	14,59 a	14,24 a	12,50 a
0,25	100 a	5,16 b	6,94 b	4,62 b	1,24 b
0,5	100 a	5,76 b	6,46 b	4,92 b	1,26 b
1	100 a	5,60 b	5,34 b	4,00 b	0,95 b
CV (%)	0	54,24	44,86	58,06	28,98

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, para concentração de AIB não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5 – Enraizamento *ex vitro* de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), submetidas a diferentes substratos, para número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento das três maiores raízes (C3R), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR).

Tratamentos	NF	NR	C3R (cm)	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Plantmax®	9,04 a	5,00 a	9,02 a	1,26 a	0,09 a	0,13 a	0,03 a
Vermiculita	8,32 a	4,32 b	9,49 a	1,23 a	0,12 a	0,12 a	0,03 a
Fibra de coco	8,44 a	4,04 b	7,95 a	1,06 a	0,07 a	0,10 a	0,04 a
CV (%)	7,85	7,56	13,44	19,97	57,66	24,15	39,63

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para tipos de substratos.

Mengesha *et al.* (2013) observaram diferença significativa no número de raízes por planta, massa seca e fresca da parte aérea e raiz de abacaxi (*Ananas comosus* L., var. Smooth cayenne), quando usaram diferentes substratos (mistura de solo e pellet de turfa Jiffy-7), resultados esses diferentes do observado no presente estudo. No entanto, esses autores avaliaram as plantas 2,5

meses após o plantio, o que pode ter permitido a melhor visualização do efeito dos substratos no desenvolvimento das plantas.

O enraizamento *ex vitro* representa uma alternativa interessante visando eliminar uma etapa do cultivo *in vitro*, pois pode contribuir para a redução de custos em um sistema de propagação *in vitro* de plantas (Phulwaria *et al.*, 2012). Além disso,

o enraizamento de mudas *ex vitro* pode apresentar vantagens quando comparado ao *in vitro*, dentre as quais se destacam a formação de um sistema radicial de melhor qualidade, uma melhor adaptação e maior taxa de sobrevivência da muda formada (Yan et al., 2010; Phulwaria et al., 2013).

## CONCLUSÕES

Na fase de multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), seleção lapar 8, a utilização de BAP no meio de cultura foi considerada eficiente, tanto no meio de cultura líquido como no semi-sólido. O meio de cultura líquido mostrou-se superior para o comprimento médio das brotações e para a formação de raízes. Não é necessária a presença de giberelina no meio de cultura para estiolamento das brotações. O uso do ácido indolbutírico não se mostrou eficiente para o enraizamento *in vitro* de plantas de abacaxizeiro e para a aclimatização das plantas em Plantmax®. O enraizamento *ex vitro* mostrou respostas similares para os substratos testados, com exceção da variável número de raízes, na qual o Plantmax® foi superior aos demais.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W. A. B. et al. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24(2):296-300, 2002.
- AQUIJE, V. M. F. G. et al. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Reports**. Heidelberg, 29:1109-1117, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d900876412268080>>. Acesso em ago., 2010.
- ARAUJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'smooth cayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Revista Ceres**. 55(5):455-460, 2008.
- 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**. 36(3):417-423, 2001.
- CARVALHO, A. C. P. P. et al. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, 27:103-108, 2009.
- CARVALHO, A. C. P. P. et al. Estiolamento *in vitro* de plantas: Alternativa para a produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental. **Embrapa Agroindústria Tropical: Circular Técnica**. Fortaleza, n. 42, 12 p., 2012.
- CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture *Narcissus*. **Plant Cell Reports**. 20(1):22-27, 2001.
- COSTA T.; ZAFFARI G. R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Shultz) cv. *estriatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 11(2):109-113, 2005.
- CRESTANI, M. et al. Das Américas para o Mundo - Origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**. 40(6): 1473-1483, 2010.
- DIAS, M. M. et al. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. **Semina: Ciências Agrárias**. 32(2):513-520, 2011.
- ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**. 18(9):743-748, 1999.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...**45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**. UFScar, São Carlos, SP, p.255-258, 2000.
- 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**. 23(1):6-10, 2001.
- GARITA H.; GÓMEZ L. Micropropagation de la variedad de piña Champaka F-153. **Agronomia Costarricense**. 24:63-73, 2000.
- GEORGE, E. F. Factors affecting growth and morphogenesis. In: \_\_\_\_\_ . **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed., Edington: Exegetics, 1993, p.183-230.
- GEORGE E. F. Rooting and establishment. In: GEORGE E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics Limited, 1996, p. 670-732.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011, 928p.
- KISS, E. et al. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **Hort Science**. 30(1):127-129, 1995.
- LONE, A. B. et al. Enraizamento de estacas de azaléia (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono em AIB e diferentes substratos. **Ciência Rural**. 40(8):1720-1725, 2010.

