

**Ramon Felipe Scherer**

**ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS PARA A  
CARACTERIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO, PROPAGAÇÃO E  
AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DE PLANTAS *IN VITRO* DE  
ABACAXIZEIRO**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Recursos Genéticos  
Vegetais da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Doutor em Ciências; área de  
concentração: Recursos Genéticos  
Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro  
Guerra

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Scherer, Ramon Felipe  
Abordagens biotecnológicas para a caracterização,  
conservação, propagação e avaliação genotípica de plantas in  
vitro de abacaxizeiro / Ramon Felipe Scherer ; orientador,  
Miguel Pedro Guerra - Florianópolis, SC, 2015.  
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Ananas comosus. 3.  
Diversidade genética. 4. Micropropagação. 5. Estabilidade  
genética. I. Guerra, Miguel Pedro. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

**Abordagens biotecnológicas para a  
caracterização, conservação, propagação e  
avaliação genotípica de plantas in vitro de  
abacaxizeiro**

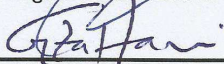
por

**Ramon Felipe Scherer**

Tese julgada e aprovada em 09/02/2015, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:

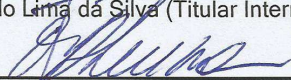
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Presidente - CCA-UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gilmar Roberto Zaffari (Titular Externo - EPAGRI/Itajaí)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco (Titular Externo - CBS/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Titular Interno - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Aparecido Lima da Silva (Titular Interno - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup>. Fernanda Vidigal Duarte Souza (Titular Externo-  
EMBRAPA/Crus das Almas-BA)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2015



Dedico aos meus pais,  
Flávio Antônio Scherer e Berta Rieg Scherer  
e ofereço a toda minha família,  
todos aqueles que foram, que são e que serão.



## Agradecimentos

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais por possibilitar a realização do doutorado.

Ao Professor Doutor Miguel Pedro Guerra pela orientação, formação, ensinamentos e oportunidades proporcionadas.

À secretária do PPG em Recursos Genéticos Vegetais Bernadete Ribas.

A todos integrantes e ex integrantes do LFDGV que estiveram presentes durante o tempo de realização de meu doutorado, principalmente: Angelo, Antônio, Catarina, Clarissa, Dani de Conti, Daniel, Denise, Deola, Diogo, Dorival, Douglas, Fernando, Gustavo, Jenny, Hugo, Joseph, Juan, Leila, Lido, Liliana, Luane, Luciano, Márcia, Montagna, Rafaela, Sabrina, Thiago, Tiago, Yohan.

À Capes (MEC) pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares, principalmente minha mãe e meu pai, Berta Rieg Scherer e Flávio Antônio Scherer, e minha noiva Marina, pelo incentivo e apoio.

A Deus e pelas forças do bem que me guiaram e guiam.





“Cuide dos meios. O fim cuidará de si mesmo”  
Mahatma Gandhi  
(1869 – 1948)



## RESUMO

O abacaxizeiro comercial (*Ananas comosus* var. *comosus*), pertencente à família Bromeliaceae, teve iniciada sua domesticação no norte da América do Sul entre 6.000 e 10.000 anos atrás. Em 1492, quando os europeus chegaram às Américas, o abacaxizeiro já estava disperso por toda a América tropical e parte da subtropical. Nos séculos seguintes ele foi espalhado pelo mundo e se consolidou como uma espécie frutífera de importância econômica mundial. A produção comercial desta cultura repousa sobre uma estreita base genética e tem como principais fontes de propágulos mudas reproduzidas vegetativamente, as quais podem disseminar pragas e doenças. Ferramentas biotecnológicas compreendem um expressivo arranjo de tecnologias que podem auxiliar a caracterização, o melhoramento e a multiplicação rápida e massiva de genótipos de abacaxizeiro. Neste sentido, um maior conhecimento sobre a diversidade genética existente na espécie pode possibilitar a expansão da oferta de genótipos para o plantio comercial, ao mesmo tempo em que possibilita uma maior eficiência no planejamento e na execução de programas de melhoramento genético e de conservação de germoplasma. Por sua vez, técnicas de micropropagação possibilitam a propagação rápida e em larga escala de mudas isentas de pragas e doenças a partir de genótipos-elite, configurando alta qualidade fitossanitária e genética. Entretanto, as mudas micropropagadas de abacaxizeiro normalmente apresentam um alto custo quando comparado ao custo das mudas produzidas via reprodução vegetativa convencional. Desta forma, a combinação de altas taxas regenerativas associadas ao emprego do meio de cultura líquido em um protocolo de organogênese convencional em imersão permanente e ao protocolo via culturas nodulares (CN) em sistemas de imersão temporária podem se configurar em avanços expressivos na micropropagação do abacaxizeiro, desde que eles mantenham a fidelidade genética das plantas regeneradas. Levando em conta estes aspectos, a presente tese objetivou: a) analisar o nível de ploidia do abacaxizeiro ‘Gigante de Tarauacá’, variedade tradicional do estado do Acre; b) aperfeiçoar o protocolo baseado em CN associadas a sistemas de imersão temporária na fase de crescimento de brotos; c) estudar os níveis de metilação do DNA global (NMDG) e os incrementos de massa fresca (IMF) durante as fases de multiplicação de CN e de diferenciação de CN para microbrotos, bem como avaliar por meio das análises de AFLP, nível de ploidia e de características

morfológicas a fidelidade genética das mudas oriundas deste sistema regenerativo; e, d) analisar por meio de características morfológicas a fidelidade genética de plantas jovens e adultas que foram micropropagadas ao longo de sucessivas repicagens via organogênese convencional em imersão permanente e via CN associadas a sistemas de imersão temporária. Os resultados obtidos mostram que: a) a cultivar ‘Gigante de Tarauacá’ é triploide ( $2n=3x=75$ ); b) o sistema de imersão temporária em frascos duplos associado ao meio de cultura livre de fitorreguladores na fase de crescimento de brotos alia alta eficiência regenerativa e sincronismo no desenvolvimento de brotos vigorosos; c) os NMDG apresentaram-se dinâmicos nas duas fases estudadas e estavam associados ao IMF e a idade das culturas, por sua vez, as análises baseadas em AFLP, nível de ploidia e em características morfológicas indicaram que as plantas regeneradas mantiveram-se homogêneas; e, d) plantas de *A. comosus* var. *comosus* regeneradas via organogênese convencional e via CN mostraram-se homogêneas entre si, enquanto plantas da var. *bracteatus* regeneradas via organogênese convencional apresentaram uma maior susceptibilidade à ocorrência de variações morfológicas. Tomados em conjunto, os resultados da presente tese ampliam o conhecimento associado ao uso, conservação e melhoramento do abacaxizeiro.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, nível de ploidia, eficiência regenerativa, biorreator de imersão temporária, metilação do DNA global, AFLP, características morfológicas, organogênese convencional, culturas nodulares.

## ABSTRACT

The domestication of commercial Pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*), belonging to the Bromeliaceae family, started between 6000 and 10000 years ago in the Guiana's Shield. In 1492, when Europeans arrived in America, Pineapple was spread in low lands of the tropical America and regions of the subtropical America. In the following centuries Pineapple was spread in the world and was consolidated as one of the world's most economically important fruit species. The commercial production of this species is based in a narrow genetic base and the conventional vegetative propagation based on suckers allows the dissemination of pest and diseases. Biotechnological tools include an expressive arrangement of technologies that can assist the characterization, the improvement, and the fast and massive micropropagation of selected pineapple genotypes. In this way, a better knowledge about the genetic diversity in this species may allow the expansion of the genotypes used in commercial plantation, at the same time allowing a higher efficiency in the planning and execution of genetic improvement and conservation programs. In turn micropropagation techniques allow the fast and massive production of pest- and disease-free stock plants from elite genotypes, resulting in plantlets with high genetic and phytosanitary quality. However, the micropropagated plantlets present higher costs when compared to the vegetative stocks production costs. In this way, the combination of high regenerative rates associated with permanent immersion in liquid medium for conventional organogenesis or use of temporary immersion with bioreactors for nodule cluster cultures (NC) micropropagation may result in significant advances for pineapple micropropagation. However genetic fidelity must be guaranteed for regenerated plants. Taking these aspects into account, the present thesis aimed at: a) to analyze the ploidy level of pineapple 'Gigante de Tarauacá', a traditional landrace from Acre state, North Brazil; b) to improve the protocol via NC associated with bioreactors of temporary immersion systems in the phase of shoots elongation; c) to study the global DNA methylation levels (GDML) and the fresh mass increase ratio (FMIR) during NC multiplication and differentiation to microshoots, as well as to evaluate the genetic fidelity through the analyzes of AFLP, ploidy level and morphological characteristics of regenerated plants; d) to analyze the genetic fidelity through morphological characteristics in young and adults plants that

were micropropagated over successive subcultures via conventional organogenesis in permanent immersion and via NC associated with temporary immersion systems. The results showed that: a) the cultivar 'Gigante de Tarauacá' is triploid ( $2n=3x=75$ ); b) the twin flask temporary immersion system associated with culture medium free of plant growth regulation in the phase of shoots elongation combine high regenerative efficiency and synchronism in the development of vigorous shoots; c) the GDML in both phases were dynamics and associated to the FMIR and to the cultures age, in turn, the analysis of AFLP, ploidy level and morphological features indicated homogeneity in the regenerated plants; and d) regenerated plants of *A. comosus* var. *comosus* via conventional organogenesis and via NC showed homogeneity between them, while regenerated plants of *A. comosus* var. *bracteatus* via conventional organogenesis showed a higher susceptibility to the occurrence of variant plants. Taking together, the results of this thesis expand the knowledge associated with the use, conservation and genetic improvement of pineapple.

**Keyword:** *Ananas comosus*, ploidy level, regenerative efficiency, temporary immersion bioreactor systems, global DNA methylation, AFLP, morphological characteristics, conventional organogenesis, nodule cluster cultures.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Figura 1 - Tipos de mudas de propagação vegetativa do abacaxizeiro .....	24
--	----

### CAPÍTULO II - GIGANTE DE TARAUCÁ: UM ABACAXIZEIRO TRIPLOIDE ORIGINÁRIO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Figura 1 - Frutas de abacaxizeiro.....	33
Figura 2 - ‘Gigante de Tarauacá’ um abacaxizeiro triplóide.....	34

### CAPÍTULO III - EFEITOS DO SISTEMA DE IMERSÃO E DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO CRESCIMENTO DE MICROBROTOS E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ABACAXIZEIRO

Figura 1 - Desenvolvimento <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de brotos de abacaxizeiro.....	43
Figura 2 - Efeitos do sistema de imersão na taxa de regeneração de brotos de abacaxizeiro (média $\pm$ desvio padrão) em diferentes classes de tamanho de brotos.....	46
Figura 3 - Efeitos do meio de cultura (MSB ou MSB + 10 $\mu$ M de AG <sub>3</sub> ) na taxa de regeneração de brotos de abacaxizeiro (média $\pm$ desvio padrão) em diferentes classes de tamanho de brotos.....	47
Figura 4 - Brotos de abacaxizeiro (3 a 4 cm) micropropagados em sistema de imersão temporária (SIT-FD) e de imersão permanente (SIP), com ou sem a suplementação de AG <sub>3</sub> ao meio de cultura (MSB).....	50

### CAPÍTULO IV - NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL EM CULTURAS NODULARES E FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS REGENERADAS DE ABACAXIZEIRO

Figura 1 - Micropropagação do abacaxizeiro por meio do protocolo baseado em culturas nodulares e sistema de imersão temporária (SIT).....	61
Figura 2 - Exemplo de histogramas com os mesmos padrões de picos, representando a homogeneidade da ploidia entre as plantas de <i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> regeneradas <i>in vitro</i> via culturas nodulares e a planta controle.....	69

**CAPÍTULO V - FIDELIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE  
ABACAXIZEIRO CULTIVADAS POR DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE REGENERAÇÃO**

Figura 1 - Protocolo de micropropagação de abacaxizeiro via organogênese convencional baseado em Guerra *et al.* (1999).....82

Figura 2 - Protocolo de micropropagação de abacaxizeiro via culturas nodulares (CN) associadas a sistemas de imersão temporária.....84

Figura 3 - Plantio de mudas e desenvolvimento de plantas na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC.....85



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III - EFEITOS DO SISTEMA DE IMERSÃO E DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO CRESCIMENTO DE MICROBROTOS E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ABACAXIZEIRO

Tabela 1 - Efeitos do meio de cultura (MSB ou MSB + 10 $\mu$ M de AG <sub>3</sub> ) na taxa de regeneração (média $\pm$ desvio padrão) de brotos de abacaxizeiro em diferentes sistemas de imersão (temporária (SIT-FD) ou permanente (SIP)).....	48
Tabela 2 - Efeitos da classe de altura de brotos de abacaxizeiro (cm) na massa fresca por broto.....	49

### CAPÍTULO IV - NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL EM CULTURAS NODULARES E FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS REGENERADAS DE ABACAXIZEIRO

Tabela 1 - Níveis de metilação do DNA global (NMDG, %) e incrementos de massa fresca (IMF) em culturas <i>in vitro</i> de <i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> nas fases de multiplicação de culturas nodulares (CN) e de diferenciação de CN para microbrotos em diferentes sistemas de imersão.....	65
Tabela 2 - Número de fragmentos totais e porcentagem de fragmentos monomórficos em 20 plantas regeneradas <i>in vitro</i> de <i>A. comosus</i> var. <i>comosus</i> nas seis combinações de enzima/iniciador estudadas .....	66
Tabela 3 - Tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) (pb) de plantas regeneradas de abacaxizeiro nas seis combinações de enzima/iniciador estudadas.....	68

### CAPÍTULO V - FIDELIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE ABACAXIZEIRO CULTIVADAS POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERAÇÃO

Tabela 1 - Desenvolvimento de plantas de <i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> (Cultivar Pérola, genótipos MAR e JSG) e de <i>A. comosus</i> var. <i>bracteatus</i> (genótipo BIT) regeneradas via organogênese convencional em plantio definitivo na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC. ....	86
--	----

Tabela 2 - Desenvolvimento de plantas de <i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i> (cultivar diplóide ‘Pérola’, genótipo JSG; e cultivar triplóide ‘Gigante de Tarauacá’, genótipo Tarau) regeneradas via culturas nodulares em plantio definitivo na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC .....	88
Tabela 3 - Calendário de operações para o cultivo do abacaxi no litoral de Santa Catarina. Tabela adaptada de Koller (1981).....	90

## SUMÁRIO

<b>Capítulo I - INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1. Breve histórico e situação do problema.....	21
1.2. Objetivo Geral.....	25
1.2.1. Objetivos específicos .....	25
Referências.....	26
<b>Capítulo II - GIGANTE DE TARAUCÁ: UM ABACAXIZEIRO TRIPLÓIDE ORIGINÁRIO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA</b> .....	29
2.1. Introdução .....	31
2.2. Material e Métodos .....	32
2.3. Resultados.....	32
2.4. Discussão .....	33
Agradecimentos .....	35
Referências.....	35
<b>Capítulo III - EFEITOS DO SISTEMA DE IMERSÃO E DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO CRESCIMENTO DE MICROBROTOS E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ABACAXIZEIRO</b> .....	38
3.1. Introdução .....	40
3.2. Material e Métodos .....	42
3.2.1. Fase in vitro .....	42
3.2.2. Fase de aclimatização .....	44
3.2.3. Teste em biorreatores de imersão temporária para produção em larga escala.....	44
3.3. Resultados e Discussão .....	45
3.3.1. Fase in vitro .....	45
3.3.2. Fase de Aclimatização .....	49
3.3.3. Teste em biorreatores de imersão temporária para produção em larga escala.....	50
3.4. Conclusões .....	51
Agradecimentos .....	51
Referências.....	51
<b>Capítulo IV - NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL EM CULTURAS NODULARES E FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS REGENERADAS DE ABACAXIZEIRO</b> .....	55
4.1. Introdução .....	57
4.2. Material e Métodos .....	59

4.2.1. Micropropagação via CN associadas a sistemas de imersão temporária .....	59
4.2.2. Protocolos de avaliação .....	61
4.3. Resultados e discussão .....	64
4.3.1. Níveis de metilação do DNA global .....	64
4.3.2. AFLP, níveis de ploidia e análises fenotípicas .....	66
4.4. Conclusões .....	70
Agradecimentos .....	71
Referências .....	71
<b>Capítulo V - FIDELIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE ABACAXIZEIRO CULTIVADAS POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERAÇÃO .....</b>	<b>76</b>
5.1. Introdução .....	79
5.2. Material e Métodos .....	80
5.2.1. Micropropagação via organogênese convencional .....	81
5.2.2. Micropropagação via CN associadas a sistemas de imersão temporária .....	81
5.2.3. Plantio na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC .....	83
5.2.4. Avaliação da fidelidade genética através de observações de características morfológicas .....	83
5.2.5. Plantio em unidades de observação. ....	84
5.3. Resultados e discussão .....	86
5.4. Conclusões .....	91
Agradecimentos .....	92
Referências .....	92
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>95</b>

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

#### 1.1. Breve histórico e situação do problema

O abacaxizeiro comercial (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma bromélia domesticada a partir do ancestral silvestre *A. comosus* var. *ananassoides* no Escudo das Guianas entre 6.000 e 10.000 anos antes do presente (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 2009). Após a sua domesticação ele foi disperso por grande parte das terras baixas da América tropical e de parte da subtropical. Esta abrangente dispersão foi facilitada pela propagação vegetativa de mudas resistentes à desidratação, bem como a possibilidade de produção de bebida fermentada com a fruta (Patiño, 2002). Em 4 de novembro de 1493 a esquadra comandada por Cristóvão Colombo, em sua segunda viagem às Américas, teve o primeiro contato documentado com o abacaxizeiro em Guadalupe (Colón, 1947 citado por Patiño, 2002). Naquele momento o abacaxizeiro já estava amplamente disperso pelo novo continente e apresentava grande diversidade genética com numerosos cultivares (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 2009).

O abacaxizeiro despertou grande interesse nos europeus tão logo foi o contato com a sua fruta o que levou a uma dispersão da espécie para colônias ibéricas tropicais na África e na Ásia ainda nos séculos XVI e XVII (Collins, 1949; Patiño, 2002). Provavelmente, nesta primeira dispersão intercontinental estavam os cultivares do grupo Spanish (Rohrbach *et al.*, 2003). Até então, dificilmente chegavam frutas de abacaxi em boas condições na Europa e, desta maneira, horticulturistas europeus iniciaram, ainda no século XVII, o seu cultivo em casas de vegetação (London, 1894). Esta forma de cultivo foi viável até que, já no século XIX, plantas inteiras de abacaxizeiros vindas das Américas contendo as frutas começaram a aparecer nos mercados europeus, o que fez despencar os preços das frutas produzidas na Europa (London, 1894). Estes cultivos em solo europeu resultaram nos primeiros registros dos cultivares Smooth Cayenne e Queen, e foi a partir da Europa que estes dois cultivares foram dispersos para regiões tropicais e subtropicais ao redor do planeta (London, 1894; Collins, 1951; Rohrbach *et al.*, 2003).

A partir da segunda metade do século XIX, o envio de plantas inteiras das Américas foi substituído pelo abastecimento de abacaxis

produzidos próximos dos dois grandes mercados consumidores da época, sendo Açores o principal fornecedor da Europa, e Florida, Bahamas, Cuba e Porto Rico os principais fornecedores dos Estados Unidos da América (EUA) (Rohrbach *et al.*, 2003). No início do século XX, melhorias na produção, no beneficiamento e no transporte da fruta, além de fatores político-econômicos, levaram a mudanças nos principais fornecedores para estes centros consumidores, com destaques para a ascensão do Hawaii (já como um estado dos EUA) como principal fornecedor de abacaxi aos EUA, ainda antes da Segunda Guerra Mundial (Rohrbach *et al.*, 2003; Okihiro, 2009), e de Cote d'Ivoire à Europa a partir da década de 60 (CBI Market Survey, 2008). Hoje em dia, o mercado internacional de abacaxi é dominado por quatro companhias multinacionais que operam, principalmente, na América Central-Sul e no Sudeste Asiático (TAPP, 2013). Assim, nos anos de 2009, 2010 e 2011 os principais exportadores mundiais de abacaxi foram Costa Rica, Bélgica, Filipinas, Países Baixos, Equador e EUA, enquanto os principais importadores continuam sendo EUA e Europa (União Européia) (FAO, 2014).

A partir da década de 60 a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura – Sigla em inglês) vem acompanhando a produção mundial de abacaxi no mundo, sendo que, desde que este acompanhamento iniciou o Brasil sempre esteve entre os maiores produtores mundiais. Nos anos de 2010, 2011 e 2012, a produção mundial foi de 20.377.659,77, 21.934.533,37 e 23.333.886 toneladas, respectivamente. Nestes mesmos anos o Brasil produziu, respectivamente, 2.205.586, 2.365.458 e 2.478.178 toneladas, ficando em torno de 10,7% da produção mundial (FAO, 2014). Apesar disso, a produtividade alcançada aqui no Brasil, que entre os anos de 2010 a 2012 apresentou uma média de 39.491,23 Kg/ha, ainda encontra-se bem abaixo daquelas apresentadas por países como Indonésia, Côte d'Ivoire e Benin, que tiveram médias para estes mesmos anos de 121.759, 64.043 e 63.384 Kg/ha, respectivamente (FAO, 2014). Isto porque, mesmo que a produtividade da abacaxicultura brasileira tenha aumentado cerca de sete toneladas por hectare entre 2000 e 2012 (FAO, 2014), ela ainda apresenta problemas no sistema produtivo que a impede de alcançar maiores produtividades (Reis *et al.* 2012).

Cerca de dois terços da produção mundial de abacaxi é consumida como fruta fresca, cerca de 30% como compota e menos de 5% como suco (Reinhardt e Rodrigues, 2009). Aproximadamente 70%

da produção mundial de abacaxi é consumida pelo próprio país produtor (Rohrbach *et al.*, 2003). Neste sentido, o Brasil consome quase que a totalidade da produção interna, que é comercializada basicamente como fruta fresca (Reinhardt e Rodriguez, 2009; FAO, 2014), sendo que o estado de Santa Catarina apresenta um consumo *per capita* de abacaxi superior à média nacional, que é fornecido quase que exclusivamente por outros estados brasileiros (CEASA, 2006).

