

REGULADORES VEGETAIS NA MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO¹

Isabela Miranda de Toledo Piza²
Giuseppina Pace Pereira Lima²
Oswaldo Galvão Brasil²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos de diferentes combinações de BAP e NAA, no desenvolvimento, multiplicação e enraizamento, durante a micropropagação *in vitro* do abacaxizeiro. Gemas axilares foram inoculadas em meio MS, acrescido de 0, 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0, 1 e 2 mg.L⁻¹ de NAA em todas as combinações possíveis. As plântulas obtidas foram multiplicadas no mesmo meio e enraizadas em meio MS suplementado com 0, 1 e 2 mg.L⁻¹ de IBA ou 0, 1 e 2 mg.L⁻¹ de NAA. Durante as fases da micropropagação foram avaliados a presença de contaminantes, a sobrevivência, o grau de desenvolvimento das gemas, as taxas de multiplicação, a formação e o comprimento de raízes. O uso de 2 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de NAA combinados induziram melhor sobrevivência, desenvolvimento e multiplicação; 2 mg.L⁻¹ de NAA proporcionou melhor enraizamento.

Palavras-chaves: *Ananas comosus*, BAP, NAA.

ABSTRACT

GROWTH REGULATORS ON PINEAPPLE MICROPROPAGATION

The purpose of this experiment was to study the effects of different combinations of BAP and NAA in pineapple micropropagation, development, multiplication and

¹ Projeto financiado pela Capes, parte da dissertação de mestrado do primeiro autor. Aceito para publicação em 20.11.2001.

² Departamento de Química e Bioquímica. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. UNESP, Cx. P. 545. 18618-000 Botucatu, SP. E-mail:isabelapiza@laser.com.br

rooting. Pineapple axillary buds were inoculated in MS medium supplemented with 0, 1 and 2 mg.L⁻¹ of BAP and 0, 1 and 2 mg.L⁻¹ of NAA in all possible combinations. Plantlets were obtained, multiplied in the same medium and rooted in MS medium supplemented with 0, 1 and 2 mg.L⁻¹ of IBA or 0, 1 and 2 mg.L⁻¹ of NAA. During the micropropagation the presence of contaminants, survival, development grade of buds, multiplication rates, root formation, and root average length were evaluated. The use of 2 mg.L⁻¹ of BAP and 1 mg.L⁻¹ of NAA promoted the best survival, development and proliferation, and 2 mg.L⁻¹ of NAA induced the best rooting.

Key words: *Ananas comosus*, BAP, NAA.

INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus*) é uma espécie tropical de grande interesse econômico para o Brasil. As dificuldades do controle da fusariose e da obtenção de mudas saudias para plantio constituem os principais obstáculos a expansão dessa cultura. Um dos métodos que pode ser usado para a multiplicação do abacaxizeiro é a cultura de tecidos, que possibilita rápida propagação clonal *in vitro* dessas plantas, objetivando a seleção e produção de mudas saudias de clones de abacaxi (16).

A espécie e o tipo de explante respondem de forma diferente à ação dos diversos tipos de reguladores de crescimento utilizados em culturas *in vitro*. Os principais tipos de reguladores, com efeito sobre a micropropagação, são as citocininas e auxinas (4), em que as concentrações são fatores determinantes para o desenvolvimento da planta *in vitro*.

Segundo Brownleader e Dey (2), altas concentrações de citocinina, combinadas com baixas concentrações de auxina, conduzem à proliferação de brotos adventícios, enquanto uma razão inversa favorece a formação de raízes.

Objetivou-se, com este trabalho, avaliar o efeito de BAP (benzilaminopurina) e NAA (ácido naftalenoacético) em diversas concentrações sobre a micropropagação de plantas de *Ananas comosus* L. Merr. e estabelecer um meio de cultura adequado para seu cultivo *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas mudas saudias do tipo "coroa", obtidas de frutas maduras de abacaxi, cultivar Smooth Cayenne. As folhas da coroa foram cuidadosamente removidas, seguindo sua filotaxia. As gemas axilares foram extraídas com auxílio de bisturi, com cortes em forma de pirâmide, preservando-se aproximadamente 2 mm de tecido adjacente. Essas gemas

foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, em sala asséptica, por imersão em hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa, 2,5 % de cloro ativo) a 20%, por 20 minutos, e lavadas três vezes em água destilada esterilizada.