- MACÊDO, C.E.C. et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 25(3):501-504, 2003.
- MENGESHA, A.; AYENEW, B.; TADESSE, T. Acclimatization of *in vitro* propagated pineapple (*Ananas comosus* L.), var. Smooth Cayenne plantlets to *ex vitro* condition in Ethiopia. **American Journal of Plant Sciences**. 4:317-323, 2013.
- MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, New York, 1987, p.296-317.
- MOREIRA, M. A. et al. Indução ao estiolamento '*in vitro*' de brotos de abacaxi cv. Pérola. **Revista da Universidade de Alfenas**. 5:193-197, 1999.
- MOREIRA M. A. et al. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**. 27:1002-1006, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:473-479, 1962.
- NÉVOLA, C. C. et al. Temperature determines the occurrence of CAM or C3 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 41:832837, 2005.
- OLIVEIRA, M. K. T. et al. Propagação *in vitro* da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). **Caatinga**. 20(3):167-171, 2007.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 38(9):1035-1043, 2003.
- PRAXEDES, S. C. et al. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**. 14:13-15, 2001.
- PHULWARIA, M. et al. An improved micropropagation of *Terminalia bellirica* from nodal explants of mature tree. **Acta Physiologiae Plantarum**. 34(1):299-305, 2012.
- PHULWARIA, M. et al. An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb., a threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert. **Industrial Crops and Products**. 42(1):25-29, 2013.
- RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv. Gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 4(1):39-43, 1992.
- SÁ, M. E. L. et al. Propagação *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus*) por meio de segmentos estiolados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16. **Resumos...** Fortaleza: SBF. p. 21, 2000.
- SANTOS, M. do D. M.; RIBEIRO, D. G.; TORRES, A. C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43(9):1115-1120, 2008
- SANTOS, M. DA C. et al. Efeito do estiolamento na micropropagação de abacaxi cultivar imperial. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 5(2):101-110, 2009.
- SANTOS P. C. et al. Produção de mudas do tipo rebentão, utilizando coroas de três cultivares de abacaxi inoculadas com fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, 33(3):954-961, 2011.
- SILVA, A. B. et al. Aclimação de brotações de abacaxi (*Ananas comosus* L.) produzidas *in vitro*: Ação de Agromix®, húmus e Kelpak®. **Revista da Universidade de Alfenas**. 4:107-110, 1998.
- SIMÃO, S. O abacaxizeiro. In: SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p.249-288.
- SOUZA, F. V. D. et al. Residual effect of growth regulators in etiolation and regeneration of *in vitro* pineapple plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 32(2):612-617, 2010.
- SPONSEL, V. M.; HEDDEN, P. Gibberilin biosynthesis and inactivation. In: DAVIE, P.J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** 3 Ed., Kluwer Academic Publishers, New York, 2004, 750p.
- SRIPAORAYA, S. et al. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**. 39(5):450-454, 2003.
- YAN, H. et al. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**. 32(1):115-120, 2010.
- ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**. 393(1):25-38, 1995.