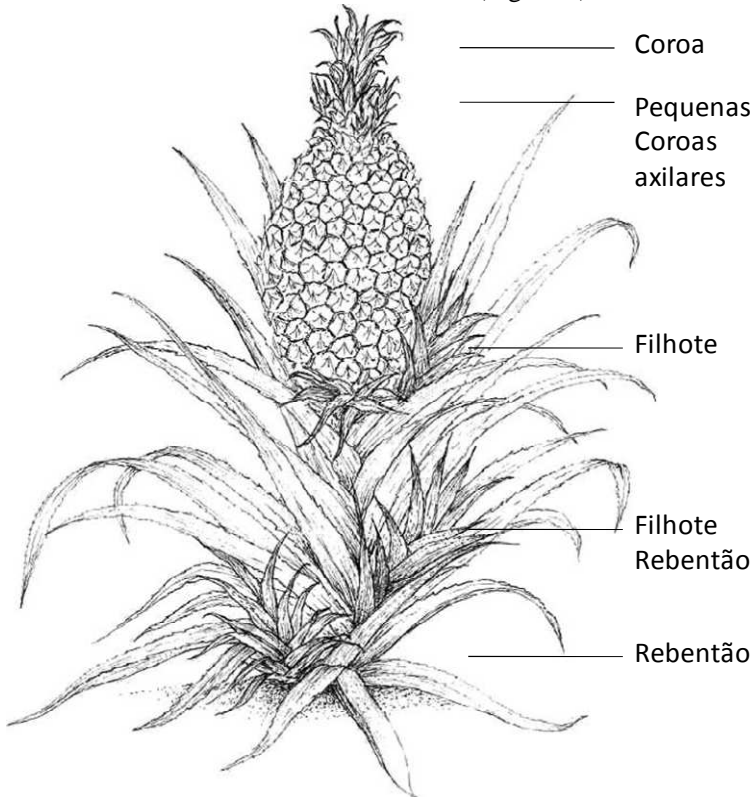
O estado de Santa Catarina, mais precisamente a Ilha de Santa Catarina, tem registros de plantios de abacaxizeiro documentados desde 1543, quando o grupo comandado por Alvarez Nuñez Cabeza de Vaca relatou que naquela época havia nesta ilha muitos abacaxis cheirosos de terra firme “... y hay muchas piñas olorosas de las de Tierra Firme” (Oviedo y Valdéz, 1852). Plantios comerciais de abacaxizeiro foram comuns na costa catarinense até a década de 1970, quando a partir de lá houve um declínio na área plantada impulsionado por problemas fitossanitários (principalmente gomose e broca dos frutos) e pela importação de abacaxis de outros estados brasileiros (Koller, 1981; Guerra *et al.*, 1999).

No final da primeira década deste século o comércio global do abacaxi estava alcançando relevantes 2 bilhões de dólares anuais e mantendo ainda muito espaço para crescimento (Reinhardt e Rodriguez, 2009). Isto faz do abacaxizeiro uma das plantas frutíferas de maior importância econômica mundial. Diante desta alta demanda atual e de uma previsão positiva em relação ao aumento da demanda, tanto no mercado interno quanto no externo, a expectativa é que o cultivo do abacaxi seja uma atividade promissora para a pequena e média agricultura brasileira. Neste sentido, o conhecimento da história ambiental e econômica da espécie e o acesso a mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, são fatores importantes para levar a planejamentos de curto e médio prazo para a abacaxicultura no estado e no País.

A abacaxicultura mundial está baseada em uma estreita base genética, sendo que cultivares do grupo Cayenne e um híbrido (MD2) entre este e outros genótipos representam mais de 70% da produção mundial. Com exceção do Brasil, que cultiva em mais de 80% variedades do grupo Pérola, os outros principais países produtores quando não cultivam variedades do grupo Cayenne, cultivam, em geral, variedades dos grupos Queen, Singapore Spanish ou Española Roja (Coppens D’Eeckenbrugge *et al.*, 1997; Rohrbach *et al.*, 2003; Matos e

Reinhardt, 2009; Reinhardt e Rodrigues, 2009; TAPP, 2013). Neste sentido, ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genética existente no abacaxizeiro comercial permite expandir a oferta de genótipos para o plantio comercial, assim como permite uma maior eficiência no planejamento e na execução de programas de melhoramento genético e de conservação de germoplasma.

De acordo com Coppens d'Eeckenbrugge e Leal (2003) os tipos de mudas de propagação vegetativa são classificados como sendo: coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão (Figura 1).



**Figura 1** – Tipos de mudas de propagação vegetativa do abacaxizeiro (Figura adaptada de Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003).

A taxa regenerativa natural do abacaxizeiro é baixa quando se leva em consideração as recomendações de densidade de plantios comerciais para a espécie, variando de cerca de 30.000 a 86.000



plantas/ha (Hepton, 2003). Além disso, mudas propagadas vegetativamente permitem a proliferação de pragas e doenças (Teixeira *et al.*, 2001). Neste sentido, ferramentas biotecnológicas baseadas na micropropagação se configuram como alternativas para a produção clonal em larga escala de mudas com alta qualidade fitossanitária e genética (Dal Vesco *et al.*, 2001). Entretanto, mudas micropropagadas de abacaxizeiro ainda apresentam preços superiores aos das mudas convencionais (Teixeira *et al.*, 2001; Be e Debergh, 2006). Para superar este gargalo, Guerra *et al.* (1999) estabeleceram um protocolo de micropropagação via organogênese convencional em sistema de imersão permanente e meio de cultura líquido com alta eficiência regenerativa quando comparado a outros protocolos similares, e Scherer *et al.* (2013) desenvolveram um novo protocolo de micropropagação para esta espécie, o qual é baseado em culturas nodulares (CN) associadas à sistemas de imersão temporária e que apresenta elevada taxa regenerativa quando comparado a outros protocolos de micropropagação do abacaxizeiro. Meio de cultura líquido permite a redução do custo do meio de cultura por dispensar o uso de agentes gelificantes; sistemas de imersão temporária proporcionam uma nutrição mais uniforme para as culturas vegetais, frequentes trocas de ar e menores chances de contato das culturas com compostos nocivos para o desenvolvimento vegetal; altas taxas regenerativas permitem diluir o custo de produção em um grande número de mudas produzidas; CN são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde-clara com textura friável (Dal Vesco e Guerra, 2010; Scherer *et al.* 2013). Entretanto, além da eficiência regenerativa, um protocolo de micropropagação deve produzir mudas que mantêm a fidelidade genética (Instrução Normativa MAPA nº22/2012).

## **1.2. Objetivo Geral**

Ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genética existente no abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill), bem como avaliar a eficiência de diferentes protocolos de micropropagação massal da espécie.

### *1.2.1. Objetivos específicos*

- analisar o nível de ploidia do abacaxizeiro comercial ‘Gigante de Tarauacá’;

- aumentar a eficiência regenerativa do protocolo baseado em CN associadas a sistemas de imersão temporária na fase de crescimento dos brotos;
- avaliar os níveis de metilação do DNA global e os incrementos de massa fresca das culturas vegetais durante as fases de multiplicação de CN e de diferenciação de CN para microbrotos, bem como avaliar a fidelidade genética das mudas produzidas por esta via através de AFLP, nível de ploidia e características morfológicas;
- avaliar a fidelidade genética através de características morfológicas de plantas regeneradas ao longo de sucessivas repicagens pelos protocolos via organogênese convencional em imersão permanente e via CN associadas a sistemas de imersão temporária.

### Referências

- Be LV, Debergh PC (2006) Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*). S Afr J Bot 72:191-194.
- CBI Market Survey (2008). The EU market for pineapple. CBI Market Information Database. Disponível em: <http://www.cbi.eu/>
- Ceasa (2006) Centrais de abastecimento do estado de Santa Catarina. Abacaxi. São José: CEASA.
- Collins JL (1949) History, Taxonomy and Culture of the Pineapple. Econ Bot 3: 335-359.
- Collins, JL (1951) Notes on the origin, history, and genetic nature of the Cayenne pineapple. Pac Sci 5(1), 3–17.
- Colón H (1947) Vida del almirante don Cristóbal Colón, escrita por su hijo don Hernando. México: Gráfica Panamericana. pp. 343.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval M-F (2009) The domestication of pineapple: context and hypotheses. Pineapple News Volume 16: 15-27.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F (2003) Morphology, Anatomy and Taxonomy. In Bartholomew DP, Paull R, Rohrback KG (Eds) The Pineapple: Botany, production and uses. Wallingford, UK: CABI Publ. p. 13-32.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F, Duval MF (1997) Germplasm resources of pineapple. In Jain J (Ed) Horticultural Reviews Volume 21. New York, USA: John Wiley & Sons Inc. p. 133-175.
- Dal Vesco LL, Guerra MP (2010) *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. Sci Hortic - Amsterdam 125:748-755.

- Dal Vesco LL, Pinto AA, Zaffari GR, Nodari RO, Reis MS, Guerra MP (2001) Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. *Fruits* 56: 143–154.
- Faostat, FAO statistical databases, pineapple data (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Pescador R, Schuelter AR, Nodari RO (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesqui Agropecu Bras* 34:1557-1563.
- Hepton A (2003) Cultural system. In Bartholomew DP, Paull R, Rohrback KG (Eds) *The Pineapple: Botany, production and uses*. Wallingford, UK: CABI Publ. p. 109-142.
- Koller OL (1981) O cultivo do abacaxi em Santa Catarina. Florianópolis: EMPASC. pp. 20.
- Loudon JC (1822) *The Different Modes of Cultivating the Pineapple, from its First Introduction to Europe to the Late Improvements of T. A. Knight Esq.* London, UK: Longman, Houlgman, Hurst, Rees, Orme and Brown. pp. 170
- MAPA (BRASIL. Ministério da Agricultura). Instrução Normativa nº 22 de 27 de Agosto de 2012. Normas para a Produção e a Comercialização de Mudas e de Outras Estruturas de Propagação Obtidas por meio de Cultura de Tecidos de Plantas. *Diário Oficial da União* nº 167, de 28 de Agosto de 2012, Seção 1, p. 2.
- Matos AP, Reinhardt DHRC (2009) Pineapple in Brazil: Characteristics, research and perspectives. *Acta Horti* 822: 25-36.
- Okihiro G (2009) *Pineapple Culture: A History of Tropical and Temperate Zones*. Berkeley, USA: University of California Press. pp. 272.
- Oviedo y Valdés GF (1852) *Historia General y Natural de las Indias, Islas y Tierra Firme del Mar Océano*. Editado por José Amador de los Ríos. Madrid, España: Real Academia de la Historia. pp. 511.
- Patiño VM (2002) Aráceas y Bromeliáceas. In Patiño VM (Ed) *Historia Y Dispersión De Los Frutales Nativos Del Neotrópico*. Cali, Colombia: Ciat. p. 293-305.

- Reinhardt A, Rodriguez LV (2009) Industrial Processing of Pineapple – Trends and Perspectives. *Acta Hort* 822:323-328.
- Reis LL, Tarsitano MAA, Hiraki SS, Bardivieso DM (2012) Custo de produção e rentabilidade de abacaxizeiro cv. Pérola em Cassilândia (MS) sob diferentes doses de potássio. *Bioscience Journal* 28: 725-733.
- Rohrbach KG, Leal F, Coppens d'Eeckenbrugge (2003) History, Distribution and World Production. In Bartholomew DP, Paull R, Rohrbach KG (Eds) *The Pineapple: Botany, production and uses*. Wallingford, UK: CABI Publ. p. 01-12.
- Scherer RF, Garcia AC, Fraga HPF, Dal Vesco LL, Steinmacher DA, Guerra MP (2013) Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Sci Hort* - Amsterdam 151:38-45.
- Tapp (Tanzania Agriculture Productivity Program) (2013) Market trends for pineapple. Market survey. USDA, Tanzania, Africa. pp. 01-09.
- Teixeira J, Cruz ARR, Ferreira FR, Cabral JR (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 3:42-47.

## **CAPÍTULO II**

### **GIGANTE DE TARAUCÁ: UM ABACAXIZEIRO TRIPLÓIDE ORIGINÁRIO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Uma versão deste estudo encontra-se publicada sob a seguinte referência:

Scherer RF, Olkosky D, Souza FVD, Nodari RO, Guerra MP (2015)  
Gigante de Tarauacá: A triploid pineapple from Brazilian  
Amazonia. *Sci Hortic - Amsterdam* 181: 1-3

## GIGANTE DE TARAUACÁ: UM ABACAXIZEIRO TRIPLÓIDE ORIGINÁRIO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

**Resumo:** Cultivares de abacaxizeiro são normalmente diplóides, porém, alguns cultivares triplóides vem sendo encontrados. ‘Gigante de Tarauacá’ é um abacaxizeiro encontrado na Amazônia brasileira que produz frutas de grande porte (muitas vezes mais pesadas que 15 Kg), principalmente na região de Tarauacá, estado do Acre. Hipotetizando que estas características estão relacionadas com o nível de ploidia, nós investigamos o seu genoma por meio de contagem de cromossomos e por citômetro de fluxo, usando um genótipo do cultivar diplóide Pérola como controle. A técnica de contagem de cromossomos foi realizada por meio da reação de Feulgen, e o nível de ploidia entre os dois cultivares foi comparado por meio de histogramas oriundos de citômetro de fluxo depois que os núcleos foram isolados e tratados com Iodeto de Propídeo e RNase. O número de cromossomos somáticos e os níveis de ploídias identificados nos histogramas pelo citômetro de fluxo revelaram a natureza triplóide do ‘Gigante de Tarauacá’ ( $2n=3x=75$ ) e o padrão diplóide do ‘Pérola’ usado como controle ( $2n=2x=50$ ). Para o melhor de nosso conhecimento esta é a primeira divulgação que menciona a natureza triplóide do ‘Gigante de Tarauacá’.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, reação de Feulgen, contagem de cromossomos, nível de ploidia, citômetro de fluxo.

**Abstract:** Pineapple cultivars are normally diploids, however some triploids have been found. The ‘Gigante de Tarauacá’ is a native pineapple that produces large fruits (as much as 15 kg) in the region of Tarauacá, Acre State, northern Brazil. Hypothesizing that this feature is related with polyploidy, we investigated its genome by means of chromosomal counting and flow cytometry, using the traditional diploid cultivar Pérola as a control. The chromosomal counting was performed by means of the Feulgen reaction, and the ploidy levels were compared in histograms by flow cytometry after the nuclei were isolated and treated with Propidium Iodide and RNase. The somatic chromosome numbers and ploidy levels identified in the histograms by flow cytometry revealed the triploid nature of the ‘Gigante de Tarauacá’ ( $2n=3x=75$ ) and the diploid status of ‘Pérola’ used as a control ( $2n=2x=50$ ). To the best of our knowledge this is the first report of the triploid nature of the ‘Gigante de Tarauacá’.

**Keywords:** *Ananas comosus*, Feulgen reaction, chromosomal counting, ploidy level, flow cytometry.

## 2.1. Introdução

O abacaxizeiro comercial (*Ananas comosus* var. *comosus*) foi provavelmente domesticado no Escudo das Guianas, e teve como ancestral silvestre *A. comosus* var. *ananassoides* (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 2009). O primeiro contato europeu com o abacaxizeiro foi em 1493, em Guadalupe, e naquele momento esta planta já estava domesticada e dispersa por todas as terras baixas da América tropical e parte da subtropical (Patiño, 2002). Reprodução assexual, adaptação a diferentes ambientes e evidências do início da agricultura na região amazônica no final do Pleistoceno são fatores que permitem sugerir que *A. comosus* var. *comosus* teve sua domesticação iniciada entre 6.000 e 10.000 anos antes do presente (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 2009). Este processo conduziu a uma ampla variabilidade genética em numerosos morfologicamente diversos cultivares (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997).

O abacaxizeiro e seu ancestral silvestre são diplóides, tendo 50 cromossomos (Collins e Kerns, 1931), e seu genoma haplóide alcança 526 Mpb (Arumuganathan e Early, 1991). Entretanto, plantas de abacaxizeiros triplóides têm sido observadas (Heilborn, 1922; Collins, 1933; Canpinin e Rotor, 1937; Dujardin, 1991; Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 2013).

O 'Gigante de Tarauacá' (também chamando de 'Arroba Tarauacá') é nativo da região de Tarauacá, estado do Acre, Região Norte do Brasil. Este cultivar produz frutas com dimensões médias de 24,2 cm de comprimento por 18,2 cm de diâmetro e peso médio de cerca de 4,4 Kg (Ritzinger, 1992), maior e mais pesado do que os cultivares produzidos tradicionalmente e comercializados no mercado mundial da fruta (Coppens d'Eeckenbrugge *et al.*, 1997). Além disso, há relatos de que este cultivar pode produzir frutas pesando mais do que 15 Kg nos solos ricos da região de Tarauacá (Pereira, 2006).

Hipotetizando que as características do 'Gigante de Tarauacá' são compatíveis com um nível de ploidia diferente dos cultivares de abacaxizeiros tradicionais, nós investigamos o seu genoma por meio de contagem de cromossomos e por citômetro de fluxo, usando um cultivar diplóide tradicional, 'Pérola', como controle.

## 2.2. Material e Métodos

O material vegetal utilizado foi proveniente das cultivares Gigante de Tarauacá e Pérola (Figura 1). Um genótipo do ‘Gigante de Tarauacá’ foi coletado em uma pequena produção no município de Porto Velho, no estado de Rondônia, Região Norte do Brasil; e outro exemplar deste cultivar (BGA 137) foi coletado no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no município de Cruz das Almas, estado da Bahia, Região Nordeste do Brasil (Figura 2A), para a realização de um re-teste. O genótipo do ‘Pérola’ foi coletado na Fazenda Experimental da Ressacada – UFSC. Pontas de raízes de ambos cultivares foram coletadas e expostas ao processo de coloração dos cromossomos (Dujardin, 1991), com as seguintes modificações: no pré-tratamento, as amostras foram mantidas por 12h em 4 °C em uma solução saturada de Paradiclorobenzeno; o reagente de Schiff, preparado de acordo com Kodousek (1969), foi usado para corar os cromossomos (reação de Feulgen); o uso da pectinase e da celulase foi eliminado; e as lâminas foram coradas com carmin acético (2%). As observações foram realizadas com microscópio de luz Olympus® BX-40 (Olympus, Tokyo, Japan) e fotografadas usando o sistema de captura de imagem DP\_71 (Olympus).

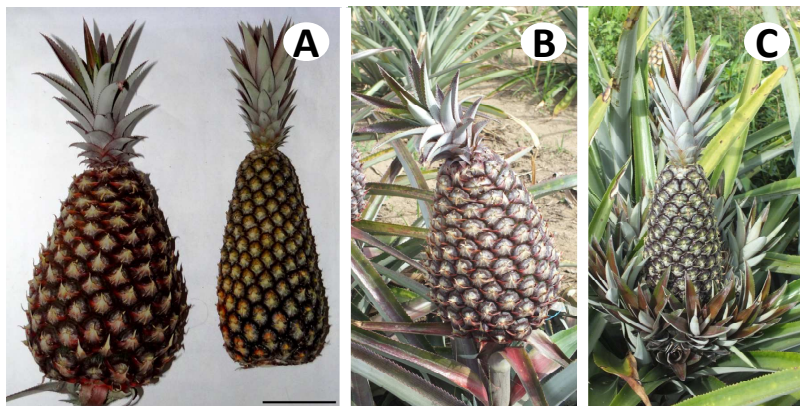
Cerca de 200 mg (massa fresca) de folhas foram picadas com um bisturi em uma placa de Petri contendo 0,4 mL de solução tampão OTTO I (0,1 M ácido cítrico; 0,5% Tween® 20; a 4 °C) para o isolamento dos núcleos. As soluções foram filtradas em uma malha de nylon com poros de 40 µm e incubadas por 60-180 min no escuro e sob temperatura ambiente. Em seguida, cada amostra foi filtrada em uma malha de nylon com poros de 30 µm e a elas adicionadas 0,5 mL de solução tampão OTTO II (0,4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; temperatura ambiente) contendo Iodeto de Propídio e RNase, ambos à 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram analisados ao menos 5.000 núcleos por amostra em um citômetro de fluxo BD FACS-CANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA), com 4 repetições. Comparações dos níveis de ploidia entre os dois genótipos foram feitas de acordo com os picos visualizados nos histogramas.

## 2.3. Resultados

As contagens de cromossomos e os níveis de ploidia identificados nos histogramas pelo citômetro de fluxo revelaram a natureza triploide do ‘Gigante de Tarauacá’ ( $2n=3x=75$ ) (em ambos os genótipos, tanto no proveniente de Rondônia, quanto no proveniente da Bahia) e o padrão



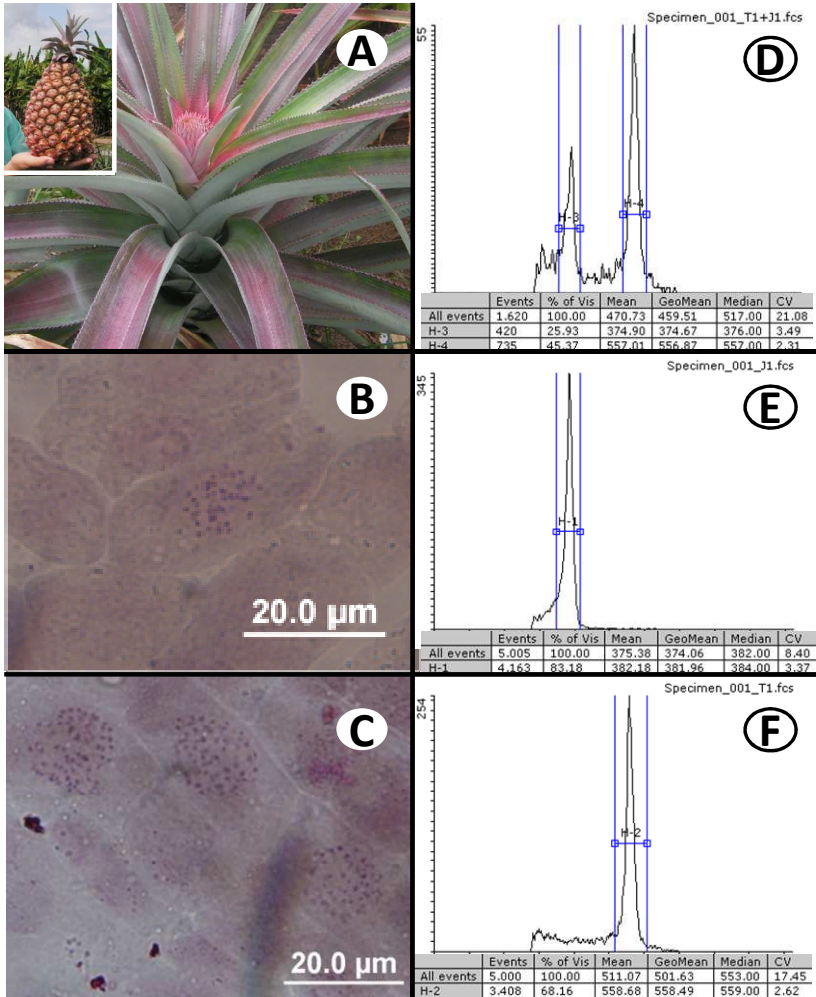
diplóide do ‘Pérola’ ( $2n=2x=50$ ) usado como controle (Figuras 2B-F). De acordo com nosso conhecimento, esta é a primeira divulgação a respeito da natureza triplóide do ‘Gigante de Tarauacá’.