O meio de cultura consistiu dos sais básicos de Murashige e Skoog (9), acrescido de 1 mg.L^{-1} de tiamina como fonte de vitaminas, 30 g.L^{-1} de sacarose e 100 mg.L^{-1} de inositol, sendo utilizado na forma líquida, com ponte de papel de filtro, para suporte dos explantes. Foram estudadas as associações entre auxina e citocinina, nas concentrações de 0, 1 e 2 mg.L^{-1} de NAA e 0, 1 e 2 mg.L^{-1} de BAP em várias combinações, com 12 repetições por tratamento (9 tratamentos x 12 repetições por tratamento = 108 gemas inoculadas). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado durante 15 minutos, a 121°C e $1,5 \text{ atm}$ de pressão. Os explantes (gemas axilares) foram inoculados em tubos de ensaio ($25 \times 150 \text{ mm}$) contendo 15 ml de meio de cultura e cultivados sob fotoperíodo de 12 horas/luz, intensidade luminosa de $35 \text{ microM.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $28 \pm 4^\circ \text{C}$.

Ao final de 30 dias, com uma subcultura (troca para meio fresco) aos 15 dias depois da inoculação, os explantes foram avaliados, observando-se a taxa de sobrevivência e o grau de desenvolvimento das gemas, seguindo os seguintes critérios: gemas mortas, gemas sem desenvolvimento, gemas desenvolvidas (intumescimento, coloração verde), gemas com emissão de parte aérea, gemas contaminadas por fungos e, ou, bactérias.

As plantas sobreviventes da fase anterior (estabelecimento) foram subcultivadas nas mesmas condições, em meio líquido, constituindo-se a fase de multiplicação.

Foram avaliadas após 60 dias, com subculturas a cada 20 dias. Na primeira subcultura, foram transferidas dos tubos de ensaio para frascos de vidro de 268 ml de capacidade, com 30 ml de meio de cultura. As avaliações foram feitas, verificando-se o número de brotações por explante.

As plantas obtidas foram selecionadas aleatoriamente, transferidas para meio básico de MS, na metade de suas concentrações de sais, acrescido de 40 g.L^{-1} de sacarose, suplementado com IBA (ácido indolbutírico), nas concentrações de 0, 1 e 2 mg.L^{-1} , ou NAA nas concentrações de 0, 1 e 2 mg.L^{-1} , com 20 repetições por tratamento.

Após 30 dias com subcultura aos 15 dias, foram avaliados a formação e o número médio de raízes, seu comprimento médio, em centímetros, e o número médio de novas brotações por explante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fase de estabelecimento in vitro.

O Quadro 1 apresenta os resultados obtidos na fase de estabelecimento e desenvolvimento de gemas axilares de abacaxi, nos primeiros 30 dias de cultivo.

QUADRO 1 - Desenvolvimento de gemas axilares de abacaxi, inoculadas em meio líquido MS, acrescido de diversas concentrações de auxina e citocinina, após 30 dias da inoculação						
Tratamentos BAP/NAAmg .L ⁻¹	Total de gemas inoculadas	Gemas mortas	Gemas sem desenvolvimento	Gemas desenvolvidas	Gemas com parte aérea	Gemas contaminadas por fungos
0/0	12	5	4	3	0	0
0/1	12	3	4	4	1	0
0/2	12	2	3	4	2	1
1/0	12	2	5	4	1	0
1/1	12	1	5	3	3	0
1/2	12	1	2	5	3	1
2/0	12	0	0	5	6	1
2/1	12	0	0	8	4	0
2/2	12	0	0	7	5	0
Total	108	14	23	43	25	3

Em relação ao processo de desinfestação, foi observado que o uso de solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa) a 20% foi satisfatório para eliminação de microrganismos. Das 108 gemas inoculadas, ocorreu contaminação por fungos em apenas três explantes, não sendo observada contaminação por bactérias em nenhuma fase de micropropagação deste trabalho.

O número de gemas mortas no total foi 14 (12,9%), as quais se apresentavam totalmente oxidadas. Segundo Grattapaglia e Machado (5), um problema freqüente durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos, que são liberados pelas células. Os produtos da oxidação são tóxicos ao resto do explante e se difundem no meio de cultura, escurecendo os tecidos. Quando estes são lesados durante a preparação do explante, os compostos fenólicos que estão acumulados em grandes quantidades nos vacúolos se misturam ao conteúdo dos plastídios e outras organelas onde estão confinadas as polifenoloxidasas e aparece a coloração negra ou marrom como conseqüência do processo de oxidação.

Estes compostos oxidados são altamente reativos e inibem a atividade enzimática, podendo resultar em escurecimento letal dos explantes (4).

Com relação a gemas sem desenvolvimento, notou-se que elas apareceram com maior frequência nos tratamentos sob baixas concentrações de fitorreguladores. Pannetier e Lanaud (11), trabalhando com gemas axilares de abacaxi, observaram a heterogeneidade dessas estruturas, devido a diferentes estados fisiológicos e ontogênicos no momento da retirada das coroas, fatores que interferiram no seu desenvolvimento *in vitro*. À medida que as concentrações de BAP e NAA aumentaram, ocorreu maior número de gemas desenvolvidas, apresentando-se mais vigorosas e com melhor conformação. Matos et al. (8) obtiveram 70% de explantes sobreviventes utilizando meio MS, suplementado com $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

Nas concentrações de 0 mg.L^{-1} de BAP e 2 mg.L^{-1} de NAA ocorreu o aparecimento de algumas raízes, junto com o desenvolvimento das gemas, confirmando a ação do NAA na formação de raízes. Segundo Grattapaglia e Machado (5), concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação e favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calos, em detrimento da multiplicação e do desenvolvimento.

O início de emissão de parte aérea ocorreu em maior porcentagem em tratamentos com maiores concentrações de fitorreguladores. Embora nem sempre sejam necessárias no meio de desenvolvimento, as auxinas são utilizadas com o intuito de estimular o crescimento das partes aéreas (4).

Fase de multiplicação

Após o estabelecimento da cultura, os explantes sobreviventes de cada tratamento foram subcultivados no mesmo meio e mesmas concentrações de fitorreguladores, para se verificar a influência destes (BAP e NAA) na taxa de multiplicação. O critério para avaliação usado foi o número de novas brotações por explante. Estes resultados podem ser observados no Quadro 2.

O número de brotações aumentou, à medida que aumentou a concentração de fitorreguladores, principalmente em relação ao BAP. Esses resultados, semelhantes a vários na literatura (4, 7, 16), vêm reforçar o conceito de que as citocininas são essenciais ao processo de proliferação de brotos. O uso de BAP na fase de multiplicação foi fundamental para o aparecimento expressivo de brotações, o que é evidenciado quando se comparam, nesta fase, os tratamentos com e sem BAP. A interação entre as duas dosagens máximas, ou seja, 2 mg.L^{-1} de BAP e 2 mg.L^{-1} de NAA, induziu a formação de oito brotos por explante,

em média. Esse resultado foi superior ao encontrado por Nagao e Araújo (10), que obtiveram média de 3,3 brotações por explante, utilizando meio de cultura MS, adicionado de 5 mg.L^{-1} de BAP, na fase de multiplicação.

QUADRO 2 - Taxa de multiplicação (número médio de brotos por explante) aos 60 dias da inoculação, em meio líquido MS, suplementado com BAP e NAA, nos diversos tratamentos			
Tratamentos BAP/NAA mg.L^{-1}	Nº de explantes inoculados	Nº total de brotos obtidos	Nº de brotos por explante
0/0	7	5	0,7
0/1	9	9	1,0
0/2	9	13	1,4
1/0	10	16	1,6
1/1	11	29	2,6
1/2	10	26	2,6
2/0	11	67	6,0
2/1	12	95	7,9
2/2	12	98	8,1

Embora os resultados deste trabalho tenham mostrado maior número de brotações na concentração de 2 mg.L^{-1} de BAP e 2 mg.L^{-1} de NAA, é importante ressaltar que, mesmo sendo numerosas, algumas dessas brotações apresentavam características amorfas, com pouco crescimento, disformes, atrofiadas, formando uma massa de difícil separação da planta de origem. Na concentração de 2 mg.L^{-1} de BAP e 1 mg.L^{-1} de NAA, considerada a melhor no presente trabalho, com 7,9 brotos por explante, essas brotações emitidas apresentavam aparência normal, alongada, de fácil separação. Esse valor é superior aos dados citados na literatura: Fitchet (3) obteve em média seis brotações por explante, em meio MS suplementado com zeatina, com gemas de abacaxi S. Cayenne em três meses de cultivo, e Mathews e Rangan (6) obtiveram em média 4,7 brotações por explante em cultivo *in vitro* de variedades comerciais de abacaxi em meio MS adicionado de cinetina, em oito ou dez semanas.