**Figura 1.** Frutas de abacaxizeiro. A) Cultivares Gigante de Tarauacá e Pérola, respectivamente, barra = 10 cm; B) fruta do ‘Gigante de Tarauacá’ na planta; C) fruta do ‘Pérola’ na planta.

## 2.4. Discussão

Abacaxizeiros triplóides apresentam normalmente frutas maiores e mais pesadas do que os diplóides, assim como está reportado para os cultivares Cabezona (Collins, 1933), Monte Oscuro e Caiçara (Morton, 1987; Chan *et al.*, 2003). Um genótipo triplóide de *A. comosus* var. *anassoides*, chamado de Ananas dos Índios, também produz grandes frutos quando comparado aos outros genótipos desta variedade botânica (Lin *et al.*, 1987; Dujardin, 1991; Coppens D’eeckenbugge *et al.*, 2013). De acordo com Ritzinger (1992), o ‘Gigante de Tarauacá’ também apresenta estas características, que agora podem ser correlacionadas com a triploidia. Adicionalmente, nós sugerimos que o sistema de produção tradicional dos agricultores da região de Tarauacá (principalmente relacionado com o tempo do ciclo de cultivo de cerca de 2 anos) e as ótimas características ambientais para o desenvolvimento da espécie interajam com o genótipo triplóide para produzir naquela região as frutas enormes reportadas.



**Figura 2.** ‘Gigante de Tarauacá’ um abacaxizeiro triplóide. A) Planta e fruto do ‘Gigante de Tarauacá’; B) cromossomos do abacaxizeiro diplóide ‘Pérola’ ( $2n=2x=50$ ); C) cromossomos do abacaxizeiro triplóide ‘Gigante de Tarauacá’ ( $2n=3x=75$ ); D) nível de plodia analisado por citômetro de fluxo em amostras misturadas dos abacaxizeiros ‘Pérola’ diplóide e ‘Gigante de Tarauacá’ triplóide; E) nível de plodia analisado por citômetro de fluxo em amostras de ‘Pérola’ diploide; e F) nível de plodia analisado por citômetro de fluxo em amostras de ‘Gigante de Tarauacá’ triploide.

Abacaxizeiros triplóides, tais como ‘Gigante de Tarauacá’ (Matos e Reinhardt, 2009) e ‘Cabezona’ (Coppens d’Eeckenbrugge *et al.*, 1997), tem sido cultivados em plantações comerciais, porém, em proporções muito menores do que cultivares diplóides tradicionais descritos por Coppens d’Eeckenbrugge *et al.* (1997). Nós sugerimos que a natureza triplóide do ‘Gigante de Tarauacá’ é uma consequência da união de um gameta haplóide ( $n$ ) com um gameta não reduzido ( $2n$ ), como reportado por Collins (1933) e Heilborn (1922) em outros genótipos de abacaxizeiros triplóides. A taxa de gametas não reduzidos ( $2n$ ) em abacaxizeiros diplóides está entre 0 e 6,5% (Coppens d’Eeckenbrugge *et al.*, 2013).

Além da rara combinação genética, nós sugerimos que outros gargalos para a formação de abacaxizeiros triplóides são a forma de cultivo convencional através de lavouras clonais e a seleção humana. O abacaxizeiro apresenta auto-incompatibilidade gametofítica (Brewbaker e Gorrez, 1967) e sua reprodução é basicamente via mudas de produção vegetativa (Coppens d’Eeckenbrugge e Leal, 2003), então plantas originadas via semente são raras em sistemas convencionais de cultivo de abacaxizeiro. Embora seja de conhecimento que alguns sistemas tradicionais de cultivo de plantas propagadas vegetativamente permitem a incorporação de plantas via semente, como o sistema de produção de mandioca feito por ameríndios amazônicos (Mckey *et al.*, 2011). Desta forma é possível que o mesmo tenha ocorrido com o abacaxizeiro na região de Tarauacá.

### **Agradecimentos**

Aos Drs. Charles R. Clement e Geo Coppens d’Eeckenbrugge pelas sugestões essenciais para melhorar as primeiras versões deste manuscrito. Agradecemos também ao LAMEB-UFSC pelos serviços de citometria de fluxo. Os autores também agradecem CAPES, CNPq e FAPESC pelas bolsas de estudo, bolsas de pesquisa e suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

### **Referências**

- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.
- Brewbaker JL, Gorrez DD (1967) Genetics of self incompatibility in the Monocot genera, *Ananas* (pineapple) and *Gasteria*. *Am J Bot* 54: 611-616.

- Canpinpin JM, Rotor GB (1937) A cytological and morphogenetic study of some pineapple varieties and their mutant and hybrid derivatives. *The Philippines Agriculturist* 26: 139-158.
- Chan YK, Coppens d'Eeckenbrugge G, Sanewski GM (2003) Breeding and variety improvement. In Bartholomew DP, Paull R, Rohrback KG (Eds) *The Pineapple: Botany, production and uses*. Wallingford, UK: CABI Publ. p. 33-55.
- Collins JL (1933) Morphological and cytological characteristics of triploid pineapples. *Cytologia* 4: 248-256.
- Collins JL, Kerns KR (1931) Genetic studies of the pineapple I. A preliminary report upon the chromosome number and meiosis in seven pineapple varieties (*Ananas sativus* Lindl.) and in *Bromelia pinguin* L. *J Hered* 22: 139-142.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F, Duval MF (1997) Germplasm resources of pineapple. In Jain J (Ed) *Horticultural Reviews Volume 21*. New York, USA: John Wiley & Sons Inc. p. 133-175.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Sanewski GM, Smith MK, Duval MF, Leal F (2013) *Ananas*. In Kole C (Ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Tropical and Subtropical Fruits*. Heidelberg, Germany: Springer. p. 21-41.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval M-F (2009) The domestication of pineapple: context and hypotheses. *Pineapple News Volume 16*: 15-27.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Leal F (2003) Morphology, anatomy and taxonomy. In Bartholomew DP, Paull R, Rohrback KG (Eds) *The Pineapple: Botany, production and uses*. Wallingford, UK: CABI Publ. p. 13-32.
- Dujardin M (1991) Cytogénétique de l'ananas. *Fruits* 46: 376-379.
- Heilborn O (1922) Notes on the cytology of *Ananas sativus* Lindl. and the origin of its parthenocarpy. *Arkiv för Botanik* 17(11):1-7.
- Kodousek R (1969) New rapid method of preparing Schiff's reagent. *Histochem J* 1: 277-278.
- Lin B, Ritschel PS, Ferreira FR (1987) Número cromossômico de exemplares da família Bromeliaceae. *Rev Bras Frutic* 9: 49-55.
- Matos AP, Reinhardt DHRC (2009) Pineapple in Brazil: Characteristics, research and perspectives. *Acta Hort* 822: 25-36.
- McKey D, Elias M, Pujol B, Duputié A (2012) Ecological approaches to crop domestication. In: Gepts P, Bettinger R, Brush SB, Famula T, McGuire PE, Qualset CO (eds) *Biodiversity in agriculture*:

- domestication, evolution, and sustainability. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 377–406.
- Morton JF (1987) Pineapple. In Morton JF (Ed) *Fruits of Warm Climates*. Miami, USA: J. F. Morton. p. 18–28.
- Patiño VM (2002) Aráceas y Bromeliáceas. In Patiño VM (Ed) *Historia Y Dispersión De Los Frutales Nativos Del Neotrópico*. Cali, Colombia: Ciat. p. 293-305.
- Pereira PF (2006) Os solos-sedimentos da região central do Estado do Acre (Feijó-Tarauacá), sua aptidão ao cultivo de abacaxi e a relação com os sedimentos fluviais atuais. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Geologia e Geoquímica. Universidade Federal do Pará: Belém, Brazil. pp. 202.
- Ritzinger R (1992) Avaliação e caracterização de cultivares de abacaxi no Acre. Rio Branco, Brasil: EMBRAPA-CPAF/Acre. pp. 28.

### CAPÍTULO III

## **EFEITOS DO SISTEMA DE IMERSÃO E DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO CRESCIMENTO DE MICROBROTOS E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ABACAXIZEIRO**

Uma versão In Press deste trabalho encontra-se sob a seguinte referência:

Scherer RF, Holderbaum DF, Garcia AC, da Silva DA, Steinmacher DA, Guerra MP (*In Press*) Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. *Crop Breed Appl Biot.*

## EFEITOS DO SISTEMA DE IMERSÃO E DO ÁCIDO GIBERÉLICO NO CRESCIMENTO DE MICROBROTOS E NA ACLIMATIZAÇÃO DE ABACAXIZEIRO

**Resumo:** Protocolos de micropropagação baseados na rota regenerativa de organogênese convencional possibilitam a produção de mudas de abacaxizeiro isentas de pragas e doenças. Porém, normalmente as mudas micropropagadas apresentam altos custos quando comparadas as mudas propagadas pela forma convencional. Recentemente foi estabelecido um protocolo de micropropagação de abacaxizeiro por meio de culturas nodulares (CN) associado ao emprego de biorreatores de imersão temporária, o qual revelou uma alta eficiência regenerativa. Objetivando a otimização deste protocolo na fase de crescimento de brotos foi estabelecido um experimento completamente casualizado com três fatores: 1) sistema de imersão (permanente em frascos de cultivo ou temporária por frascos duplos); 2) suplementação, ou não, ao meio de cultura com Ácido Giberélico ( $AG_3$ ); e 3) a classe de altura de brotos. Foram avaliados os efeitos na taxa de regeneração [número de novos brotos para cada 1 g de massa fresca (MF) de microbrotos inoculada], na MF por broto em cada classe de altura de brotos (massa fresca total dos brotos dividido pelo número de brotos pesados) e na sobrevivência dos brotos. Interações significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas na taxa de regeneração, e efeitos simples ( $p < 0,05$ ) foram detectados na MF por broto. Todos os tratamentos resultaram em sobrevivência de mudas superior a 95% na aclimatização. Combinando todos os resultados obtidos, constatou-se que a associação entre o sistema de imersão temporária em frascos duplos e o meio de cultura sem  $AG_3$  permitiu a otimização do protocolo devido à alta taxa regenerativa apresentada e a formação de brotos que se apresentaram vigorosos para a aclimatização. Esta combinação também demonstrou resposta positiva em um sistema de imersão temporária usual em biofábricas que utiliza imersão temporária por frascos duplos em garrafas plásticas, tipo PET, de 5 L.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, culturas nodulares, eficiência regenerativa, biorreator de imersão temporária.

**Abstract:** Micropropagation based techniques enable the mass production of pest- and disease-free stock plants. However, the micropropagated plantlets present higher costs when compared to the

vegetative stocks production costs. Recently, a micropropagation protocol was established based on nodule cluster cultures (NC) associated with bioreactors of temporary immersion systems which showed high regenerative efficiency. Aiming at optimizing pineapple micropropagation, a complete randomized experiment with three factors was established: 1) immersion system (twin flasks temporary immersion and permanent immersion); culture medium (supplemented or not with GA<sub>3</sub>); and class of shoot height. The effects on regeneration rate (number of new shoots per 1g fresh mass (FM) of inoculated microshoots), FM per shoot, and shoot survival were evaluated. Significant interactions ( $p < 0,05$ ) were observed in the regeneration rate, and simple effects ( $p < 0,05$ ) were detected for FM per shoot. All treatments resulted in a survival rate higher than 95%. Altogether, it was found that twin flasks temporary immersion and MS culture medium free of GA<sub>3</sub> allowed the optimization of the protocol used, by the high regeneration rate presented and by the vigorous plantlets formed. This treatment was tested with positive response in a biofactory system that uses sterile plastic bottles (5 L).

**Key words:** *Ananas comosus*, nodule cluster cultures, regenerative efficiency, bioreactors of temporary immersion.

### 3.1. Introdução

O abacaxizeiro comercial (*Ananas comosus* var. *comosus*) foi domesticado no norte da América do Sul a partir da espécie selvagem *A. comosus* var. *ananassoides* (Coppens d'Eeckenbrugge e Duval, 2009), e atualmente é uma das principais frutas tropicais no mercado global (FAO, 2014). O uso de propágulos de baixa qualidade fitossanitária nos cultivos comerciais da espécie é ainda um dos principais gargalos da produção, uma vez que a principal forma de produção convencional de mudas é via propagação vegetativa, que permite a disseminação de pragas e doenças (Be e Debergh, 2006).

Protocolos de micropropagação, principalmente os baseados em organogênese convencional, se configuram como alternativa para a produção clonal em larga escala de mudas com alta qualidade fitossanitária e genética (Dal Vesco *et al.*, 2001). Porém, mudas de abacaxizeiro produzidas por esta técnica ainda apresentam altos custos quando comparadas às mudas convencionais (Teixeira *et al.*, 2001; Be e Debergh, 2006). Uma nova técnica de cultivo *in vitro*, baseada em culturas nodulares (CN), vem demonstrando alta eficiência regenerativa



para espécies da família Bromeliaceae (Guerra e Dal Vesco, 2010), entre elas: *Vriesea reitzii* (Dal Vesco e Guerra, 2010) e *Billbergia zebrina* (Dal Vesco *et al.*, 2011). Culturas Nodulares são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde-clara com textura friável (Dal Vesco e Guerra, 2010). Baseados nesta abordagem, Scherer *et al.* (2013) estabeleceram um protocolo para a micropropagação do abacaxizeiro baseado em CN, no qual sistemas de imersão temporária foram utilizados nas fases de multiplicação de CN e diferenciação de CN para microbrotos. Porém, pode ser notado que na fase de crescimento de brotos estes autores testaram diferentes doses de AG<sub>3</sub> apenas em sistema de imersão permanente.

Sistemas de imersão temporária possibilitam uma maior taxa de multiplicação, menor necessidade de mão de obra e utilização de meio de cultura líquido, podendo assim reduzir os custos de produção das mudas (Feuser *et al.*, 2003; Rech Filho *et al.*, 2005; Steinmacher *et al.*, 2011). Escalona *et al.* (1999) desenvolveu o sistema de imersão temporária por frascos duplos para a micropropagação do abacaxizeiro, e posteriormente outros estudos comprovaram a eficiência deste sistema para a micropropagação de outras espécies (Etienne e Berthouly, 2002; Rech Filho *et al.*, 2005; Niemenak *et al.*, 2008; Steinmacher *et al.*, 2011). Além disso, segundo Feuser *et al.* (2003) este sistema de imersão temporária resulta em uma menor taxa de variação somaclonal em abacaxizeiro quando comparado à imersão permanente.

Giberelinas são um grande grupo de ácidos carboxílicos diterpenóides tetracíclicos que apresenta mais de uma centena de representantes. São sintetizadas nos plastídios, endomembranas e citosol. Muitas delas apresentam função de reguladores de crescimento, e três delas são as mais abundantes em plantas superiores, AG<sub>1</sub>, AG<sub>3</sub> e AG<sub>4</sub>. Em plantas, elas atuam em diferentes processos, como germinação, reprodução, estímulo ao alongamento celular, entre outros (Hedden e Thomas, 2012). Na micropropagação de bromélias utiliza-se frequentemente o AG<sub>3</sub> para promover o alongamento celular e conseqüentemente o alongamento de brotos (Escalona *et al.*, 1999; Dal Vesco e Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011; Scherer *et al.*, 2013). Entretanto, poucas informações a respeito dos efeitos deste componente em plantas micropropagadas de abacaxizeiro têm sido reportadas.

Escalona *et al.* (1999) reportaram a existência de uma correlação positiva entre o vigor na aclimatização e o tamanho do broto, de forma similar Chenevard *et al.* (1995) correlacionaram peso de brotos (matéria

seca) com a quantidade de energia acumulada e com a resistência do caule. Desta forma, brotos grandes e pesados podem diminuir as perdas na aclimatização de mudas produzidas *in vitro*, que segundo Steinmacher *et al.* (2007) é a fase mais crítica, uma vez que acumula todos os custos de produção até então envolvidos.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar em diferentes classes de altura de brotos o efeito do sistema de imersão e da suplementação, ou não, ao meio de cultura com AG<sub>3</sub> na taxa de regeneração e na matéria fresca por broto; bem como avaliar o efeito dos tratamentos na aclimatização e no desenvolvimento inicial.

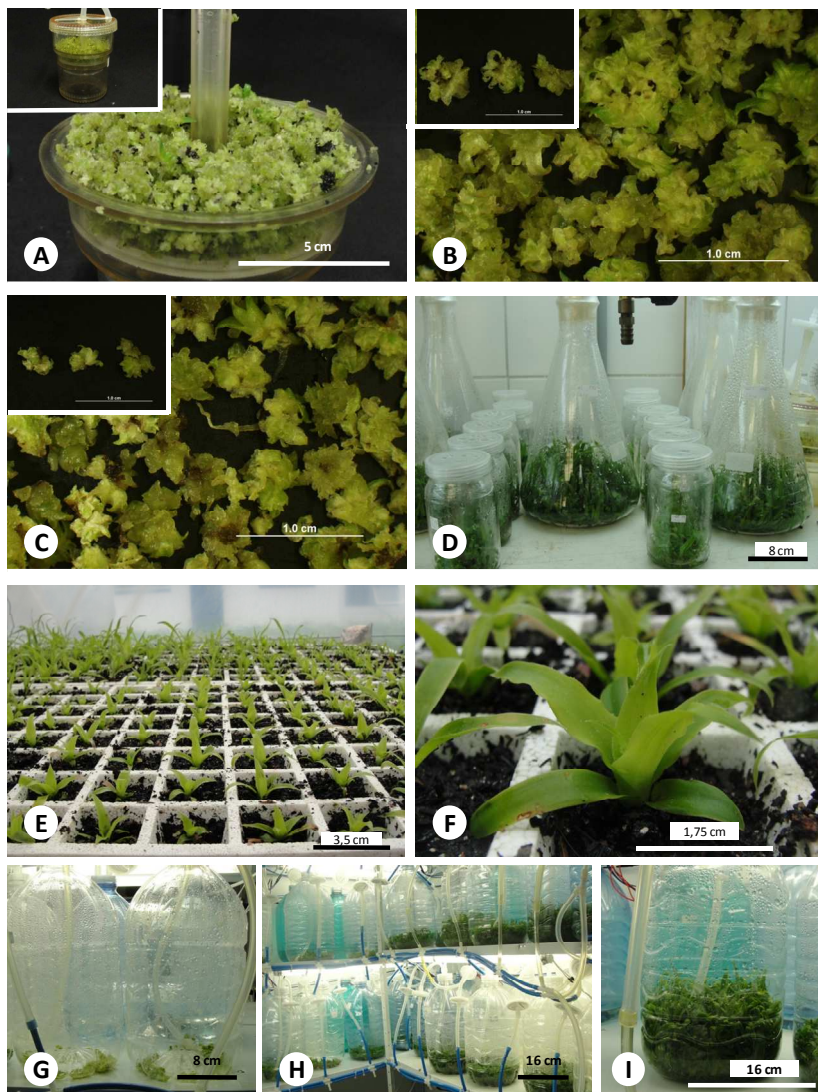
## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Fase *in vitro*

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV)/UFSC. Culturas nodulares do cultivar Pérola induzidas em organogênese convencional sob o protocolo de Guerra *et al.* (1999) foram coletadas na terceira repicagem e transferidas para a fase de multiplicação de CN do protocolo estabelecido por Scherer *et al.* (2013). Após quatro semanas, as CN formadas nesta fase foram inoculadas em aparatos RITA<sup>®</sup> para a formação de microbrotos. Finalmente, após mais quatro semanas, microbrotos desenvolvidos em aparatos RITA<sup>®</sup> foram utilizados como explantes no presente estudo (Figura 1A).

Utilizou-se meio de cultura basal (MSB) com a formulação salina MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g/L de sacarose e vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951). O pH foi ajustado para 5,5 antes da autoclavagem a 1,1 atm e 121°C por 20 min. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, com três fatores: 1) sistema de imersão [permanente em frascos de cultivo (69 x 121,7 mm / 350 mL) (SIP) ou temporária por frascos duplos em erlenmeyers de 2 L (SIT-FD)]; 2) suplementação ao meio de cultura (MSB ou MSB + 10 µM de AG<sub>3</sub>); e 3) classe de alturas de brotos (2-3 cm, 3-4 cm, 4-5 cm, 5-6 cm, 6-7 cm, e maiores que 7 cm). O experimento contou com quatro repetições, sendo que a unidade experimental do SIT-FD consistiu em uma dupla de frascos contendo 5 g de microbrotos como inóculo, e a unidade experimental do SIP consistiu em 5 frascos, cada um contendo 0,5 g de microbrotos como inóculo. Utilizou-se a razão de 30 mL de meio de cultura para a inoculação de cada 0,5 g de massa fresca de microbrotos nas unidades

experimentais. Para a inoculação, os clusters de microbrotos foram seccionados, formando agrupamentos de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro (Figura 1B e 1C, respectivamente).