Os reguladores de crescimento BAP e NAA parecem interagir não só na produção total de brotações, mas também no seu crescimento. Essa interação entre os dois reguladores de crescimento faz com que o abacaxi seja considerado uma daquelas inúmeras plantas que, para maior proliferação de brotações, são tratadas como dependentes não só de citocininas, mas também de auxinas (13). Também, outros pesquisadores

reforçam a hipótese de que a proliferação de brotos *in vitro* pode ser maximizada com o emprego conjunto de dois ou mais grupos de reguladores de crescimento (1). Em *Citrus sinensis*, a maximização da produção de brotos ocorreu quando BAP e NAA apareciam combinados no meio de cultura (12). Neste trabalho, os mesmos resultados foram observados: a combinação de BAP e NAA proporcionou as melhores taxas de multiplicação.

Mesmo nos tratamentos sem a citocinina BAP, algumas novas brotações apareceram, talvez devido a pequenas quantidades de citocininas endógenas do material inoculado.

Segundo Arello e Pinto (1), é importante ressaltar que os níveis em que esses fitorreguladores devem aparecer para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos variam de acordo com o genótipo da planta considerada e devem ser determinados, em cada caso, experimentalmente. Esses autores ainda consideram que, de modo geral, as concentrações das citocininas são sempre superiores às das auxinas, o que acaba por proporcionar maior taxa de multiplicação.

Quanto às dosagens de citocininas, se muito altas, Von Arnold (15) observou que, embora numerosas, estas brotações são atrofiadas e pouco desenvolvidas, o que as torna nada semelhantes ao material que lhes deu origem. O autor salienta que, em determinadas situações, as citocininas deixam de ser benéficas e passam a ser maléficas ao desenvolvimento de explantes cultivados *in vitro*.

Fase de enraizamento

Observou-se o efeito do NAA e do IBA no enraizamento, tendo a concentração de 2 mg.L⁻¹ de NAA mostrado maior porcentagem de plantas enraizadas, após 30 dias da inoculação em meio de enraizamento. Quando se comparou o efeito do IBA e do NAA no enraizamento aos 30 dias, 2 mg.L⁻¹ de IBA levaram ao enraizamento de 85% das plantas, enquanto que 2 mg.L⁻¹ de NAA produziram 100% das plantas enraizadas. Esses resultados vêm reforçar o conceito de que as auxinas estão envolvidas no processo de enraizamento (Quadros 3 e 4).

O número médio de raízes por planta, comprimento médio de raízes em centímetros e o número médio de novos brotos também foi maior nos tratamentos suplementados com NAA, em comparação com o IBA. Em relação às testemunhas (plantas em meio sem fitorreguladores), a porcentagem de enraizamento e o número e comprimento médio de raízes foram menores quando comparados aos demais tratamentos. Geralmente o IBA é citado como a auxina mais usada em enraizamento em plantas micropropagadas, mas em alguns casos, como neste trabalho,

o melhor seria optar pelo NAA, que mostrou melhor resultado e tem menor custo.

QUADRO 3 - Enraizamento de plantas em meio líquido MS, suplementado com IBA, nas concentrações de 0, 1 e 2 mg.L⁻¹, com 20 repetições por tratamento, avaliadas 30 dias após a inoculação

IBA (mg.L ⁻¹)	Total enraizado	Nº médio de raízes por planta	Comprimento médio de raízes (cm)	Nº médio de novos brotos por planta
0	65%	4,2	3,1	1,2
1	75%	5,1	3,4	1,9
2	85%	6,2	3,0	2,0
Média	75%	5,1	3,1	1,7

QUADRO 4 - Enraizamento de plantas em meio líquido MS, suplementado com NAA, nas concentrações de 0, 1 e 2 mg.L⁻¹, com 20 repetições por tratamento, avaliadas 30 dias após a inoculação

NAA (mg.L ⁻¹)	Total enraizado	Nº médio de raízes por planta	Comprimento médio de raízes (cm)	Nº médio de novos brotos por planta
0	70%	5,3	3,3	1,3
1	90%	6,7	3,1	1,2
2	100%	8,1	3,9	3,8
Média	86%	6,7	3,4	2,1

Verificou-se, neste trabalho, após a transferência de plantas individuais para meio de enraizamento, a emissão de novas brotações. Quando se analisou a influência dos tratamentos utilizados anteriormente, com a associação de BAP e NAA em relação aos meios de enraizamento testados, observou-se que a emissão de novas brotações elevou-se à medida que ocorria aumento da concentração de BAP, testado anteriormente. Quando esse assumiu valores de 2 mg.L⁻¹, ocorreu o maior número de novas brotações. É possível que tenha ocorrido efeito residual do BAP, utilizado na fase de multiplicação, induzindo as plantas a emitirem novas brotações, nessa fase do cultivo *in vitro*.