**Figura 1** – Desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de brotos de abacaxizeiro. A) Microbrotos desenvolvidos em sistema de imersão temporária RITA®; B)

microbrotos antes do seccionamento para a redução do tamanho; C) microbrotos após o seccionamento para a redução do tamanho; D) brotos formados em sistemas de imersão temporária e de imersão permanente; E e F) brotos após 60 dias da aclimatização; G, H e I) sistema de biofábrica para produção massal de mudas usando garrafas plásticas esterilizadas, tipo PET (5L).

No sistema de imersão temporária as culturas permaneceram em contato com o meio de cultura por 3 min a cada 3 h. Após 8 semanas de desenvolvimento, avaliou-se a taxa de regeneração (número de novos brotos para cada 1 g de MF de microbrotos inoculada) e a MF por broto em cada classe de altura de brotos (massa fresca total dos brotos dividido pelo número de brotos pesados). Os dados foram analisados por ANOVA. A distribuição normal dos resíduos e a homocedasticidade foram checadas por análises exploratórias gráficas (QQ-Plots, gráficos de dispersão e gráficos dos resíduos). Os dados da taxa de regeneração mostraram adequação aos pressupostos do modelo linear. A transformação Box-Cox (Box e Cox, 1964) foi utilizada para normalizar a distribuição dos resíduos nos dados da variável MF por broto, e neste caso as médias estimadas foram reportadas após a retro-transformação. Quando encontrados efeitos significativos as médias foram separadas pelo método SNK, considerando 95% de confiabilidade.

### 3.2.2. Fase de aclimatização

Brotos foram aclimatizados em mistura (1:1) de casca de arroz carbonizada e substrato comercial Tropstrato<sup>®</sup> florestal (Vida Verde, Mogi-Mirim, SP, Brasil) em bandejas de 128 células. Utilizaram-se brotos maiores que 2 cm, previamente submetidos a 4 tratamentos durante a fase de crescimento de brotos: meio MSB em imersão temporária (n = 96 brotos); meio MSB com 10 µM de AG<sub>3</sub> em imersão temporária (n= 160 brotos); meio MSB em imersão permanente (n= 176 brotos); meio MSB com 10 µM de AG<sub>3</sub> em imersão permanente (n= 64 brotos). A sobrevivência das plântulas foi avaliada após 60 dias da transferência para estufa de aclimatização (Figuras 1E-F), utilizando o teste de  $\chi^2$  em tabela de contingência YxZ.

### 3.2.3. Teste em biorreatores de imersão temporária para produção em larga escala

O melhor meio de cultura observado no sistema de imersão temporária em frascos duplos utilizando erlenmeyer de 2L foi testado em biorreatores de imersão temporária utilizando garrafas plásticas, tipo

PET, usual em biofábricas. Reaproveitaram-se garrafas de água e de suco de laranja de 5L que foram lavadas com água e detergente neutro, esterilizadas utilizando solução de hipoclorito de sódio 1% durante 1h e então lavadas com água destilada esterilizada dentro de câmara de fluxo laminar. Os outros componentes do biorreator foram esterilizados em autoclave a 1,1 atm e 121°C por 20 min. Foram inoculados cinco gramas de microbrotos seccionados e utilizou-se 1 L de meio de cultura por conjunto de biorreator. Após 8 semanas de desenvolvimento os brotos foram aclimatizados.

### **3.3. Resultados e Discussão**

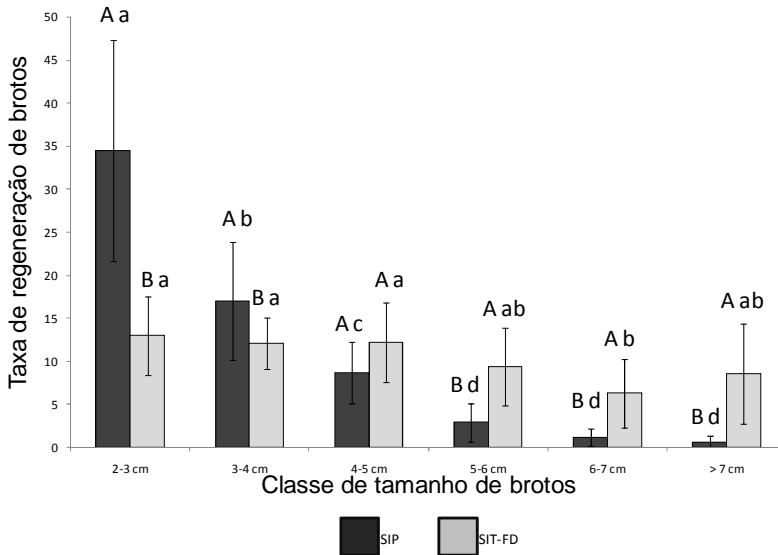
#### *3.3.1. Fase in vitro*

##### *3.3.1.1. Fase in vitro: Taxa de regeneração*

Para a variável número de brotos, todas as interações duplas foram significativas ( $p < 0,05$ ) (sistema de imersão x classe de alturas de brotos; sistema de imersão x meio de cultura; meio de cultura x classe de alturas de brotos) e não houve interação tripla ( $p > 0,05$ ).

A taxa de regeneração obtida nos dois sistemas foi dependente da classe de altura de brotos (Figura 2). Nas classes de menor tamanho (2 a 3 cm e 3 a 4 cm) os tratamentos em imersão permanente proporcionaram os maiores números de brotos. Na classe intermediária (4 a 5 cm) não houve diferença significativa entre os sistemas. Entretanto nas classes de maior tamanho (5 a 6 cm, 6 a 7 cm, e maiores que 7 cm) as maiores taxas de regeneração foram encontradas no SIT-FD. Resultados similares indicando a superioridade de sistemas de imersão temporária na produção de brotos e plântulas de maior tamanho quando comparados a sistemas de imersão permanente foram observados em pupunha (Steinmacher *et al.*, 2011), eucalipto (Oliveira *et al.*, 2011), morango (Hanhineva *et al.*, 2005), cedro-cheiroso (Peña-Rodríguez *et al.*, 2010), capim-limão (Qiala *et al.*, 2006), cana-de-açúcar (Lorenzo *et al.*, 1998) e seringueira (Etienne *et al.*, 1997). Observa-se também que os tratamentos em imersão temporária proporcionaram uma maior estabilidade na taxa de regeneração para as diferentes classes de alturas de brotos. Enquanto que em SIT-FD cinco das classes de alturas de brotos não apresentaram diferenças significativas, mantendo-se no mesmo nível da maior taxa de regeneração; em SIP houve uma concentração da produção de brotos nas classes de menor tamanho e uma menor produção de brotos grandes. Estes resultados foram semelhantes aos observados em pupunha (Steinmacher *et al.*, 2011) e

em cedro-cheiroso (Peña-Rodríguez *et al.*, 2010). De acordo com Chenevard *et al.* (1995), Escalona *et al.* (1999) e Steinmacher *et al.* (2011) brotos maiores permitem uma melhor resposta na aclimatização. Portanto, sugere-se que SIT-FD seja mais indicado para a produção em larga escala de brotos de abacaxizeiro.

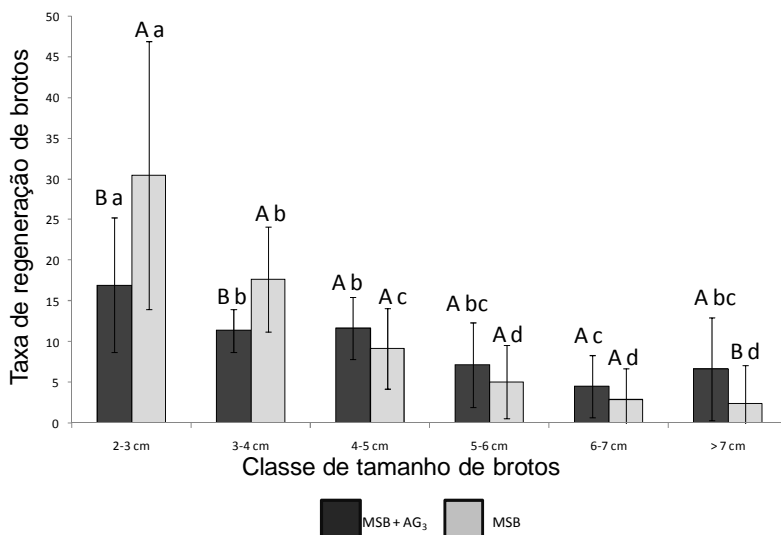


**Figura 2** – Efeitos do sistema de imersão na taxa de regeneração de brotos de abacaxizeiro (média  $\pm$  desvio padrão) em diferentes classes de altura de brotos. Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas entre os sistemas de imersão e minúsculas dentro de cada sistema de imersão, são diferentes de acordo com o teste de separação de médias SNK a 95% de confiabilidade. SIP: Sistema de imersão permanente; SIT-FD: Sistema de imersão temporária por frascos duplos.

Sugere-se que o SIT proporcione melhores e mais homogêneas respostas devido ao menor tempo de contato do meio de cultura com as culturas, a uma distribuição uniforme de nutrientes e à renovação do ar. Tais fatores permitem um melhor desenvolvimento das culturas porque, em geral, facilitam a respiração celular das culturas vegetais e levam a um menor acúmulo de compostos nocivos, como sugerido por Scherer *et al.* (2013) e Steinmacher *et al.* (2011). Além disso, o SIT proporciona

uma melhor nutrição celular quando comparado às imersões permanentes, uma vez que em SIT o meio de cultura líquido, sem gradientes de nutrientes, entra em contato com uma maior área superficial das culturas. Sugere-se também que o sistema de imersão temporária possibilite uma maior densidade de brotos e, consequentemente, maior crescimento vertical de brotos.

A taxa de regeneração também foi dependente da interação entre composição do meio de cultura e a classe de altura de brotos (Figura 3).



**Figura 3** – Efeitos do meio de cultura (MSB ou MSB + 10  $\mu$ M de AG<sub>3</sub>) na taxa de regeneração de brotos de abacaxizeiro (média  $\pm$  desvio padrão) em diferentes classes de altura de brotos. Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas entre os meios de cultura e minúsculas dentro de cada meio de cultura, são diferentes de acordo com o teste de separação de médias SNK a 95% de confiabilidade.

Nas classes de menor tamanho (2 a 3 cm e 3 a 4 cm) os tratamentos sem a suplementação de AG<sub>3</sub> proporcionaram os maiores números de brotos. Não foram encontradas diferenças nas classes de 4 a 5 cm, 5 a 6 cm, e 6 a 7 cm. Por fim, na classe de maior altura (brotos maiores que 7 cm), os tratamentos com a suplementação de AG<sub>3</sub> apresentaram a maior taxa de regeneração. Tratamentos suplementados com AG<sub>3</sub> também se mantiveram com um número mais estável de

brotos nas diferentes classes de altura, resultando em um crescimento de brotos mais sincrônico. Em outros trabalhos baseados em CN com bromeliáceas a regeneração de brotos e o sincronismo destes foram estimulados pela adição de AG<sub>3</sub> no meio de cultura (Dal Vesco e Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011; Scherer *et al.*, 2013), e o mesmo também foi reportado para outras culturas em outras rotas regenerativas (Dronne *et al.*, 1999; Peña-Ramirez *et al.*, 2010).

A interação entre o sistema de imersão e o meio de cultura (Tabela 1) mostrou que no SIP a maior taxa regenerativa foi observada no MSB sem AG<sub>3</sub>, enquanto que no SIT-FD não foi encontrado diferença quanto à presença ou não de AG<sub>3</sub>. É interessante notar que em SIP a variação no número de brotos produzidos (desvio padrão) foi muito maior do que em SIT-FD, atestando a produção mais homogênea em SIT. Quanto a suplementação, ou não, de AG<sub>3</sub> ao MSB, observou-se que no MSB suplementado com AG<sub>3</sub> o SIT-FD apresentou a maior taxa de regeneração, enquanto que quando se observou o MSB sem AG<sub>3</sub> o SIP apresentou a maior taxa de regeneração. Deve-se enfatizar, entretanto, que de acordo com o desvio padrão o SIT-FD mostrou em geral uma mais sincrônica e estável produção de brotos.

**Tabela 1** - Efeitos do meio de cultura (MSB ou MSB + 10 µM de AG<sub>3</sub>) na taxa de regeneração (média ± desvio padrão) de brotos de abacaxizeiro em diferentes sistemas de imersão (temporária (SIT-FD) ou permanente (SIP)).

Meio de cultura	Sistema de imersão	
	SIP	SIT-FD
MSB + AG <sub>3</sub> (10 µM)	8,5 ± 8,6 <b>B b</b>	11,0 ± 3,2 <b>A a</b>
MSB	13,1 ± 16,9 <b>A a</b>	9,5 ± 6,1 <b>A b</b>

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, são diferentes de acordo com o teste de separação de médias SNK a 95% de confiabilidade.

### 3.3.1.2. Fase *in vitro*: massa fresca por broto

Com relação a MF por broto, observaram-se diferenças significativas nos três fatores simples ( $p < 0,05$ ), mas nenhuma interação entre eles foi detectada. Brotos desenvolvidos em SIP apresentaram



maior peso do que aqueles desenvolvidos em SIT-FD (0,175 g contra 0,112 g). Além disso, brotos cultivados em MSB sem AG<sub>3</sub> foram mais pesados que aqueles cultivados em MSB com AG<sub>3</sub> (0,178 g contra 0,111 g). Assim, o MSB sem AG<sub>3</sub> gerou brotos mais pesados, enquanto que o MSB com AG<sub>3</sub> gerou brotos maiores, porém mais finos, com entrenós maiores e folhas mais finas e alongadas. Mesmo assim, foi observado um aumento crescente na MF por broto na medida em que se aumentava a classe de altura dos brotos (tabela 2).

**Tabela 2** - Efeitos da classe de altura de brotos de abacaxizeiro (cm) na massa fresca por broto.

<b>Classe de altura de brotos (cm)</b>	<b>Massa fresco por broto (g/broto)</b>
> 7	0,3385 <b>A</b>
6 - 7	0,2209 <b>B</b>
5 - 6	0,1940 <b>B</b>
4 - 5	0,1365 <b>C</b>
3 - 4	0,0877 <b>D</b>
2 - 3	0,0548 <b>E</b>

Médias seguidas por letras diferentes são diferentes de acordo com o teste de separação de médias SNK a 95% de confiabilidade.

Observa-se também que brotos desenvolvidos em SIP apresentaram-se mais compactos do que os desenvolvidos em SIT-FD, porém, numa escala mais sutil que a diferença morfológica relacionada com a suplementação ou não com AG<sub>3</sub> (Figura 4).

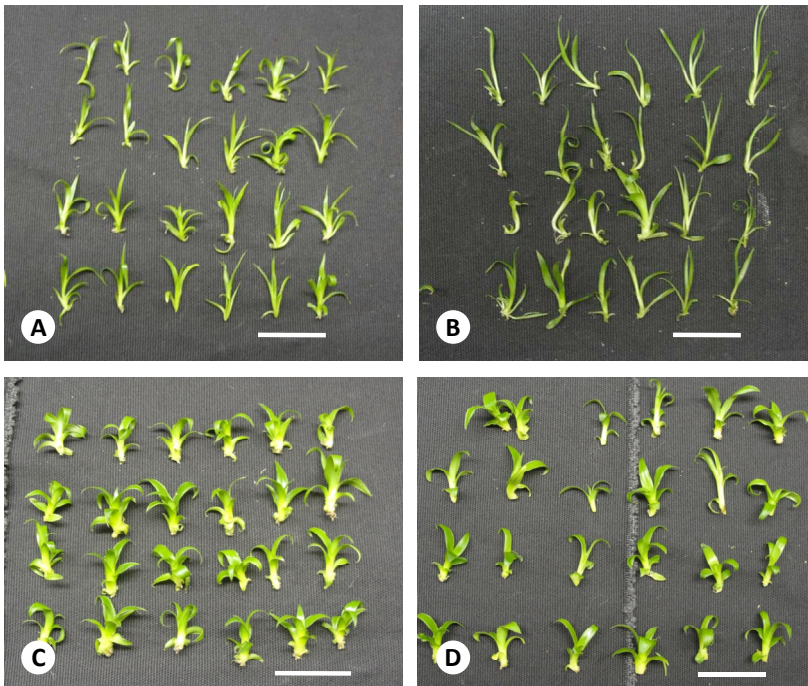
### 3.3.2. Fase de Aclimatização

A variável sobrevivência de brotos não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) e todos os tratamentos mostraram sobrevivência superior a 95%. Resultados similares foram reportados em outros trabalhos com o abacaxizeiro (Guerra *et al.*, 1999; Sripaoraya *et al.*, 2003; Amin *et al.*, 2005; Scherer *et al.*, 2013). Brotos desenvolvidos em SIT-FD e MSB sem AG<sub>3</sub> apresentaram o maior vigor após a aclimatização (dados não mostrados), mostrando coerência entre o vigor

das plantas aclimatizadas e o peso de brotos na fase de crescimento de brotos *in vitro*.

### 3.3.3. Teste em biorreatores de imersão temporária para produção em larga escala

O melhor tratamento, SIT-FD com o uso de MSB sem  $AG_3$ , foi testado com sucesso em um sistema de biofábrica que usa um sistema de imersão temporária em frascos duplos usando garrafas PET de 5 L (Figuras 1G-I). Atualmente, biofábricas no Brasil tem usado este modelo de SIT para, principalmente, a produção em larga escala de cana-de-açúcar. Nossas observações indicam que este sistema também pode ser aplicado eficientemente para a produção massal de mudas de abacaxizeiro.



**Figura 4** – Brotos de abacaxizeiro (3 a 4 cm) micropropagados em sistema de imersão temporária (SIT-FD) e de imersão permanente (SIP), com ou sem a suplementação de  $AG_3$  ao meio de cultura (MSB). Barras = 4 cm. A) Brotos desenvolvidos em SIP com a suplementação de  $AG_3$  ao MSB; B) brotos

desenvolvidos em SIT-FD com a suplementação de AG<sub>3</sub> ao MSB; C) brotos desenvolvidos em SIP sem a suplementação de AG<sub>3</sub> ao MSB; D) brotos desenvolvidos em SIT-FD sem a suplementação de AG<sub>3</sub> ao MSB.

### 3.4. Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostraram que a combinação do SIT-FD e do MSB sem AG<sub>3</sub> resultaram numa alta eficiência regenerativa, na produção sincrônica e homogênea de brotos vigorosos e na alta taxa de sobrevivência de brotos na aclimatização. Adicionalmente, o SIT-FD necessita de menos mão-de-obra e o MSB sem AG<sub>3</sub> representa um menor custo para o meio de cultura. Juntos, estes fatores contribuem para (i) redução no custo de produção da muda micropropagada de abacaxizeiro, e (ii) na expressiva melhora nos protocolos de micropropagação de abacaxizeiro até então publicados. Por fim, considera-se que estas características são promissoras para a produção em larga escala de mudas de abacaxizeiro em biofábricas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem CAPES, CNPq e FAPESC pelas bolsas de estudo, bolsas de pesquisa e suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

### Referências

- Amin MN, Rahman MM, Rahman KW, Ahmed R, Hossain MS, Ahmed MB (2005) Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Giant Kew]. International Journal of Botany 1:128-132.
- Be LV, Debergh PC (2006) Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*). S Afr J Bot 72:191-194.
- Box GEP, Cox DR (1964) An Analysis of Transformations. J Roy Stat Soc B 39:211-252.
- Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval M-F (2009) The domestication of pineapple: context and hypotheses. Pineapple News Volume 16: 15-27.
- Dal Vesco LL, Pinto AA, Zaffari GR, Nodari RO, Reis MS, Guerra MP (2001) Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. Fruits 56: 143-154.

- Dal Vesco LL, Guerra MP (2010) *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. *Sci Horti - Amsterdam* 125:748-755.
- Dal Vesco LL, Stefenon VM, Welter LJ, Scherer RF, Guerra MP (2011) Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. *Sci Horti - Amsterdam* 128:515-522.
- Dronne S, Jullien F, Caissard J-C and Faure O (1999) A simple and efficient method for *in vitro* shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). *Plant Cell Rep* 18: 429–433.
- Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez BL, Daquinta M, Gonzalez JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18:743-748.
- Etienne H, Lartaud M, Michaux-Ferriere N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro Cell Dev - Pl* 33: 81–87.
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org* 69:215-231.
- Faostat, FAO statistical databases, pineapple data (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Feuser S, Meler K, Daquinta M, Guerra MP (2003) Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isoenzyme and RAPD markers. *Plant Cell Tiss Org* 72:221-227.
- Guerra MP, Dal Vesco LL (2010) Strategies for the micropropagation of bromeliads, in: Jain SM, Ochatt SJ (Eds.), *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology*. New York, USA: Humana Press-Springer. p. 47-66.
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Pescador R, Schuelter AR, Nodari RO (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesqui Agropecu Bras* 34:1557-1563.
- Hanhineva K, Kokko H, Kärenlampi S (2005) Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars in

- temporary immersion bioreactor system. *In vitro Cell Dev - Pl* 41:826-831.
- Hedden P, Thomas GS (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444:11–25.
- Lorenzo JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org* 54:197–200.
- Morel GM, Wetmore RH (1951) Tissue culture of monocotyledons. *Am J Bot* 38:138-140.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497.
- Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Ndoumou DO, Lieberei R (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactors and analyses of free amino acids in different tissue. *Plant. Cell Rep* 27:667-676.
- Oliveira ML, Xavier A, Penchel RM, Santos AF (2011) Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. *Sci For* 39:309-315.
- Peña-Ramires YJ, Juárez-Gómez J, Gómez-López L, Jerónimo-Pérez JL, García-Sheseña I, González-Rodríguez A, Robert ML (2010) Multiple adventitious shoot formation in spanish red cedar (*Cedrella odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical species. *In vitro Cell Dev - Pl* 46:149-160.
- Quijala E, Barbón R, Jiménez E, de Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2006) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In vitro Cell Dev - Pl* 42:298-300.
- Rech Filho A, Dal Vesco LL, Nodari RO, Lischka RW, Müller CV, Guerra MP (2005) Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodivers Conserv* 14:1799-1808.
- Reinhardt A, Rodriguez LV (2009) Industrial Processing of Pineapple – Trends and Perspectives. *Acta Hort* 822:323-328.
- Scherer RF, Garcia AC, Fraga HPF, Dal Vesco LL, Steinmacher DA, Guerra MP (2013) Nodule cluster cultures and temporary

- immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Sci Hortic - Amsterdam* 151:38-45.
- Sripaoraya S, Marchant R, Power JB, Davey MR (2003) Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In vitro Cell Dev - PI* 39:450-454.
- Steinmacher DA, Cangahuala-Inocente GC, Clement CR, Guerra MP (2007) Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In vitro Cell Dev - PI* 43:124-132.
- Steinmacher DA, Guerra MP, Saare-Surminski K, Lieberei R (2011) Temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann Bot - London* 108:1463-1475.
- Teixeira J, Cruz ARR, Ferreira FR, Cabral JR (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 3:42-47.

## CAPÍTULO IV

**NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL EM CULTURAS NODULARES E FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS REGENERADAS DE ABACAXIZEIRO**

Uma versão deste estudo encontra-se publicada sob a seguinte referência:

Scherer RF, Fraga HPF, Klabunde GF, da Silva DA, Guerra MP (online first) Global DNA methylation levels during the development of nodule cluster cultures and assessment of genetic fidelity of *in vitro*-regenerated pineapple plants (*Ananas comosus* var. *comosus*). *J Plant Growth Regul.*

## NÍVEIS DE METILAÇÃO DO DNA GLOBAL EM CULTURAS NODULARES E FIDELIDADE GENÉTICA DE PLANTAS REGENERADAS DE ABACAXIZEIRO

**Resumo:** O abacaxizeiro comercial (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma frutífera de grande importância econômica mundial. Recentemente um protocolo de micropropagação baseado em culturas nodulares (CN) e que apresenta altas taxas regenerativas foi estabelecido. Objetivando expandir o entendimento a respeito da regulação da expressão gênica neste protocolo, os níveis de metilação do DNA global (NMDG) e os incrementos de massa fresca (IMF) durante as fases de multiplicação de CN e de diferenciação de CN para microbrotos foram avaliados depois de 0, 9, 18, 27 e 36 dias em cultivo. Adicionalmente, plantas regeneradas foram aleatoriamente coletadas e avaliadas quanto à fidelidade genética por meio da técnica de Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), do nível de ploidia analisado por citometria de fluxo, assim como por observações fenotípicas das mudas. Os NMDG apresentaram-se dinâmicos nas duas fases estudadas e estavam associados ao IMF e a idade das culturas, por sua vez, as análises baseadas em AFLP, nível de ploidia e em características morfológicas indicaram que as plantas regeneradas mantiveram-se homogêneas. De acordo com nosso conhecimento, esta é a primeira divulgação que associa NMDG de culturas *in vitro* com análises de fidelidade genética, acessadas por AFLP, nível de ploidia e características morfológicas.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, HPLC, AFLP, nível de ploidia, citômetro de fluxo, fenótipo.

**Abstract:** Commercial pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) presents a significant impact on the global fruit market. Recently, a micropropagation protocol was established based on nodule cluster cultures (NC) which showed high regenerative efficiency. Aiming to expand the understanding of gene regulation in this protocol, global DNA methylation levels (GDML) and fresh mass increase ratio (FMIR) during NC multiplication and differentiation to microshoots were evaluated at 0, 9, 18, 27 and 36 days in culture. In addition, genetic fidelity of randomly chosen regenerated plants was analyzed by means of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), flow cytometric analysis of ploidy level, as well as observation of phenotypic features. The GDML in both phases were dynamics and associated to FMIR and



the cultures age, in turn, the analysis of AFLP, ploidy level and morphological features indicated homogeneity in the regenerated plants. To the best of our knowledge this is the first report associating GDML of *in vitro* cultures with analyses of genetic fidelity assessed by AFLP, ploidy level and phenotype of regenerated plantlets.

**Keywords:** *Ananas comosus*, HPLC, AFLP, ploidy level, flow cytometry, phenotype.

#### 4.1. Introdução

O abacaxizeiro comercial (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma planta da família Bromeliaceae que tem como centro de origem de domesticação a região do Escudo das Guianas (Coppens D'eeckenbrugge e Duval, 2009). Técnicas de cultura de tecidos vegetais baseadas na organogênese têm sido empregadas para a propagação massal de mudas clonais, isentas de pragas e doenças (Guerra *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2001). Estas mudas apresentam-se com alta qualidade fitossanitária, porém, apresentam altos custos quando comparadas às mudas convencionais (Be e Debergh, 2006). Recentemente foi desenvolvido um novo protocolo de micropropagação para esta espécie, o qual é baseado em culturas nodulares (CN) associadas a sistemas de imersão temporária e que apresenta elevada taxa regenerativa (Scherer *et al.*, 2013). Culturas nodulares são aglomerados globulares meristemáticos friáveis de coloração verde-clara, os quais em condições adequadas desenvolvem microbrotos, que são brotos menores que 0,5 cm (Dal Vesco e Guerra, 2010; Scherer *et al.*, 2013).

Afirma-se que plantas micropropagadas por meio de rotas regenerativas *in vitro* que apresentam fases intermediárias de calos apresentam maior susceptibilidade à ocorrência de variação somaclonal (Phillips *et al.*, 1994; Rani e Raina, 2000). Em decorrência da existência de características similares entre calos e CN, poderia ser presumido que há uma maior possibilidade de ocorrência destas variações nesta rota regenerativa *in vitro*. Culturas nodulares apresentam altas taxas regenerativas e são constituídas por setores meristemáticos, formados em grande parte por células indiferenciadas (Dal Vesco e Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.*, 2011; Scherer *et al.*, 2013).

Variação somaclonal refere-se às variações fenotípicas, de origens genéticas e/ou epigenéticas, que ocorrem em plantas micropropagadas quando comparadas com a planta matriz (Smulder e de

Klerk, 2011; Wang e Wang, 2012). Na produção massal de plantas em biofábricas estas variações não são esperadas, e podem ser toleradas apenas em porcentagens abaixo de 5% (Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº22/2012). Assim, variações epigenéticas são variações fenotípicas não esperadas e estão relacionadas aos fatores de regulação gênica, sem causar mudanças permanentes na sequência do DNA. Estas variações são herdáveis e podem permanecer mesmo com a retirada dos estímulos que a induziram, porém, podem também ser reversíveis (Kaepler *et al.*, 2000; Lauria e Rossi, 2011). Por sua vez, variações genéticas são variações fenotípicas não esperadas e relacionadas a mutações que modificam a sequência de DNA (Kaepler *et al.*, 2000; Smulder e de Klerk, 2011). Entretanto, estes fenômenos não agem isoladamente, sendo que uma variação genética ou epigenética pode desencadear uma série de modificações posteriores, podendo ser variações genéticas e/ou epigenéticas (Kaepler *et al.*, 2000; Smulders e de Klerk, 2011; Neelakandan e Wang, 2012).

Desta forma, variações epigenéticas relacionadas com o padrão de metilação do DNA podem desencadear variações genéticas tais como alterações cromossômicas, inserções, deleções, mudanças na ploidia e outros (Kaepler *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2007; Wang e Wang, 2012). O padrão de metilação de um gene está relacionado com a presença ou ausência de uma, ou mais, citosina com uma ligação de um grupo metil ao carbono número 5, e interfere na tradução do gene (Finnegan, 2010). Modificações do padrão de metilação do DNA global são geradas em consequência de sinais ambientais e promovem uma regulação dinâmica nas células (Zhu *et al.*, 2007; Finnegan, 2010).

Diversos estudos abordaram a fidelidade genética de plantas micropropagadas por meio de variações genéticas, normalmente acessadas por meio de marcadores moleculares baseados em DNA, pelos níveis de ploidia e pelos fenótipos dos indivíduos. Dentre os marcadores moleculares utilizados para esta abordagem, destacam-se *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Simple Sequence Repeat* (SSR), *Inter-Simple Sequence Repeat* (ISSR), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Bairu *et al.*, 2011; Wang e Wang, 2012). Dentre estes, a técnica de AFLP tem se mostrado eficiente para a discriminação de variantes somaclonais de abacaxizeiro (Perez *et al.*, 2009) e de outras

espécies, tais como *Freesia hybrida* (Gao *et al.*, 2010), *Bambusa nutans* (Mehta *et al.*, 2011) e *Miscanthus* spp. (Rambaud *et al.*, 2013).

Plantas poliplóides ou aneuplóides exibem características morfológicas específicas quando relacionadas com a(s) planta(s) parental(is) (Birchler, 2009). Neste sentido, diferenças morfológicas em abacaxizeiros triplóides e tetraplóides foram observadas quando comparados às respectivas plantas parentais diplóides (Collins, 1933; Kerns e Collins, 1947). Estudos sobre a fidelidade genética relacionada ao nível de ploidia vêm sendo realizados, principalmente, por meio da técnica de citometria de fluxo (Ochatt, 2008). E quando se consideram aspectos morfológicos de plantas micropropagadas, a estatura e o hábito de crescimento das plantas, e a morfologia e a pigmentação foliar são as características normalmente avaliadas quanto à ocorrência de variações fenotípicas (Menéndez-Yuffa *et al.*, 2010; Bairu *et al.*, 2011).

Com o objetivo de ampliar a compreensão da regulação gênica relacionada à dinâmica da metilação do DNA global no protocolo de micropropagação de *A. comosus* var. *comosus* baseado em CN, avaliou-se a dinâmica dos níveis de metilação do DNA global e os incrementos de massa fresca ao longo da multiplicação das CN e da diferenciação de CN para microbrotos. Além disso, a fidelidade genética de plantas regeneradas provenientes do protocolo baseado em CN foi avaliada através de AFLP, nível de ploidia analisado por citometria de fluxo, assim como por observações morfológicas.

## **4.2. Material e Métodos**

### **4.2.1. Micropropagação via CN associadas a sistemas de imersão temporária**

Este estudo foi realizado utilizando um genótipo diplóide do cultivar Pérola. Em todos os experimentos de micropropagação se utilizou o meio de cultura básico (MSB) constituído pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951) e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 antes da autoclavagem realizada através de 20 min a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,1 \text{ Kgf.cm}^{-2}$ . Os sistemas de imersão temporária tiveram regime de 3 min de contato com o meio de cultura a cada 3 h. Amostras das culturas desenvolvidas nos estágios de multiplicação de CN (Figura 1A), diferenciação de CN para microbrotos (Figura 1B) e crescimento de brotos foram coletadas, cada qual seguindo as metodologias específicas, como segue abaixo.

#### 4.2.1.1. *Multiplicação de culturas nodulares*

Culturas nodulares induzidas em organogênese convencional sob o protocolo de Guerra *et al.* (1999) (Figura 1C) foram coletadas na terceira repicagem. Em seguida 5g de matéria fresca (MF) de CN foram inoculadas em frascos de cultivo (69 x 121,7 mm / 350 mL) sob sistema de imersão temporária por frascos duplos (SIT-FD) (Figura 1D) contendo 50 mL de MSB suplementado com 2  $\mu$ M de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 2  $\mu$ M de 6-benzilaminopurina (BAP). O delineamento experimental foi completamente casualizado, com quatro repetições, e a unidade experimental consistiu em um conjunto de SIT-FD. Amostras de culturas vegetais foram coletadas em cinco tempos de cultivo em SIT-FD, constituindo os tratamentos: 0 (inoculação de CN em SIT-FD), 9, 18, 27 e 36 dias, sendo armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise de metilação global.

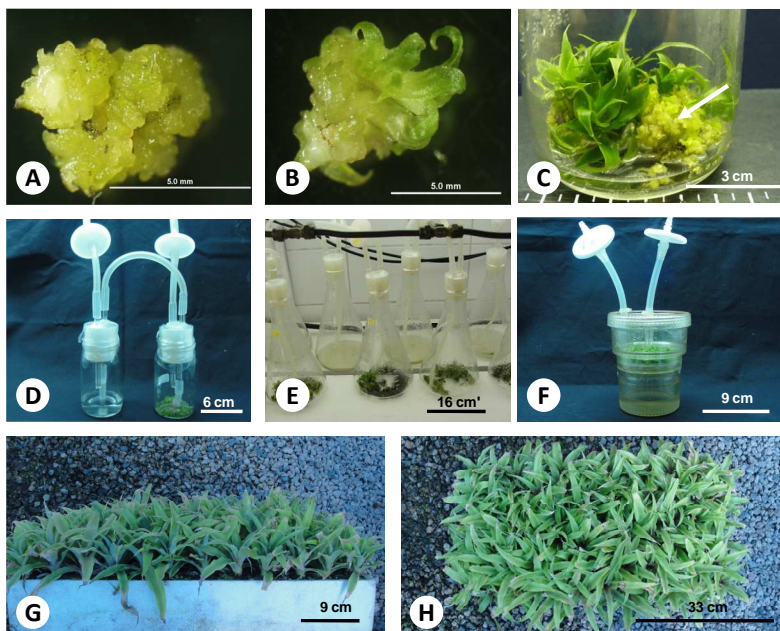
#### 4.2.1.2. *Diferenciação de CN para microbrotos*

Cerca de 3,3 g de MF de CN cultivadas em SIT-FD em erlenmeyer (2 L) (Figura 1E) foram inoculadas em aparatos RITA<sup>®</sup> (SIT-RITA<sup>®</sup>) (Figura 1F) contendo 200 ml de MSB suplementado com 2  $\mu$ M de ANA e 2  $\mu$ M de BAP. O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados, com quatro repetições, e a unidade experimental consistiu em um biorreator RITA<sup>®</sup>. Amostras de culturas vegetais foram coletadas em cinco tempos de cultivo em SIT-RITA<sup>®</sup>, constituindo os tratamentos: 0 (inoculação de CN em SIT-RITA), 9, 18, 27 e 36 dias, sendo armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise de metilação global.

#### 4.2.1.3. *Crescimento de brotos*

Microbrotos (5 g de MF) obtidos em SIT-RITA<sup>®</sup> foram inoculados em erlenmeyers (2 L) sob SIT-FD contendo 300 mL de MSB. Após 60 dias na fase de crescimento de brotos, 72 brotos com altura superior a 2 cm foram aclimatizados em bandejas de isopor em uma mistura (1:1) de casca de arroz carbonizada e substrato comercial Tropstrato HT hortaliças (Vida Verde, Mogi-Mirim, SP, Brasil). Após 4 meses, a fidelidade genética das mudas foi acessada por meio de AFLP e pelo nível de ploidia analisado por citometria de fluxo. Observações fenotípicas como o hábito de crescimento, alterações no formato das folhas, presença de espinhos e variação foram também realizadas.

Modificações transitentes, que não se enquadram nas definições adotadas a respeito das duas formas de variação (genética e/ou epigenética), não foram consideradas como sendo variações somaclonais.



**Figura 1-** Micropropagação do abacaxizeiro por meio do protocolo baseado em culturas nodulares e sistema de imersão temporária (SIT). A) Culturas nodulares; B) microbrotos; C) formação de culturas nodulares a partir de culturas organogênicas; D) cultivo de culturas nodulares em sistema de imersão temporária por frascos duplos (SIT-FD) usando frascos de cultivo de vidro (69 x 121,7 mm / 350 mL); E) culturas nodulares em SIT-FD usando frascos erlenmeyers (capacidade de 2 L); F) microbrotos em imersão temporária usando aparatos RITA<sup>®</sup> (capacidade de 1 L); G e H) plantas aclimatizadas.

#### 4.2.2. Protocolos de avaliação

##### 4.2.2.1. Análise da metilação global

A extração do DNA das culturas vegetais foi realizada baseando-se na metodologia do CTAB (Doyle e Doyle, 1990). Os procedimentos de digestão, purificação e as análises por *high performance liquid chromatography* (HPLC) foram baseados na metodologia descrita por Fraga *et al.* (2012). As amostras contendo nucleosídeos, incluindo 5-

metil-2'-deoxicidina (5mdC) e deoxicidina (dC), foram filtradas em poros de 0,22  $\mu\text{m}$  e injetadas em HPLC. Foi utilizado uma coluna Hyperclone 5  $\mu\text{m}$  C18 (250  $\times$  4,6 mm) (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, CA, USA), pré-coluna (4.0  $\times$  3,0 mm) (Phenomenex<sup>®</sup>) e detector UV a 280 nm. Dois eluentes foram utilizados: A (0,5% v/v de metanol em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico) e B (10% v/v de metanol em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico). A corrida teve 100% do eluente A nos 3 min iniciais, seguido de um gradiente linear de 17 min para troca do eluente A pelo eluente B, e nos 5 min finais da corrida utilizou-se 100% do eluente B. A separação dos nucleosídeos foi realizada em um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, sendo injetados 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra por vez (4 repetições tanto no estudo da fase de multiplicação de CN quanto da fase de diferenciação de CN para microbrotos). Desoxirribonucleotídeos fosfatados, dNTPs (Fermentas<sup>®</sup>, Vilnius, Lithuania), foram digeridos por 2h com fosfatase alcalina (10 U.mL<sup>-1</sup>) e Tris-HCl (0,5 M pH 8,3) a 37 °C para formar os padrões de nucleosídeos (dA, dT, dC, 5mdC e dG) (5-50 mM). As concentrações de cada nucleosídeo nas amostras foram determinadas por comparações com padrões externos de acordo com cada área de pico formado. A quantificação de 5mdC (%) foi calculada de acordo com a concentração de 5mdC dividido pela concentração de 5mdC somada a concentração de dC e no final multiplicado por 100. Os dados obtidos foram analisados pelo software RStudio<sup>®</sup> sendo submetidos a ANOVA e posterior teste de separação de médias por SNK ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.2 *Análise de massa fresca*

Os procedimentos de cultivo nas fases de multiplicação de CN e de diferenciação de CN para microbrotos utilizados neste experimento foram os mesmos descritos anteriormente. O delineamento experimental foi completamente casualizado e com quatro repetições. A unidade experimental consistiu em um conjunto de SIT-FD na fase de multiplicação de CN e em um biorreator RITA na fase de diferenciação de CN para microbrotos. Os incrementos da massa fresca (IMF) foram calculados usando a fórmula: (massa fresca final – massa fresca inicial) / massa fresca inicial. As amostras foram coletadas depois de 9, 18, 27 e 36 dias em cultivo, tempos que foram definidos como massa fresca final. A massa fresca inicial foi medida três dias antes de cada massa fresca final. Os dados obtidos foram analisados pelo software RStudio<sup>®</sup>

sendo submetidos a ANOVA e posterior teste de separação de médias por SNK ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2.3. Análise de fidelidade genética por AFLP

A extração do DNA de folhas das plantas aclimatizadas foi realizada baseando-se na metodologia do CTAB (Doyle e Doyle, 1990), em seguida 20 amostras, com três repetições técnicas cada, foram genotipadas. As reações de AFLP foram baseadas no protocolo de Stefenon *et al.* (2007). As enzimas de restrição utilizadas foram *Eco* RI e *Mse* I e em seguida os fragmentos foram ligados aos adaptadores correspondentes. Realizou-se uma pré-amplificação com iniciadores complementares aos adaptadores com um nucleotídeo adicional seletivo na extremidade 3' (*Eco* RI + A; *Mse* I + C). E em seguida a amplificação seletiva foi realizada por meio de 6 combinações de iniciadores: *Eco* RI + AAT combinado com *Mse* I + CTG, CTC, CAG, CAA, CTT ou CAT. Condições da reação em cadeia da polimerase (PCR – na sigla em inglês) na pré-amplificação foram: 94 °C por 2 min, seguido de 26 ciclos de: 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 min. Similarmente, condições da PCR na amplificação foram: 94 °C por 2 min, seguido de 12 ciclos de: 94 °C por 30 s, temperatura de anelamento por 30 s, iniciando com 65 °C e resfriando 0,7 °C depois de cada subsequente ciclo, e 72 °C por 1 min, então se seguiu mais 23 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e finalizando com uma extensão final de 72 °C por 5 min. Todas as reações foram realizadas com o termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O iniciador *Eco* RI + AAT foi marcado na extremidade 5' com o corante fluorescente 6-carboxi-2', 4,4', 5', 7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); e os produtos da PCR (1 µL) foram combinados com o padrão interno de tamanho ET-ROX-400 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Em seguida, os produtos das PCRs foram eletroforéticamente separados sobre uma plataforma de genotipagem capilar MegaBACE-1000 (GE Healthcare). Uma matriz binária foi construída por meio da visualização dos picos consistentes e reproduzíveis nos eletroferogramas, entre 60 e 400 pares de bases, para a análise do grau de homogeneidade entre os indivíduos, usando o software Fragment Profiler ver.1.2 (GE Healthcare).

#### 4.2.2.4. *Análise da fidelidade genética pela citometria de fluxo*

Cerca de 200 mg (MF) de folhas das plantas aclimatizadas foram fragmentadas com auxílio de bisturi para o isolamento de núcleos em 0,4 mL de tampão de extração nuclear Otto I (0,1 M de ácido cítrico; 0,5% de Tween<sup>®</sup>20; a 4 °C). Em seguida a solução foi filtrada em malha de nylon (40 µm). Após uma incubação entre 60 a 180 min, na ausência de luz e em temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em malha de nylon (30 µm) sendo adicionados 2 mL de solução Otto II (0,4 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; temperatura ambiente) contendo 4 µg.mL<sup>-1</sup> de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Vinte plantas regeneradas e um controle (genótipo diplóide da planta mãe) foram analisadas através de um citômetro de fluxo (Partec<sup>®</sup> PAII -Partec GmbH, Münster, Germany) equipado com laser em estado sólido azul (488 nm). Foram analisados pelo menos 5.000 núcleos de cada amostra, que tiveram duas replicatas cada. A avaliação da fidelidade genética ocorreu pela comparação entre os picos das amostras geradas por fluorescência no eixo x do histograma (eixo dos canais), tendo fixo no equipamento o “pair gain”.

### 4.3. Resultados e discussão

#### 4.3.1. *Níveis de metilação do DNA global*

Diferenças significativas nos NMDG foram observadas entre os tratamentos testados durante as fases de multiplicação de CN e de diferenciação de CN para microbrotos. Para os IMF diferenças significativas foram observadas apenas durante a fase de multiplicação de CN (Tabela 1).