Segundo Vogelmann et al. (14), a absorção do regulador de crescimento é diretamente proporcional à sua concentração no meio de cultura, logo pode-se supor que as plantas cultivadas no nível mais

elevado de BAP na fase de multiplicação absorveram maiores quantidades desse fitorregulador e, em razão disso, houve a formação de novas brotações na fase de enraizamento. Verificou-se, assim, maior taxa de novas brotações na combinação de 2 mg.L⁻¹ de BAP com 1 ou 2 mg.L⁻¹ de NAA ou IBA, na fase de enraizamento.

Segundo Grattapaglia e Machado (5), diluições das formulações básicas, como a usada nessa fase (MS na metade da concentração de sais), têm, na grande maioria das vezes, possibilitado melhor enraizamento. Mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento de raízes. Ainda, segundo os autores citados, os tipos e concentrações de auxina são as variáveis que em geral mais influenciam o enraizamento.

CONCLUSÕES

1) Os fitorreguladores BAP e NAA são necessários para a fase de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxi cv. Smooth Cayenne.

2) O uso de 2 mg.L⁻¹ de BAP e 1 mg.L⁻¹ de NAA combinados induzem melhor sobrevivência, desenvolvimento e multiplicação.

3) O meio de enraizamento suplementado com 2 mg.L⁻¹ de NAA é o mais eficiente.

REFERÊNCIAS

1. ARELLO, E. & PINTO, J. E. Propagação "in vitro" de *Kulmeyera coriacea*. I. Efeito das diversas concentrações combinadas de BAP e NAA na multiplicação de brotos. *Pesq. Agrop. Bras.*, 28: 25-31, 1993.
2. BROWNLEADER, M. D. & DEY, P. M. Plant cell biotechnology. In: Dey, P.M. & Harbone, J. B. (eds.). *Plant biochemistry*. Acad. Press, 1997. p. 517-29.
3. FITCHET, M. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapples. *Acta Hortic.*, 275: 261-6, 1990.
4. GONZALEZ, E. A. J. Cultivo de ápices y meristemas. In: Ponce, J.N.P. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba, Ediciones GEO, 1998. p.45-56.
5. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
6. MATHEWS, V. H. & RANGAN, T. S. Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. *Sci. Hortic.*, 14: 227-34, 1981.
7. MATHEWS, V. H.; RANGAN, T. S. & NARAYANASWAMY, S. Micropropagation of *Ananas sativus* "in vitro". *Z. Pflanzenphysiol.*, 79: 450-4, 1976.
8. MATOS, A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, A. S.; FUKUDA, W. M. G; SANTOS FILHO, H. P. & DANTAS, J. L. L. O uso da cultura de tecidos no Centro Nacional de Pesquisa da Mandioca e Fruticultura. *Inf. Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, 8: 2-5, 1988.

9. MURASHIGE, T. S. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-97, 1962.
10. NAGAO, E. O. & ARAÚJO, L. C. Micropropagação in vitro do abacaxi. In: II Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal, Gramado, 1997. Anais, REDBIO, 1997, p. 96.
11. PANNETIER, C. & LANAUD, C. Divers aspects de la utilization possible des cultures "in vitro" pour la multiplication vegetative de *Ananas comosus* L. Merr., varieté Cayenne lisse. *Fruits*, 31: 739-50, 1976.
12. PASQUAL, M. & ANDO, A. Influencia de reguladores de crescimento sobre o enraizamento "in vitro" de embriões de *Citrus sinensis*, cv. Valência. *Cienc. Prat.*, 15: 64-8, 1991.
13. PÉREZ, P. A. O. Propagación via organogénesis. In: Ponce, J.N.P. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba, Ediciones GEO, 1998. p.151-78.
14. VOGELMAN, T. C.; BORNMAN, C. H. & NISSEN, P. Uptake of benzyladenine in explantes of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Physiol. Plant.*, 61: 513-7, 1984.
15. VON ARNOLD, S. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. *Plant Sci. Lett.*, 13: 2-13, 1989.
16. ZEPEDA, C. & SAGAWA, Y. "In vitro" propagation of pineapple. *Hort.Sci.*, 16: 495, 1981.