Observou-se um declínio inicial dos níveis de metilação global nas culturas em multiplicação de CN em SIT-FD entre a inoculação e o 18º dia em cultivo, seguido de um aumento entre o 18º e o 27º dia, e então um declínio significativo foi observado no 36º dia. Estes resultados sugerem que os NMDG nas culturas em multiplicação de CN em SIT-FD podem estar associados com a densidade de novos meristemas apicais de brotos formados, que, por sua vez, está relacionada com os IMF e a idade dos subcultivos. Neste sentido, sugere-se que o maior valor no NMDG no dia 0 poderia estar relacionado com o comportamento metabólico das culturas no momento da seleção para inoculação. Assim, a densidade de novos meristemas apicais de brotos até o 18º dia foi menor quando comparada ao valor observado no dia 0, mesmo com os altos IMF observados entre os dias 9



e 18 em cultivo. Entretanto, entre os dias 18 e 27, um aumento nos NMDG foi observado, sendo que no 27º dia um alto incremento de massa fresca foi mantido. Neste sentido, sugere-se que a maior densidade de novos meristemas apicais de brotos na multiplicação de CN em SIT-FD se deu por volta do 27º dia de cultivo, uma vez que a diminuição nos NMDG observada no 36º dia foi coincidente com a queda significativa nos IMF e, conseqüentemente, com a queda na formação de novos meristemas apicais de brotos.

**Tabela 1.** Níveis de metilação do DNA global (NMDG, %) e incrementos de massa fresca (IMF) em culturas *in vitro* de *A. cosmosus* var. *cosmosus* nas fases de multiplicação de culturas nodulares (CN) e de diferenciação de CN para microbrotos em diferentes sistemas de imersão.

<b>Tempo de cultivo (dias)</b>	<b>NMDG (%) em multiplicação de CN em SIT-FD</b>	<b>IMF em multiplicação de CN em SIT-FD</b>	<b>NMDG (%) em diferenciação de CN para microbrotos em SIT-RITA®</b>	<b>IMF em diferenciação de CN para microbrotos em SIT-RITA®</b>
0	34,36 A	----	34,60 A	----
9	30,42 C	0,098 A	31,42 B	0,186 A
18	28,36 E	0,095 A	32,52 B	0,186 A
27	31,65 B	0,077 A	34,41 A	0,111 A
36	29,33 D	0,029 B	35,38 A	0,079 A
<b>Média</b>	<b>30,82</b>	<b>0,074</b>	<b>33,66</b>	<b>0,140</b>
<b>CV(%)</b>	<b>6,9</b>	<b>46,32</b>	<b>4,84</b>	<b>39,23</b>

Médias seguidas por letras diferentes na coluna são diferentes de acordo com teste de separação de médias SNK a 95% de confiabilidade. SIT-FD: sistema de imersão temporária por frascos duplos; SIT-RITA®: sistema de imersão temporária em biorreatores RITA®.

Na diferenciação de CN para microbrotos em SIT-RITA®, um alto NMDG foi observado no dia 0, seguido por menores níveis entre os dias 9 e 18 e então um aumento significativo ocorreu no 27º dia, permanecendo alto até o 36º dia. De forma similar aos resultados obtidos na multiplicação de CN em SIT-FD, os menores valores nos

NMDG entre o 9º e o 18º dia foram acompanhados por altos valores de IMF. Assim como na fase anterior, sugere-se que as densidades de novos meristemas apicais de brotos nestes dois tempos foram menores que a observada inicialmente na inoculação (dia 0). Os aumentos nos NMDG nos dia 27 e 36 também estiveram associados com altos IMF. É possível que a maior densidade de novos meristemas apicais de brotos na diferenciação de CN para microbrotos em SIT-RITA<sup>®</sup> tenha sido aproximadamente ao 36º dia, período associado ao maior NMDG e ainda alto IMF, porém indicando início do declínio deste último.

De maneira geral, as médias dos NMDG e dos IMF foram maiores na fase de diferenciação de CN para microbrotos em SIT-RITA quando comparadas a fase de multiplicação de CN em SIT-FD. Porém, ambas as fases apresentaram altas porcentagens médias nos níveis de metilação, variando de cerca de 28% a cerca de 35%.

Modificações em sinais ambientais e de desenvolvimento normalmente desencadeiam modificações no padrão de metilação (Furner e Matzke, 2011), consequência de hipometilação de alguns genes e hipermetilação de outros (Dyachenko *et al.*, 2006; Choi e Sano, 2007). De acordo com Zlucova *et al.* (2001), encontra-se um alto nível de metilação do DNA na zona central do meristema apical de brotos, o que reforça a sugestão de que a densidade de novos meristemas apicais de brotos pode estar correlacionada com altos NMDG.

#### 4.3.2. AFLP, níveis de ploidia e análises fenotípicas

Apesar das culturas *in vitro* no SIT-FD e no SIT-RITA<sup>®</sup> apresentarem um comportamento bastante dinâmico nos NMDG, as avaliações por meio das análises de AFLP, citometria de fluxo e características morfológicas das plantas regeneradas indicaram a manutenção da homogeneidade entre elas.

Um total de 1.620 picos contáveis, ou seja, 81 fragmentos de AFLP distintos com tamanhos entre 70 e 379 pares de bases foram acessados nas seis combinações estudadas para cada uma das 20 plantas analisadas e por meio deles foi observado a homogeneidade entre os indivíduos (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Número de fragmentos totais e porcentagem de fragmentos monomórficos em 20 plantas regeneradas *in vitro* de *A. comosus* var. *comosus* nas seis combinações de enzima/iniciador estudadas.

<b>Combinação enzima/iniciador</b>	<b>Número de fragmentos</b>	<b>Porcentagem de fragmentos monomórficos</b>
Eco RI + AAT / MseI + CAT	16	100
EcoRI + AAT / MseI + CAA	14	100
Eco RI + AAT / MseI + CTT	11	100
Eco RI + AAT / MseI + CAG	13	100
Eco RI + AAT / MseI + CTG	13	100
Eco RI + AAT / MseI + CTC	14	100
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>100</b>

Da mesma forma, a presença do mesmo nível de ploidia entre as 20 plantas analisadas e a planta controle foi observada nos histogramas obtidos pelo citômetro de fluxo. Cada histograma mostrou somente um padrão de pico (G0/G1) e sempre localizado no mesmo ponto do eixo x tendo o “pair gain” fixo (Figura 2). Ressalta-se que o CV% dos picos permaneceu entre 2,8 e 3,3, não ultrapassando o limite de 5% recomendado por Dolezel e Bartos (2005) para este tipo de técnica. Não foram observadas alterações fenotípicas nas características morfológicas associadas ao hábito de crescimento, formato das folhas, presença de espinhos e pigmentação foliar típicos para o genótipo (Figuras 1G-H).

A combinação de técnicas empregadas no presente trabalho indica que plantas de abacaxizeiro regeneradas *in vitro* por meio do protocolo estabelecido por Scherer *et al.* (2013) apresentaram-se homogêneas. Neste sentido, Dujardin (1991) já havia reportado a manutenção do nível de ploidia em plantas micropropagadas de abacaxizeiro, observada através de contagem de cromossomos. No mesmo sentido, Pérez *et al.* (2009) sugeriram que variantes somaclonais em abacaxizeiro, oriundos de diferentes técnicas de micropropagação, são raros. Estes trabalhos reforçam os resultados do presente estudo e permitem a sugestão de que plantas micropropagadas de abacaxizeiro apresentam-se estáveis geneticamente. Sugestões similares quanto à estabilidade genética de plantas micropropagadas foram feitas para *Prunus* sp (Vujovic *et al.*, 2012) e *Vaccinium* sp (Gajdosova *et al.*, 2007),

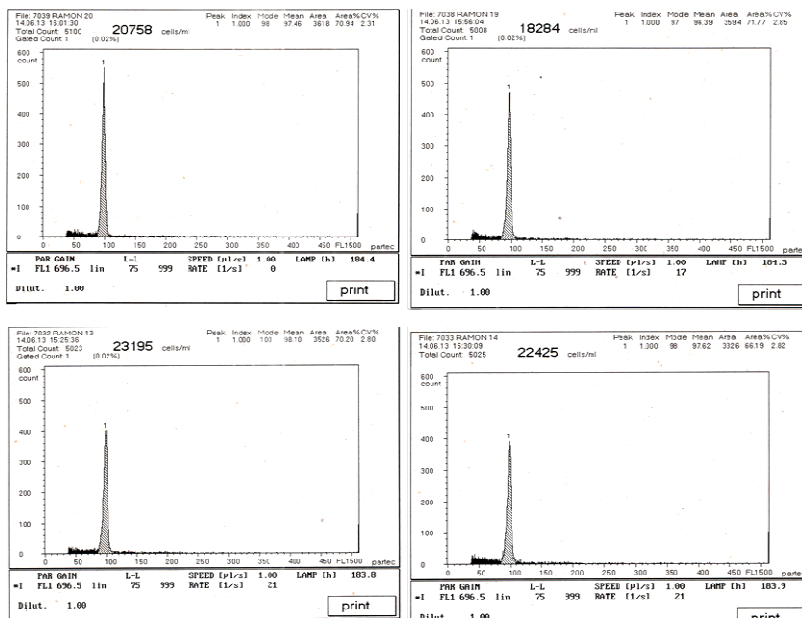
enquanto que Torres-Morán *et al.* (2010) demonstraram a existência de alta instabilidade genética em *Agave tequilana*.

**Tabela 3.** Tamanho de fragmentos amplificados (AFLP) (pb) de plantas regeneradas de abacaxizeiro nas seis combinações de enzima/iniciador estudadas.

<b>Combinação enzima/iniciador</b>	<b>Tamanho dos fragmentos de AFLP (pb)</b>							
EcoRI + AAT / MseI + CAA	70	82	87	88	90	92	98	108
	120	122	138	196	200	236		
EcoRI + AAT / MseI + CAT	106	110	124	132	134	140	146	150
	158	168	180	192	230	332	338	347
EcoRI + AAT / MseI + CTT	71	83	95	98	121	139	154	158
	169	193	295					
EcoRI + AAT / MseI + CAG	86	88	103	105	113	115	144	152
	193	198	343	367	378			
EcoRI + AAT / MseI + CTG	92	95	106	151	156	158	259	266
	289	309	351	386	395			
EcoRI + AAT / MseI + CTC	81	85	96	100	108	111	132	134
	167	236	241	263	268	289		

Um importante fator que pode ter contribuído para a ausência de variantes nas plantas regeneradas de abacaxizeiro neste estudo foi o uso de baixas concentrações de fitorreguladores. Além do que os fitorreguladores utilizados, ANA e BAP, são recorrentes em protocolos de micropropagação na espécie (Guerra *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2009). De acordo com Bairu *et al.* (2011), fitorreguladores, especialmente em altas concentrações, podem induzir a ocorrência de variações somaclonais. Adicionalmente, em um dado protocolo de micropropagação, culturas off-types geralmente apresentam maior desempenho a apenas um determinado ambiente *in vitro* (Wang e Wang, 2012). Assumindo que no presente protocolo a fase de multiplicação de CN é a mais susceptível à indução de off-types, a presença de dois

subsequentes ambientes *in vitro* (diferenciação de CN para microbrotos em SIT-RITA, e crescimento de brotos em SIT-FD), podem ter contribuído para a manutenção da homogeneidade entre os indivíduos.



**Figura 2** - Exemplo de histogramas com os mesmos padrões de picos, representando a homogeneidade da ploidia entre as plantas de *A. comosus* var. *comosus* regeneradas *in vitro* via culturas nodulares e a planta controle.

Uma revisão sobre fidelidade genética em diversas espécies (Bairu *et al.*, 2011) mostrou que não há uma clara relação entre rotas morfogenéticas *in vitro*, diretas ou indiretas, e o aumento da frequência de variantes somaclonais. Neste sentido, Gao *et al.* (2010) reportaram a manutenção da fidelidade genética de *Freesia hybrida* a partir de embriogênese somática direta e indireta e de diferentes fontes de explantes. Benicci *et al.* (2004) observaram em *Foeniculum vulgare* que plantas regeneradas por meio das rotas de organogênese e embriogênese somática, utilizando diferentes fitorreguladores, mantiveram a estabilidade genética. Kosky *et al.* (2002) reportaram a fidelidade genética de plantas de *Musa* spp. regeneradas por embriogênese somática, enquanto que Bairu *et al.* (2006) mostraram a ocorrência de

altas frequências de variação somaclonal para este mesmo gênero de plantas quando regeneradas por meio de um protocolo via organogênese. Currais *et al.* (2013) relataram altas frequências de variação somaclonal em culturas celulares de *Cyphomandra betaceae* cultivadas por vários ciclos de multiplicação e o aumento da variação ao longo do tempo. Enquanto que Rodriguez-López *et al.* (2010) reportaram a diminuição na taxa de variantes somaclonais de *Theobroma cacao* ao longo dos tempos de cultivo por meio da rota de embriogênese somática.

A divergência relatada entre diversos trabalhos, incluindo os resultados do presente estudo, quanto o que leva a plantas micropropagadas a apresentarem variações somaclonais, ou não, reforçam a sugestão de Gao *et al.* (2010) de que variações somaclonais não estão necessariamente relacionadas a rota regenerativa empregada, seja ela direta ou indireta. Desta maneira, pode ser sugerido que o que leva a plantas micropropagadas a apresentarem, ou não, variação somaclonal esta mais associado ao genótipo da planta (entre e dentro de espécies) (Torres-Morán *et al.*, 2010; Bairu *et al.*, 2011), o tipo de explante utilizado na inoculação *in vitro* (Gao *et al.*, 2010) e as condições do ambiente *in vitro*. Neste caso, o ambiente *in vitro* poderia estar relacionado com os tipos e concentrações de fitorreguladores (Bairu *et al.*, 2006), consistência e sistema de imersão do meio de cultura (Feuser *et al.*, 2003), número de subcultivos e idade da cultura *in vitro* (Bairu *et al.*, 2006; Currais *et al.*, 2013) e, finalmente, a rota regenerativa empregada (Phillips *et al.*, 1994).

#### 4.4. Conclusões

Em resumo, o presente trabalho demonstrou uma dinâmica nos NMDG durante a multiplicação de CN e durante a diferenciação de CN para microbrotos em culturas *in vitro* de abacaxizeiro. Esta dinâmica pode estar relacionada à densidade de novos meristemas apicais de brotos, ao incremento de massa fresca e à idade de cada subcultivo. Ressaltam-se também as altas porcentagens nos NMDG observadas nas duas fases. Embora estas características relacionadas aos NMDG tenham sido observadas, avaliações baseadas em AFLP, níveis de ploidia analisados por citometria de fluxo e análises morfológicas indicaram a homogeneidade das plantas regeneradas. Com base nestes resultados, sugere-se que há indícios de que o protocolo de micropropagação de abacaxizeiro baseado em CN associadas a sistemas

de imersão temporária pode ser utilizado para a produção em larga escala de plantas de abacaxizeiro. Com base em nosso conhecimento, esta é a primeira divulgação científica que associa os NMDG de culturas *in vitro* com análises de fidelidade genética acessadas por meio de AFLP, nível de ploidia e características morfológicas das plantas regeneradas. Estudos futuros relacionados às análises de genes específicos, assim como, a avaliação da fidelidade genética das plantas regeneradas após vários subcultivos na fase de multiplicação de CN, podem gerar informações relevantes e complementares aos resultados do presente estudo.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM)/UFSC por disponibilizar o uso do citômetro de fluxo. Os autores também agradecem CAPES, CNPq, FAPESC e UFSC pelas bolsas de estudo, bolsas de pesquisa e suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

### **Referências**

- Bairu MW, Fennell CW, van Staden J (2006) The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci Hortic - Amsterdam* 108:347-351.
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147-173.
- Be LV, Debergh PC (2006) Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*). *S Afr J Bot* 72:191-194.
- Birchler JA (2009) Ploidy variation in plants. In: *Encyclopedia of life sciences*. Wiley Ltd, Chichester. <http://www.els.net> doi:10.1002/9780470015902.a0002017.pub2
- Bennici A, Anzidei M, Vendramin GG (2004) Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci* 166: 221-227.
- Choi CS, Sano H (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* 277:589-600.
- Collins JL (1933) Morphological and cytological characteristics of triploid pineapples. *Cytologia* 4: 248-256.

- Coppens d'Eeckenbrugge G, Duval M-F (2009) The domestication of pineapple: context and hypotheses. *Pineapple News* Volume 16: 15-27.
- Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell Tiss Org* 114(2): 149-159.
- Dal Vesco LL, Guerra MP (2010) *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. *Sci Hortic - Amsterdam* 125:748-755.
- Dal Vesco LL, Stefenon VM, Welter LJ, Scherer RF, Guerra MP (2011) Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. *Sci Hortic - Amsterdam* 128:515-522.
- Dolezel J, Bartos J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot – London* 95:99-110.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dujardin M (1991) Cytogénétique de l'ananas. *Fruits* 46:376-379.
- Dyachenko OV, Zakharchenko NS, Shevchuk TV, Bohnert HJ, Cushman JC, Buryanov YaI (2006) Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. *Biochemistry-US* 71 (4):461-465.
- Feuser S, Meler K, Daquinta M, Guerra MP, Nodari RO (2003) Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell Tiss Org* 72:221-227.
- Finnegan EJ (2010) DNA Methylation: a Dynamic Regulator of Genome Organization and Gene Expression in Plants. In: Pau EC, Davey MR (eds) *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Dordrecht, Netherlands: Springer-Verlag p.295-323.
- Fraga HPF, Vieira LN, Caprestano CA, Steinmacher DA, Micke GA, Spudeit DA, Pescador R, Guerra MP (2012) 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep* 31(12):2165-76.
- Furner IJ, Matzke M (2011) Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. *Curr Opin Plant Biol* 14:137-141.



- Gajdosova A, Ostrolucka MG, Libiakova G, Ondruskova E (2007) Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idea* L. In: Jain SM, Haggman H (eds) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Berlin, Germany: Springer p. 457-464.
- Gao X, Yang D, Cao D, Ao M, Sui X, Wang QM, Kimatu JN, Wang L (2010) *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. *J Plant Growth Regul* 29:257-267.
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Pescador R, Schuelter AR, Nodari RO (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesqui Agropecu Bras* 34:1557-1563.
- Guo WL, Wu R, Zhang Y F, Liu XM, Wang HY, Gong L, Zhang ZH, Liu B (2007) Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. *Plant Cell Rep* 26:1297-1307.
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43:179-188.
- Kerns K, Collins JL (1947) Chimeras in the pineapple. *J Hered* 38: 322-330.
- Kosky RG, Silva MDF, Perez LP, Gilliard T, Martinez FB, Vega MR, Milian MC, Mendoza EQ (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell Tiss Org* 68:21-26.
- Lauria M, Rossi V (2011) Epigenetic control of gene regulation in plants. *BBA-Gene Regul Mech* 1809:369-378.
- MAPA (BRASIL. Ministério da Agricultura). Instrução Normativa nº 22 de 27 de Agosto de 2012. Normas para a Produção e a Comercialização de Mudas e de Outras Estruturas de Propagação Obtidas por meio de Cultura de Tecidos de Plantas. Diário Oficial da União nº 167, de 28 de Agosto de 2012, Seção 1, p. 2.
- Mehta R, Sharma V, Sood A, Sharma M, Sharma RK (2011) Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of *in vitro*-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall., using AFLP markers. *Eur J Forest Res* 130:729-736.
- Menéndez-Yuffa A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H (2010) A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from

- seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss Org* 102: 297-307.
- Morel GM, Wetmore RH (1951) Tissue culture of monocotyledons. *Am J Bot* 38:138-140.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497.
- Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep* 31:597-620.
- Ochatt, SJ (2008) Flow cytometry in plant breeding. *Cytom Part A* 73:581-598.
- Perez G, Yanes E, Isidron M, Lorenzo JC (2009) Phenotypic and AFLP characterization of two new pineapple somaclones derived from *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Org* 96:113-116.
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *P Natl Acad Sci USA* 91:5222-5226.
- Rambaud C, Arnoult S, Bluteau A, Chantal Mansard M, Blassiau C, Brancourt-Hulmel M (2013) Shoot organogenesis in three *Miscanthus* species and evaluation for genetic uniformity using AFLP analysis. *Plant Cell Tiss Org* 113: 437-448.
- Rani V, Raina SN (2000) Genetic fidelity of organized meristems derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell Dev - Pl* 36:319-330.
- Rodríguez-López CM, Wetten AC, Wilkinson MJ (2010) Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *New Phytol* 186:856-868.
- Scherer RF, Garcia AC, Fraga HPF, Dal Vesco LL, Steinmacher DA, Guerra MP (2013) Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Sci Hortic - Amsterdam* 151:38-45.
- Smulders MJM, De Klerk GJ (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul* 63:137-146.
- Stefenon VM, Gailing O, Finkeldey R (2007) Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for the in situ conservation of genetic resources. *Plant Biol* 9: 516-525.

- Teixeira J, Cruz ARR, Ferreira FR, Cabral JR (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 3:42-47.
- Torres-Morán MI, Escoto-Delgadillo M, Molina-Moret S, Rivera-Rodríguez DM, Velasco-Ramírez AP, Infante D, Portillo, L (2010) Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Org* 103:403-409.
- Vujović T, Cerovic R, Ruzic D (2012) Ploidy level stability of adventitious shoots of sour cherry ‘Cacanski Rubin’ and Gisela 5 cherry rootstock. *Plant Cell Tiss Org* 111:323-333.
- Wang QM, Wang L (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Rep* 31:1535-1547.
- Zluvova J, Janousek B, Vyskot B (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J Exp Bot* 52:2265-2273.
- Zhu J, Kapoor A, Sridhar VV, Agius F, Zhu JK (2007) The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 17:54-59.

Capítulo V

**FIDELIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE ABACAXIZEIRO  
CULTIVADAS POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE  
REGENERAÇÃO**

## FIDELIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE ABACAXIZEIRO CULTIVADAS POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERAÇÃO

**Resumo:** A produção massiva de mudas micropropagadas em laboratórios biofábricas vem aumentando expressivamente no mundo e no Brasil, especialmente para espécies propagadas vegetativamente, tais como o abacaxizeiro. Entretanto, de acordo com a instrução normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº22/2012, a porcentagem de plantas apresentando variação somaclonal por lote comercializado em biofábricas deve ser de no máximo 5%. Assim, no presente trabalho, objetivou-se avaliar a fidelidade genética por meio da análise de características morfológicas de plantas regeneradas via organogênese convencional em imersão permanente e via culturas nodulares (CN) associadas a sistemas de imersão temporária. No protocolo via organogênese convencional estudaram-se dois genótipos do abacaxizeiro comercial ‘Pérola’ (*A. comosus* var. *comosus*) e outro de *A. comosus* var. *bracteatus*. No protocolo via CN estudaram-se dois genótipos de abacaxizeiro comercial: um diplóide (‘Pérola’) e outro triplóide (‘Gigante de Tarauacá’). Foram avaliadas plantas regeneradas derivadas de 15 subcultivos sob o protocolo via organogênese convencional e de 7 subcultivos sob o protocolo via CN. Plantas jovens foram avaliadas a partir de características morfológicas como o hábito de crescimento, alterações no formato das folhas, presença de espinhos e variação, e em plantas adultas avaliou-se também a morfologia floral e de frutos. Durante os 15 subcultivos sob o protocolo de organogênese convencional apenas uma planta de *A. comosus* var. *comosus* apresentou variação morfológica (0,23%), enquanto que nas plantas de *A. comosus* var. *bracteatus* observaram-se seis plantas (1,26%) distribuídas em cinco subcultivos, sendo que o primeiro subcultivo deste genótipo apresentou mais de 5% de plantas com variações morfológicas. Estes resultados sugerem que, no protocolo via organogênese convencional, os genótipos de *A. comosus* var. *bracteatus* apresentem uma maior susceptibilidade à variação somaclonal quando comparado aos genótipos do abacaxizeiro comercial. Neste sentido, plantas do abacaxizeiro comercial micropropagadas via CN não apresentaram variações morfológicas visíveis. Em resumo, plantas de *A. comosus* var. *comosus* regeneradas via organogênese

convencional e via CN mostraram-se estáveis e se mantiveram dentro do limite de variantes somaclonais tolerados pelo MAPA.

**Palavras-chave:** Organogênese convencional, culturas nodulares, sistema de imersão, características morfológicas.

**Abstract:** The massive plantlets production in biofactories has been increasing expressively in Brazil and in the world, especially for vegetatively propagated species, such as pineapple. However, according with the normative instruction of Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) nº22/2012, the percentage of somaclonal variation in the micropropagated plants must be a maximum of 5%. Thus, in the present study it was evaluated the genetic fidelity through morphological characteristics of regenerated plants via conventional organogenesis and via nodule cluster cultures (NC). In the protocol via conventional organogenesis it were studied two genotypes of ‘Pérola’ (*Ananas comosus* var. *comosus*), and one of *Ananas comosus* var. *bracteatus*. In the protocol via NC, it were studied two genotypes of commercial pineapple (*A. comosus* var. *comosus*): one diploid (‘Pérola’) and another triploid (‘Gigante de Tarauacá’). In the protocol via conventional organogenesis it were evaluated plants from 15 subcultures, and in the protocol via NC it were evaluated plants from 7 subcultures. The evaluated morphological characteristics in young plants were: plant growth habit, changes in the shape of leaves, presence of thorns, and leaf pigmentation; and in adult plants the morphology of inflorescence and of infructescence were also evaluated. In the protocol via conventional organogenesis just a plant of *A. comosus* var. *comosus* (0,23%) showed variation of morphological characteristics, while plants of *A. comosus* var. *bracteatus* showed variation of morphological characteristics in six plants of five subcultures (1,26%), being that the first subculture of this genotype presented more than 5% of variant plants. These results suggest that, in micropropagation via conventional organogenesis, the genotypes of *A. comosus* var. *bracteatus* is more susceptible to somaclonal variation when compared to the genotypes of commercial pineapple. In the same way, commercial pineapple plants regenerated via NC associated with temporary immersion systems didn’t exhibited variations in the morphological characteristics. In conclusion, *A. comosus* var. *comosus* plants regenerated via conventional organogenesis and via NC remained within the somaclonal variation limit tolerated by the MAPA.

**Keywords:** conventional organogenesis, nodule cluster cultures, immersion systems, morphological characteristics.

### 5.1. Introdução

A Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nº 22/2012 tem como objetivo “Estabelecer as Normas para a Produção e a Comercialização de Mudanças e de Outras Estruturas de Propagação obtidas por meio de Cultura de Tecidos de Plantas” no Brasil. Recomenda-se a micropropagação comercial de plantas propagadas vegetativamente, tais como plantas frutíferas e plantas produtoras de tubérculos e raízes tuberosas. Neste sentido, países em desenvolvimento apresentam diversos exemplos de impactos sócio-ambientais positivos que estão relacionados à produção em larga escala de plantas micropropagadas por biofábricas (Sonnino *et al.*, 2009).

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) atualmente é uma das principais fruteiras tropicais no mercado global (FAO, 2014). No final da primeira década deste século o comércio global do abacaxi atingiu 2 bilhões de dólares anuais, apresentando claro potencial para um maior crescimento (Reinhardt e Rodriguez, 2009).

Um dos gargalos da cadeia produtiva do abacaxizeiro encontra-se associado ao uso de propágulos de baixa qualidade fitossanitária (Be e Debergh, 2006). Desta forma, o abacaxizeiro se enquadra no grupo das frutíferas propagadas vegetativamente nas quais a produção de mudas via micropropagação é recomendada (Sonnino *et al.* 2009). Neste sentido, encontram-se descritos e disponíveis diversos protocolos baseados na rota regenerativa de organogênese convencional para *A. comosus*. Contudo, mudas produzidas por esta técnica ainda apresentam altos custos quando comparadas às mudas obtidas por propagação convencional (Teixeira *et al.*, 2001; Be e Debergh, 2006). Assim, Guerra *et al.* (1999) estabeleceram um protocolo de micropropagação via organogênese convencional em meio de cultura líquido e sistema de imersão permanente com alta eficiência regenerativa quando comparado a outros protocolos similares. Mais recentemente, Scherer *et al.* (2013) desenvolveram um novo protocolo de micropropagação para esta espécie baseado em culturas nodulares (CN) associadas a sistemas de imersão temporária e que apresenta elevada taxa regenerativa quando comparado a outros protocolos de micropropagação do abacaxizeiro. Culturas Nodulares são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde-clara com textura friável (Dal Vesco e Guerra, 2010).

Além da eficiência regenerativa um protocolo de micropropagação deve produzir mudas que mantêm a fidelidade genética da planta matriz, tendo se estabelecido, de acordo com a Instrução Normativa do MAPA nº 22/2012, um limite máximo de 5% de variações somaclonais em cada lote de mudas comercializado.

Variações somaclonais referem-se às variações fenotípicas, de origens genéticas e/ou epigenéticas, que ocorrem em plantas micropropagadas quando comparadas com a planta matriz (Smulder e de Klerk, 2011; Wang e Wang, 2012). Acredita-se que o que leva a plantas micropropagadas a apresentarem, ou não, variação somaclonal esta associado ao genótipo da planta (Torres-Morán *et al.*, 2010; Bairu *et al.*, 2011), o tipo de explante utilizado na inoculação *in vitro* (Gao *et al.*, 2010) e as condições do ambiente *in vitro*. Neste caso, o ambiente *in vitro* está relacionado com os tipos e concentrações de fitorreguladores (Bairu *et al.*, 2006), consistência e sistema de imersão do meio de cultura (Feuser *et al.*, 2003), número de subcultivos e idade da cultura *in vitro* (Bairu *et al.*, 2006; Currais *et al.*, 2013) e, finalmente, a rota regenerativa empregada (Phillips *et al.*, 1994).

Características morfológicas são altamente relacionadas com os fatores ambientais, mesmo assim, de acordo com Bairu *et al.* (2011), uma das formas mais efetivas de avaliar a fidelidade genética em plantas totalmente estabelecidas, seja em casa de vegetação ou em campo, é por meio de características morfológicas. Em plantas jovens, normalmente os aspectos morfológicos observados nas plantas são: a estatura e o hábito de crescimento das plantas, e a morfologia e a pigmentação foliar (Menéndez-Yuffa *et al.*, 2010; Bairu *et al.*, 2011). Enquanto que em plantas adultas, além destas características, observam-se também as características dos órgãos reprodutivos (Collins e Kerns, 1938).

Assim, o presente estudo objetivou avaliar a fidelidade genética, por meio da análise de características morfológicas, de plantas jovens e adultas de abacaxizeiros propagadas sob um protocolo via organogênese convencional (Guerra *et al.* (1999)) e sob o protocolo via CN associadas a sistemas de imersão temporária (Scherer *et al.*, 2013).

## 5.2. Material e Métodos

Plantas foram micropropagadas e aclimatizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV)/UFSC. O plantio definitivo (em campo) foi realizado na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC. Tanto o LFDGV quanto a Fazenda Experimental



da Ressacada localizam-se em Florianópolis (27° 35' 49'' S, 48° 32' 58'' O).

Em todos os experimentos de micropropagação se utilizou o meio de cultura básico (MSB) constituído pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1963), vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951) e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5 antes da autoclavagem por 20 min a 121°C e 1,1 Kgf.cm<sup>-2</sup>. No protocolo via organogênese convencional estudaram-se dois genótipos de *A. comosus* var. *comosus* (cultivar Pérola) e um genótipo de *A. comosus* var. *bracteatus*. No protocolo via CN associadas a sistemas de imersão temporária estudaram-se dois genótipos de *A. comosus* var. *comosus*, um cultivar diplóide (Pérola) e outro triplóide (Gigante de Tarauacá).

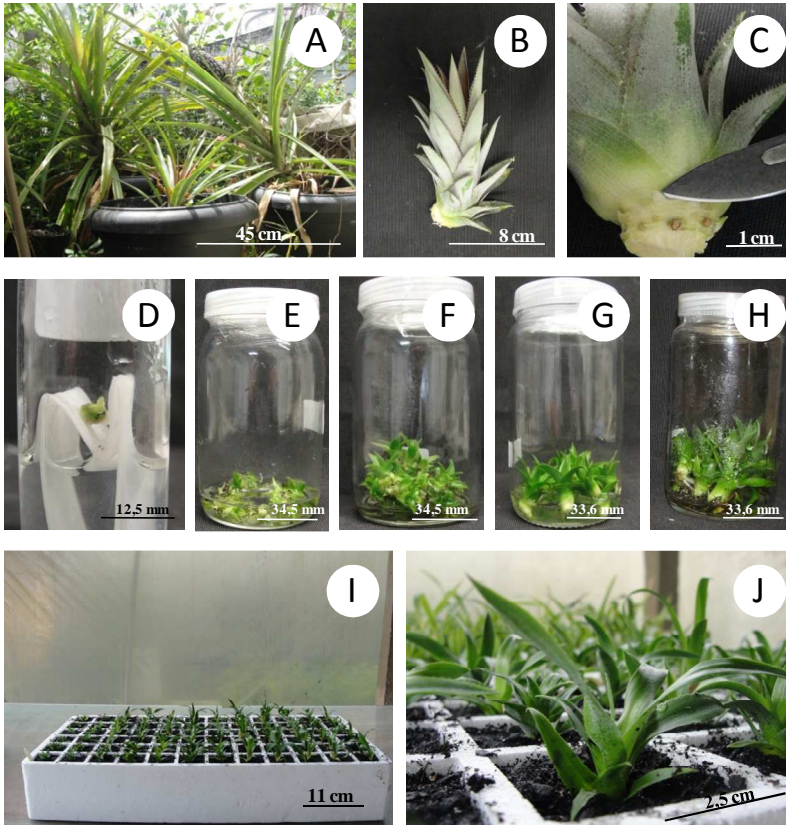
#### 5.2.1. Micropropagação via organogênese convencional

Os três genótipos foram micropropagados seguindo o protocolo de Guerra *et al.* (1999) (Figura 1). Cada genótipo teve uma única planta matriz, tendo gemas axilares como explantes (Figuras 1A-C). Elas foram inoculadas sobre pontes de papel filtro em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MSB líquido suplementado com 2 µM de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 4 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) (Figura 1D). Após as brotações das gemas, culturas em multiplicação foram transferidas para frascos de vidro (69 x 121,7 mm / 350 mL) contendo 25 mL do mesmo meio usado na inoculação, formando os frascos de multiplicação (Figura 1E-F). A cada 4 semanas as brotações eram subcultivadas e brotos com altura superior a 2 cm eram transferidos para a fase de crescimento em frascos de vidro (67,2 x 129,3 mm / 350mL) com 25 ml de MSB líquido (Figura 1G-H) e o restante das culturas eram transferidas para novos frascos de multiplicação. Brotos de cada um dos 15 subcultivos permaneciam cerca de 4 semanas na fase de crescimento e então eram aclimatizados em bandejas de isopor (72 células) com mistura (1:1) de casca de arroz carbonizada e substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças (Vida Verde, Mogi-Mirim, SP, Brasil) (Figura 1I-J).

#### 5.2.2. Micropropagação via CN associadas a sistemas de imersão temporária

Os dois genótipos foram micropropagados seguindo o protocolo de Scherer *et al.* (2013), adicionando melhorias divulgadas em Scherer

*et al. (in press)* e Scherer *et al. (online first)*. Cada genótipo teve uma única planta matriz, tendo gemas axilares como explantes.



**Figura 1** – Protocolo de micropropagação de abacaxizeiro via organogênese convencional baseado em Guerra *et al.* (1999). A) Plantas matrizes em vasos de 50 L; B) muda de planta matriz; C) excisão do explante (gema axilar); D) brotação de gema axilar sobre ponte de papel filtro inoculada em tubo de ensaio; E) frasco de multiplicação de brotos recém inoculado; F) frasco de multiplicação de brotos após 4 semanas de desenvolvimento; G) frasco de crescimento de brotos recém inoculado; H) frasco de crescimento de brotos após 4 semanas; I-J) brotos recém aclimatizados em bandejas de isopor.

Culturas nodulares induzidas em organogênese convencional sob o protocolo de Guerra *et al.* (1999) foram coletadas na terceira repicagem

(Figura 2A). Em seguida, 5g de massa fresca (MF) de CN foram inoculadas em frascos de cultivo (69 x 121,7 mm / 350 mL) em sistema de imersão temporária por frascos duplos (SIT-FD) contendo 50 mL de MSB suplementado com 2  $\mu$ M ANA e 2  $\mu$ M BAP, formando os frascos de multiplicação de CN (Figura 2B-C). A cada 4 semanas estes frascos eram subcultivados, sendo que cerca de 5 g de MF de CN eram utilizadas para formar novos frascos de multiplicação de CN e cerca de 3,3 g de MF de CN eram inoculadas em aparatos RITA<sup>®</sup> contendo 200 mL de MSB suplementado com 2  $\mu$ M de ANA e 2  $\mu$ M de BAP, formando a fase de diferenciação de CN para microbrotos (Figura 2D-F). Após 4 semanas nesta fase, cerca de 5 g de microbrotos eram inoculados em garrafas PET de 5 L sob sistema de imersão temporária por frascos duplos contendo 1 L de MSB líquido, formando a fase de crescimento de brotos (Figura 2G-H). Desta forma, cada um dos 7 subcultivos estudados permaneciam cerca de 12 semanas na fase de crescimento, e então plantas de cada subcultivo eram aclimatizadas em bandejas de isopor (72 células) com mistura (1:1) de casca de arroz carbonizada e substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças (Vida Verde) (Figura 2I-J).

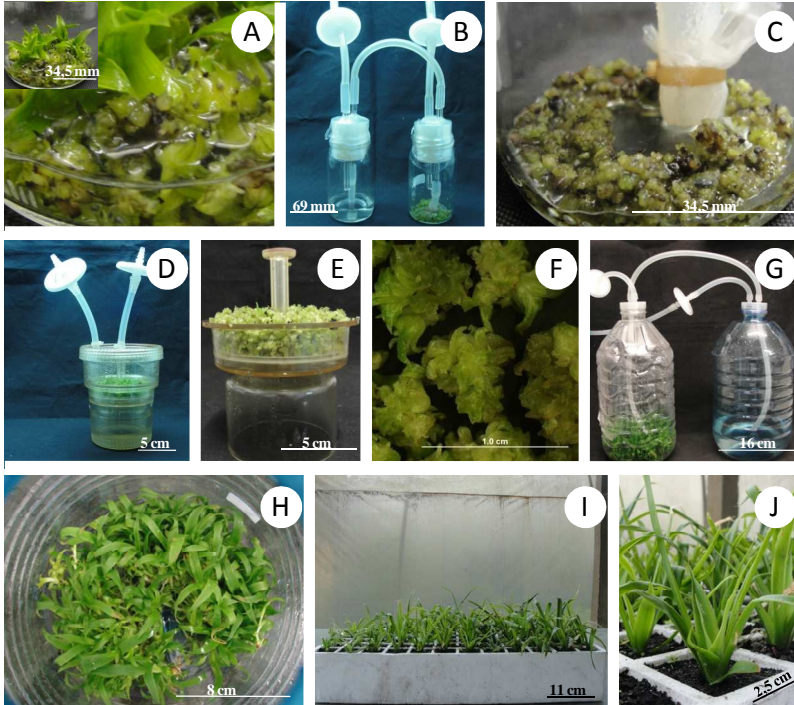
### *5.2.3. Plantio na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC*

Todas as mudas permaneciam nas bandejas em casa de vegetação até atingirem cerca de 15 cm de altura (região do colo até a ponta da maior folha) (Figura 3A), e então 30 plantas de cada genótipo eram plantadas na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC (Figura 3B-C). A ausência de controle de temperatura e de fotoperíodo na casa de vegetação e a época de transplante das mudas apenas nos meses considerados mais quentes, de setembro a abril, fez com que o tempo de permanência das mudas nas bandejas tenha variado de 4 a 7 meses, tanto para as plantas regeneradas via organogênese convencional quanto para as regeneradas via CN.

### *5.2.4. Avaliação da fidelidade genética através de observações de características morfológicas*

As diferentes épocas de plantio geraram plantas em diferentes estádios fenológicos na época da avaliação. Plantas jovens foram avaliadas a partir de características morfológicas como o hábito de crescimento, alterações no formato das folhas, presença de espinhos e

variegação, e em plantas adultas avaliou-se também a morfologia floral e de frutos.

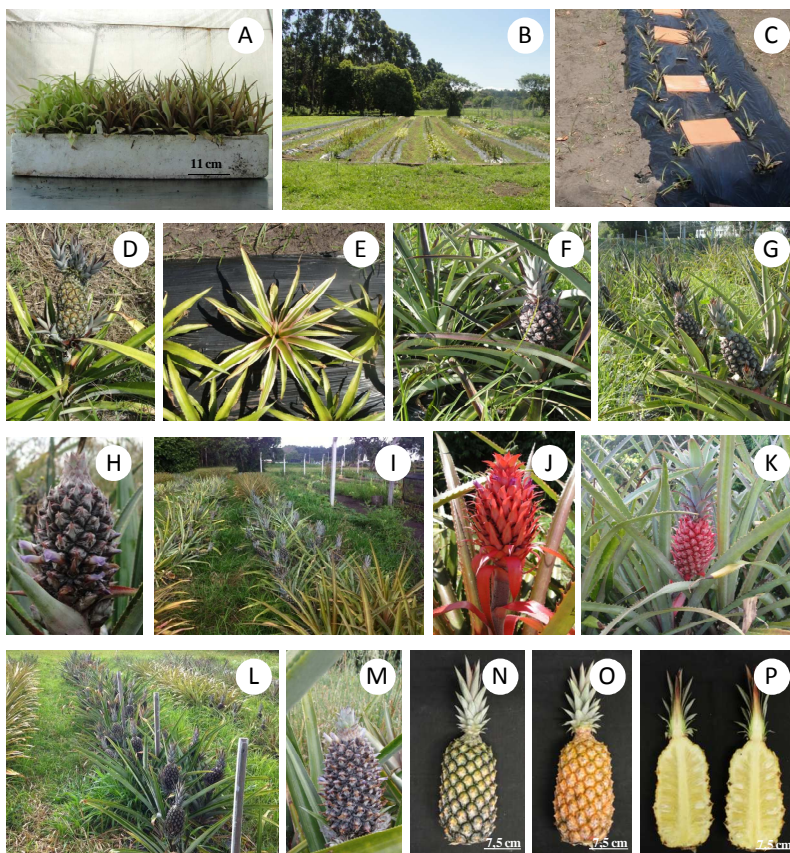


**Figura 2.** Protocolo de micropropagação de abacaxizeiro via culturas nodulares (CN) associadas a sistemas de imersão temporária. A) Culturas nodulares induzidas em organogênese convencional sob o protocolo de Guerra *et al.* (1999); B) frascos de multiplicação de CN em sistema de imersão temporária por frascos duplos; C) culturas nodulares em frascos de multiplicação de CN; D) diferenciação de CN em microbrotos em biorreator RITA; E-F) microbrotos formados em biorreator RITA; G) crescimento de brotos em sistema de imersão temporária por frascos duplos usando garrafas PET de 5 L; H) brotos formados na fase de crescimento de brotos; I-J) brotos recém aclimatizados em bandejas de isopor de 72 células.

### 5.2.5. *Plantio em unidades de observação.*

Os estudos descritos nos subitens anteriores geraram mais mudas do que foram utilizadas para as avaliações na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC. Assim, o excedente de milhares de mudas foi

utilizado para a formação de unidades de observação em estudos aplicados à pequena agricultura familiar nos estados do Rio Grande do Sul, Rondônia e Santa Catarina, em projetos de desenvolvimento nos quais o LFDGV/UFSC estava inserido. Além destas mudas excedentes, genótipos locais dos três estados também foram coletados após seleção massal e micropropagados por meio dos dois protocolos já descritos. Da mesma forma, as plantas regeneradas destes genótipos locais foram utilizadas para a formação de unidades de observação.



**Figura 3.** Plantio de mudas e desenvolvimento de plantas na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC. A) Mudas aclimatizadas e desenvolvidas em bandejas de isopor de 72 células; B) área de cultivo de abacaxizeiro; C) mudas regeneradas *in vitro* recém plantadas; D) *A. comosus* var. *comosus* apresentando

variação morfológica na infrutescência; E) *A. comosus* var. *bracteatus* com folhas variegadas; F-G) plantas jovens e adultas regeneradas via CN associadas a sistemas de imersão temporária, ‘Gigante de Tarauacá’ e Pérola, respectivamente; H) inflorescência de *A. comosus* var. *comosus*; I) plantas adultas de *A. comosus* var. *comosus* regeneradas via organogênese convencional; J-K) inflorescência e fruta de *A. comosus* var. *bracteatus*; L) coleção de germoplasma de genótipos, Pérola, tradicionais; M-P) inflorescência e infrutescência do abacaxi crioulo catarinense.

### 5.3. Resultados e discussão

Nas plantas micropropagadas via organogênese convencional, enquanto um dos genótipos de abacaxizeiro comercial não apresentou variações morfológicas, o outro genótipo apresentou uma planta com variações na coroa da infrutescência (3,33 % no 7º subcultivo) (Figura 3D). Já o genótipo de *A. comosus* var. *bracteatus* apresentou plantas com variação foliar (Figura 1E) em cinco subcultivos. Os subcultivos 3º, 5º, 13º e 15º apresentaram variações entre 3 e 4% das plantas e o 1º subcultivo apresentou 6,67% de plantas variegadas (Tabela 1).

Para a variação observada em um dos genótipos do abacaxizeiro comercial, tanto a taxa de variação no sétimo subcultivo (3,33%) quanto à taxa média nos 15 subcultivos pelos quais o genótipo foi avaliado (0,23%), estão abaixo do limite imposto pelo MAPA. Porém, nos estudos com o genótipo de *A. comosus* var. *bracteatus*, se o 1º subcultivo representasse um lote para comercialização de uma biofábrica ele estaria fora do padrão exigido, uma vez que apresentou uma taxa de 6,67% de variantes. Entretanto, quando se observa a taxa média dos 15 subcultivos pelos quais o genótipo de *A. comosus* var. *bracteatus* foi analisado as variações são de 1,26% e também ficam abaixo do limite imposto pelo MAPA.

A variação encontrada na infrutescência da planta de *A. comosus* var. *comosus* se enquadra na definição de variações morfológicas deste estudo e poderia inviabilizar a comercialização daquela infrutescência.

**Tabela 1-** Desenvolvimento de plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* (Cultivar Pérola, genótipos MAR e JSG) e de *A. comosus* var. *bracteatus* (genótipo BIT) regeneradas via organogênese convencional em plantio definitivo na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC. Número total de plantas, época de plantio, número de plantas jovens, adultas e mutantes, assim como a porcentagem de plantas mutantes estão indicados para cada genótipo nos diferentes subcultivos realizados, representados pelo numeral romano que segue a indicação do genótipo.

<b>Genótipo / Subcultivo</b>	<b>Transferência a campo</b>	<b>nº total de plantas</b>	<b>nº de plantas adultas</b>	<b>nº de plantas jóvens</b>	<b>nº de plantas mutantes</b>	<b>(%) mutantes</b>
MAR I	dez 12 - jan 13	29	26	3	0	0
BIT I	dez 12 - jan 13	30	0	30	2	6.67
JSG I	dez 12 - jan 13	21	21	0	0	0
MAR II	dez 12 - jan 13	30	29	1	0	0
BIT II	dez 12 - jan 13	30	2	28	0	0
JSG II	dez 12 - jan 13	29	26	3	0	0
MAR III	dez 12 - jan 13	19	12	7	0	0
BIT III	dez 12 - jan 13	29	0	29	1	3.45
JSG III	dez 12 - jan 13	29	24	5	0	0
MAR IV	fevereiro - abril 13	29	25	4	0	0
BIT IV	fevereiro - abril 13	30	0	30	0	0
JSG IV	fevereiro - abril 13	30	19	11	0	0
MAR V	fevereiro - abril 13	29	18	11	0	0
BIT V	fevereiro - abril 13	29	0	29	1	3.45
JSG V	fevereiro - abril 13	30	14	16	0	0
MAR VI	fevereiro - abril 13	30	25	5	0	0
BIT VI	fevereiro - abril 13	30	0	30	0	0
JSG VI	fevereiro - abril 13	28	10	18	0	0
MAR VII	setembro -- 2013	29	17	12	0	0
BIT VII	setembro -- 2013	30	0	30	0	0
JSG VII	setembro -- 2013	30	28	2	1	3.33
MAR VIII	setembro -- 2013	28	24	5	0	0
BIT VIII	setembro -- 2013	30	0	30	0	0
JSG VIII	setembro -- 2013	30	27	3	0	0
MAR IX	setembro -- 2013	30	9	21	0	0
BIT IX	setembro -- 2013	30	0	30	0	0
JSG IX	setembro -- 2013	30	3	27	0	0
MAR X	setembro -- 2013	30	13	17	0	0
BIT X	setembro -- 2013	29	0	29	0	0
JSG X	setembro -- 2013	29	4	25	0	0
MAR XI	nov 2013-março 2014	29	0	29	0	0
BIT XI	nov 2013-março 2014	30	0	30	0	0
JSG XI	nov 2013-março 2014	28	0	28	0	0
MAR XII	nov 2013-março 2014	28	0	28	0	0
BIT XII	nov 2013-março 2014	29	0	29	0	0
JSG XII	nov 2013-março 2014	30	0	30	0	0
MAR XIII	nov 2013-março 2014	29	0	29	0	0
BIT XIII	nov 2013-março 2014	30	0	30	1	3.33
JSG XIII	nov 2013-março 2014	29	0	29	0	0
MAR XIV	nov 2013-março 2014	28	0	28	0	0
BIT XIV	abril -- 2014	30	0	30	0	0
JSG XIV	abril -- 2014	29	0	29	0	0
MAR XV	abril -- 2014	30	0	30	0	0
BIT XV	abril -- 2014	30	0	30	1	3.33
JSG XV	abril -- 2014	27	0	27	0	0
<b>Total</b>		<b>1302</b>	<b>376</b>	<b>927</b>	<b>7</b>	



Sendo assim, para este estudo, ela foi considerada uma variação somaclonal. Porém, ela pode ser resultado de uma eventual quebra de dominância apical da coroa ocasionada por algum fator ambiental. A hipótese de uma modificação ocasionada apenas por um fator ambiental é reforçada uma vez que este tipo de variação não foi descrito por Collins e Kerns (1938) no estudo em que estes autores descreveram mais de 30 mutações em abacaxizeiro.

Variegações ocorrem quando folhas ou órgãos vegetais apresentam setores com colorações diferentes da coloração específica. Normalmente estes setores são brancos ou amarelos devido a deficiências na produção de clorofila e/ou carotenóides (Rodermel, 2002). Collins e Kerns (1938) descreveram esta variação em folhas de abacaxizeiro com o nome de “*Streak Chlorophyl*”. De acordo com Souza *et al.* (2012) a variegação em abacaxizeiros é uma característica desejável para ornamentação. Mesmo assim, de acordo com a Instrução Normativa do MAPA nº22/2012, se em uma biofábrica um lote de plantas regeneradas oriundas de uma planta matriz não variegada apresentar mais de 5% de plantas variegadas, ele não estará apto para a comercialização.

Nas plantas micropropagadas sob o protocolo de CN associadas a sistemas de imersão temporária nenhum indivíduo apresentou variações somaclonais (Tabela 2). Entretanto, estas plantas foram transferidas à Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC a partir de setembro de 2013, enquanto as plantas propagadas via organogênese convencional foram plantadas a partir de dezembro de 2012. Assim, há uma maior frequência de plantas adultas do cultivar Pérola propagadas via organogênese convencional, cerca de 43,7%, o que resultou em uma avaliação mais completa da fidelidade genética para as plantas regeneradas por esta via. Porém, todas as plantas oriundas do protocolo via CN associadas a sistemas de imersão temporária que atingiram a fase adulta, cerca de 4,7%, apresentaram morfologias normais (Figura 3F-G).

**Tabela 2-** Desenvolvimento de plantas de *Ananas comosus* var. *comosus* (cultivar diplóide ‘Pérola’, genótipo JSG; e cultivar triplóide ‘Gigante de Tarauacá’, genótipo Tarau) regeneradas via culturas nodulares em plantio definitivo na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC. Número total de plantas, época de plantio, número de plantas jovens, adultas e mutantes, estão indicados para cada genótipo nos diferentes subcultivos realizados, representados pelo numeral arábico que segue a indicação do genótipo.



Genótipo / Subcultivo	Transferência a campo	nº total de plantas	nº de plantas adultas	nº de plantas jovens	nº de plantas mutantes
Tarau 0	setembro -- 2013	28	0	28	0
JSG 0	setembro -- 2013	25	0	25	0
Tarau 1	setembro -- 2013	29	2	27	0
JSG 1	setembro -- 2013	23	7	16	0
Tarau 2	setembro -- 2013	30	7	23	0
JSG 3	setembro -- 2013	15	1	14	0
Tarau 3	setembro -- 2013	30	0	30	0
JSG 6	abril -- 2014	29	0	29	0
Tarau 6	abril -- 2014	30	0	30	0
JSG 7	setembro -- 2014	28	0	28	0
Tarau 7	setembro -- 2014	30	0	30	0
JSG 8	setembro -- 2014	30	0	30	0
Tarau 8	setembro -- 2014	30	0	30	0
TOTAL		357	17	340	0

Fatores que retardam o crescimento vegetativo atuam na promoção do florescimento do abacaxizeiro, porém, as plantas precisam ter uma mínima quantidade de energia armazenada para que o estímulo seja recebido (Rohrbach *et al.*, 2003). Ainda de acordo com estes autores, o período de outono-inverno é o fator que estimula o florescimento em regiões subtropicais, na qual o estado de Santa Catarina se localiza. Por isso, neste estado recomenda-se o plantio do abacaxizeiro (mudas tipo filhote) nos meses de fevereiro e março (Koller, 1981; A. C. Garcia, comunicação pessoal; R. A. Osório, comunicação pessoal). Assim, a planta se acomoda ao novo ambiente até que o período de baixo crescimento vegetativo chegue (outono - inverno). Normalmente, no primeiro outono-inverno a planta ainda é muito pequena para receber o estímulo floral, porém, do fim do primeiro inverno até o outono-inverno seguinte há um considerável crescimento vegetativo, assim, a planta já apresenta uma energia suficiente para receber o estímulo floral, emitindo a inflorescência na primavera e produzindo o fruto na primavera/verão (Tabela 3).

O período de plantio das plantas micropropagadas pelas duas vias regenerativas se estendeu de setembro a abril, iniciando em dezembro de 2012 e finalizando em setembro de 2014. Desta forma, algumas plantas de *A. comosus* var. *comosus* apresentaram um crescimento vegetativo suficiente para receber o estímulo floral já no primeiro outono-inverno.

Sugere-se que isto esteja relacionado com o peso e o vigor de cada muda no momento do transplante e aos aspectos ambientais diversos que seguiram as primeiras semanas após cada transplante de mudas, como por exemplo: médias diárias da temperatura, da pluviosidade e da intensidade luminosa, assim como localização nos canteiros.

**Tabela 3** – Calendário de operações para o cultivo do abacaxi no litoral de Santa Catarina. Tabela adaptada de Koller (1981).

Operações	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Sep	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
1º ano												
Plantio	X											
Adubação	X						X			X		
Indução natural ou artificial												
Colheita e comercialização												
2º ano												
Plantio												
Adubação	X						X					
Indução natural ou artificial ao florescimento			X	X	X							
Colheita e comercialização										X	X	X

Enquanto a maioria das plantas da variedade Pérola regeneradas via organogênese convencional floresceram naturalmente após estímulos ambientais no primeiro ou no segundo outono-inverno (figura 3H-I), de todas as plantas do genótipo de *A. comosus* var. *bracteatus* apenas duas plantas (0,42%) apresentaram florescimento (figura 3J-K). Assim, sugere-se que para o genótipo de *A. comosus* var. *bracteatus* há um forte fator genético contribuindo para um ciclo mais longo de produção.

Além de gerar alternativas de produção aos pequenos produtores e transferir tecnologia de produção de mudas micropropagadas à biofábricas locais, os projetos de desenvolvimento nos quais os estudos desta tese foram aplicados geraram e continuam a gerar informações

importantes a respeito do desenvolvimento dos abacaxizeiros nas unidades de observação estabelecidas. Inclusive gerando informações relacionadas à manutenção da morfologia normal das plantas e de demais características fenológicas e de produção. Sendo que, até o momento, não houve nenhum relato de plantas mutantes por parte dos produtores e dos técnicos envolvidos com os projetos. Como consequência da seleção massal de genótipos locais também foi possível ampliar a coleção de germoplasmas de abacaxizeiro que a UFSC mantém na Fazenda Experimental da Ressacada/UFSC (Figura 3L). Esta coleção traz como destaques os acessos crioulos do estado de Santa Catarina (Figura 3M-P), que foram coletados no início do declínio da produção desta fruta na costa catarinense, que ocorreu desde o final da década de 1970.

#### 5.4. Conclusões

Tanto as plantas regeneradas via organogênese convencional quanto as regeneradas via CN apresentaram baixas taxas de variação somaclonal, 0,23% e 1,26%, respectivamente. Porém, plantas de *A. comosus* var. *bracteatus* regeneradas via organogênese convencional apresentaram um dos subcultivos com variantes somaclonais acima do limite imposto pelo MAPA, o que não foi observado nas plantas de *A. comosus* var. *comosus* regeneradas pelas duas vias estudadas. Estes resultados podem indicar que os genótipos de *A. comosus* var. *bracteatus* apresentem uma maior susceptibilidade à variação somaclonal quando comparado aos genótipos do abacaxizeiro comercial.

Combinando os resultados obtidos com os genótipos de *A. comosus* var. *comosus* nas duas vias estudadas neste capítulo com outros estudos que mostraram a manutenção da fidelidade genética no abacaxizeiro comercial, tais como Scherer *et al.* (online first) (capítulo anterior), Perez *et al.* (2009) e Dujardin (1991), reforça-se a sugestão de que o abacaxizeiro possua estabilidade genética em resposta a protocolos de micropropagação. Ressalta-se que esta sugestão baseia-se em resultados observados com diferentes genótipos em diferentes protocolos regenerativos. Assim, sugere-se que os protocolos apresentados neste capítulo possam ser utilizados para a produção em larga escala de plantas de abacaxizeiro.

## Agradecimentos

Os autores agradecem CAPES, CNPq, FAPESC e UFSC pelas bolsas de estudo, bolsas de pesquisa e suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

## Referências

- Bairu MW, Fennell CW, van Staden J (2006) The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Sci Hortic - Amsterdam* 108:347-351.
- Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul* 63:147-173.
- Be LV, Debergh PC (2006) Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*). *S Afr J Bot* 72:191-194.
- Collins JL, Kerns KR (1938) Mutations in the pineapple: A study of thirty inherited abnormalities in the Cayenne Variety. *J Hered* 29: 169-173.
- Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell Tiss Org* 114(2): 149-159.
- Dal Vesco LL, Guerra MP (2010) *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. *Sci Hortic - Amsterdam* 125:748-755.
- Dujardin M (1991) Cytogénétique de l'ananas. *Fruits* 46:376-379.
- Faostat, FAO statistical databases, pineapple data (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em: <http://http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Feuser S, Meler K, Daquinta M, Guerra MP, Nodari RO (2003) Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell Tiss Org* 72:221-227.
- Gajdosova A, Ostrolucka MG, Libiakova G, Ondruskova E (2007) Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idea* L. In: Jain SM, Haggman H (eds) *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Berlin, Germany: Springer p. 457-464.
- Gao X, Yang D, Cao D, Ao M, Sui X, Wang QM, Kimatu JN, Wang L (2010) *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the

- assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. *J Plant Growth Regul* 29:257-267.
- Guerra MP, Dal Vesco LL, Pescador R, Schuelter AR, Nodari RO (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesqui Agropecu Bras* 34:1557-1563.
- Koller, O.L. (1981) O cultivo do abacaxi em Santa Catarina. Florianópolis: EMPASC. pp. 20.
- MAPA (BRASIL. Ministério da Agricultura). Instrução Normativa nº 22 de 27 de Agosto de 2012. Normas para a Produção e a Comercialização de Mudanças e de Outras Estruturas de Propagação Obtidas por meio de Cultura de Tecidos de Plantas. Diário Oficial da União nº 167, de 28 de Agosto de 2012, Seção 1, p. 2.
- Menéndez-Yuffa A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H (2010) A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss Org* 102: 297-307.
- Morel GM, Wetmore RH (1951) Tissue culture of monocotyledons. *Am J Bot* 38:138-140.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15:473-497.
- Perez G, Yanes E, Isidron M, Lorenzo JC (2009) Phenotypic and AFLP characterization of two new pineapple somaclones derived from *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss Org* 96:113-116
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *P Natl Acad Sci USA* 91:5222-5226.
- Reinhardt A, Rodriguez LV (2009) Industrial Processing of Pineapple – Trends and Perspectives. *Acta Hort* 822:323-328.
- Rodermel S (2002) *Arabidopsis* variegation mutants. In Somerville CR, Meyerowitz EM (Eds) *The Arabidopsis Book*. Rockville, USA: American Society of Plant Biologists Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1199/tab.0079>.
- Rohrbach KG, Leal F, Coppens d' Eeckenbrugge (2003) History, Distribution and World Production. In Bartholomew DP, Paull R, Rohrbach KG (Eds) *The Pineapple: Botany, production and uses*. Wallingford, UK: CABI Publ. p. 33-55.

- Scherer RF, Fraga HPF, Klabunde GF, da Silva DA, Guerra MP (online first) Global DNA methylation levels during the development of nodule cluster cultures and assessment of genetic fidelity of *in vitro*-regenerated pineapple plants (*Ananas comosus* var. *comosus*). J Plant Growth Regul.
- Scherer RF, Garcia AC, Fraga HPF, Dal Vesco LL, Steinmacher DA, Guerra MP (2013) Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). Sci Hortic - Amsterdam 151:38-45.
- Scherer RF, Holderbaum, DF, da Silva DA, Garcia A, Guerra MP (*in press*) Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. Crop Breed Appl Biot.
- Smulders MJM, De Klerk GJ (2011) Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regul 63:137-146.
- Sonnino A, Dhlamini Z, Santucci FM, Warren P (2009) Socio-Economic Impacts of Non-Transgenic Biotechnologies in Developing Countries: The Case of Plant Micropropagation in Africa. Rome, Italy: FAO. pp. 75.
- Souza EV, Souza FVD, Costa, MAP, Costa Jr DS, Santos-Serejo JA, Amorim EP, Ledo CAS (2012) Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. Genet Resour Crop Ev 59:1357–1376.
- Teixeira J, Cruz ARR, Ferreira FR, Cabral JR (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 3:42-47.
- Torres-Morán MI, Escoto-Delgadillo M, Molina-Moret S, Rivera-Rodríguez DM, Velasco-Ramírez AP, Infante D, Portillo, L (2010) Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. Plant Cell Tiss Org 103:403-409.
- Vujović T, Cerovic R, Ruzic D (2012) Ploidy level stability of adventitious shoots of sour cherry ‘Cacanski Rubin’ and Gisela 5 cherry rootstock. Plant Cell Tiss Org 111:323-333.
- Wang QM, Wang L (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. Plant Cell Rep 31:1535-1547.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados da presente tese ampliam o conhecimento associado ao uso, conservação e melhoramento do abacaxizeiro. Até recentemente considerava-se que os solos ricos da região de Tarauacá eram o principal fator para a formação das enormes infrutescências do ‘Gigante de Tarauacá’. A partir de agora, que a triploidia deste cultivar foi revelada, sugere-se que o sistema de produção tradicional dos agricultores da região de Tarauacá e as ótimas características ambientais para o desenvolvimento da espécie interajam com o genótipo triploide para produzir naquela região as frutas enormes reportadas. Desta forma, pode haver um maior interesse no plantio comercial deste genótipo e do uso dele em programas de melhoramento e/ou de conservação. Caso isto aconteça a base genética na qual a abacaxicultura comercial está baseada será ampliada. Além disso, o conhecimento sobre a triploidia deste genótipo também é essencial para o planejamento e execução de programas de melhoramento genético nos quais este genótipo está inserido.

Espera-se que o aperfeiçoamento do protocolo baseado em CN associadas a sistemas de imersão temporária e a indicação da fidelidade genética das mudas derivadas deste protocolo e do protocolo via organogênese convencional possam contribuir para ampliar o emprego de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, tanto para o estabelecimento de unidades de observação de genótipos quanto para o estabelecimento de lavouras matrizes e/ou plantios comerciais. A disponibilidade de um protocolo de alta eficiência regenerativa também é excelente para programas de melhoramento genético e de conservação de germoplasma, não apenas pelo fato de possibilitar a produção massiva de mudas de determinados genótipos em um curto espaço de tempo, mas também para o emprego do protocolo em programas de indução de mutações, uma vez que a alta taxa regenerativa e a alta densidade de meristemas nas culturas nodulares facilita, teoricamente, a obtenção de mutantes após técnicas específicas de indução de mutações.

Quanto às técnicas utilizadas nesta tese, levantam-se algumas limitações quanto à relação custo benefício do uso de AFLP para a avaliação da fidelidade genética de plantas regeneradas, uma vez que mesmo o AFLP possibilitando a observação de dezenas ou centenas de “lócus marcadores” em cada planta, a cobertura do genoma ainda é baixa quando comparamos com o tamanho dos genomas. Além disso,

esta técnica é baseada em uma série de etapas exigentes de uma série de reagentes e equipamentos, o que leva a um alto custo. Por outro lado, ressalta-se a pertinência da avaliação fenotípica de plantas regeneradas via protocolos de micropropagação em propriedades agrícolas (unidades de observação). De uma maneira geral, este tipo de abordagem permite a avaliação de um maior número de plantas derivadas de micropropagação quando comparada às avaliações em centros de pesquisas. Estes, muitas vezes, apresentam restrições para o uso de áreas experimentais e/ou para a manutenção das mesmas. Além disso, a unidade de observação pode ser utilizada para o produtor rural avaliar pessoalmente se determinado genótipo e tipo de muda que está sendo cultivado na(s) unidade(s) de observação é propício para a sua produção comercial.