



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO E
CRIOPRESERVAÇÃO PARA ABACAXIZEIRO

AILTON MELO DE MORAES

AREIA – PB

2007

**TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO E
CRIOPRESERVAÇÃO PARA ABACAXIZEIRO**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

M827t

2007 Moraes, Ailton Melo de.

Técnicas de micropropagação e criopreservação para
abacaxizeiro/Ailton Melo de Moraes. — Areia: 2007.

111f.: il

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba,
Centro de Ciências Agrárias.

Referências.

Orientadores: Dr. Francisco de Assis Almeida e Dr^a. Riselane de L.
Alcântara Bruno.

1. *Ananás comosus*. 2. Micropropagação. 3. Crioconservação. 4.
Nitrogênio Líquido. I. Título.

CDU 634.774 (043)

AILTON MELO DE MORAES

**TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO PARA
ABACAXIZEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal da Paraíba, Campus II – Areia, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Área de concentração Sementes).

Comitê de orientação:

Profº. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida

Profª. Dra. Riselane de L. Alcântara Bruno

AREIA, PB - BRASIL

2007

AILTON MELO DE MORAES

**TÉCNICAS DE MICROPROPAGAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO PARA
ABACAXIZEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal da
Paraíba, Campus II – Areia, para a obtenção do
título de Doutor em Agronomia (Área de
concentração Sementes).

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Riselane de L. Alcântara Bruno – UFPB

Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – EMBRAPA

Dr. Jorge Cazé Filho – EMEPA/PB

Prof^o. Dr. Humberto Silva – UEPB

Prof^o. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – UFCG
(Presidente)

Areia, PB, 18 de junho de 2007

*A Deus,
A meus pais, irmãos, esposa, filhos, avós, tios e primos,
Aos meus amigos e às pessoas que admiro e amo
A todos que acreditam no futuro,
Dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte eterna de energia, amor e sabedoria.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias, pela oportunidade.

À Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado da Paraíba, pela disponibilização do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

Ao Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, pelo empréstimo de equipamentos criobiológicos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa da Mandioca e Fruticultura, pelo fornecimento das sementes.

À Empresa Agrícola Vale do Mangereba, pela doação das mudas.

Ao corpo docente do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, pela contribuição para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na pessoa do Prof. Dr. Genildo Bandeira Bruno (*in memorium*), pela confiança, ajuda e compreensão.

De modo especial ao Profº. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida, pela orientação, incentivo, compreensão e confiança.

Aos professores: Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno, Dr. Jorge Cazé Filho, Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Dr. Humberto Silva, pela colaboração e incentivo.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e companheirismo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

SUMÁRIO DE FIGURAS

SUMÁRIO DE TABELAS

PREFÁCIO

CAPÍTULO 1 PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO PARA A CV. EMEPA 1 DE ABACAXIZEIRO	1
1 RESUMO	2
2 ABSTRACT	3
3 INTRODUÇÃO	4
4 MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Fases do protocolo de micropropagação	7
• Tratamento e isolamento dos explantes	7
• Estabelecimento de explantes	8
• Estiolamento	9
• Regeneração	10
• Multiplicação	10
• Alongamento	11
• Enraizamento	11
• Aclimação	12
4.2 Procedimentos estatísticos	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
• Tratamento e isolamento dos explantes	16
• Estabelecimento de explantes	18
• Estiolamento	19
• Regeneração	20
• Multiplicação	21
• Alongamento	23
• Enraizamento	23

• Aclimação	24
6 CONCLUSÕES	27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
 CAPÍTULO 2 CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ABACAXIZEIRO OBTIDAS POR POLINIZAÇÃO LIVRE	35
1 RESUMO	36
2 ABSTRACT	37
3 INTRODUÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Sementes	41
4.2 Teor Limite de Umidade para Crioconservação (TLUC)	44
4.3 Crioconservação das sementes de abacaxizeiro	46
4.4 Procedimentos estatísticos	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Sementes	48
5.2 Teor Limite de Umidade para Crioconservação (TLUC)	48
5.3 Crioconservação das sementes de abacaxizeiro	51
6 CONCLUSÕES	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
 CAPÍTULO 3 CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS AXILARES DAS CULTIVARES PÉROLA E EMEPA 1 DE ABACAXIZEIRO	64
1 RESUMO	65
2 ABSTRACT	66
3 INTRODUÇÃO	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1 Material vegetal e procedimentos para obtenção dos explantes	70
4.2 Método da Vitrificação	70
4.2 Método do encapsulamento e dessecação	71
4.3 Procedimentos estatísticos	72

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 Método da Vitrificação	73
5.2 Método do encapsulamento e dessecação	78
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE	89

SUMÁRIO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1	
Figura 1	91
Valores médios da contaminação de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio	
Figura 2	91
Valores médios da sobrevivência de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio	
Figura 3	92
Valores médios de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 estabelecidos em meio MS suplementado com reguladores de crescimento	
Figura 4	92
Valores médios do número de nós e comprimento de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 submetidos ao estiolamento em meio MS suplementado com reguladores de crescimento	
Figura 5	93
Valores médios da regeneração de plântulas estioladas cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento revelados através do número de plântulas regeneradas por broto e por nó	
Figura 6	93
Valores médios da taxa de multiplicação de plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio MS, suplementado com reguladores de crescimento	
Figura 7	94
Valores médios do comprimento de plântulas submetidas ao alongamento aos 30 dias de cultivo em meio MS	
Figura 8	94
Valores médios da produção de raízes em plântulas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro na presença do ácido naftalenoacético	
Figura 9	95
Valores médios de altura da planta (AP) e número de folhas (NF) das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, em função de diferentes substratos durante a aclimação	
Figura 10	95
Valores médios da matéria seca (MS) das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, em função de diferentes substratos durante a aclimação	
CAPÍTULO 2	
Figura 1	41
Sementes de abacaxizeiro produzidas pelo método da polinização livre	
Figura 2	43
Sementes de abacaxizeiro semeadas em placa de <i>Petri</i> (A); placas de <i>Petri</i> em sala de crescimento (B)	

Figura 3	Plântulas de abacaxizeiro aos 50 dias da semeadura, compostas por primórdios de raízes, caule e folhas	43
Figura 4	Sacos de papel contendo plântulas normais (A); matéria seca (B)	44
Figura 5	Dessecador de vidro contendo sílica gel utilizado na secagem das sementes (A); hidratação das sementes em recipiente de vidro (B)	45
Figura 6	Embalagens multifolares compostas por papel, papel alumínio e plástico (A e B)	46
Figura 7	Matéria seca produzida por plântulas provenientes de sementes de abacaxizeiro, após o armazenamento, revelada pela interação <i>teor de umidade</i> versus <i>períodos de armazenamento</i>	54
Figura 8	Porcentagem de germinação de sementes de abacaxizeiro após o armazenamento, revelada pela interação <i>temperaturas de armazenamento</i> versus <i>períodos de armazenamento</i>	55
Figura 9	Matéria seca produzida por plântulas provenientes de sementes de abacaxizeiro, após o armazenamento, revelada pela interação <i>temperaturas de armazenamento</i> versus <i>períodos de armazenamento</i>	57

CAPÍTULO 3

Figura 1	Porcentagem das gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelada pela interação <i>cultivares</i> versus <i>concentrações de DMSO</i>	74
Figura 2	Tamanho das gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelado pela interação <i>cultivares</i> versus <i>concentrações de DMSO</i>	75
Figura 3	Porcentagem de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelada pela interação <i>cultivares</i> versus <i>concentrações de sacarose</i>	76
Figura 4	Tamanho de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelado pela interação <i>cultivares</i> versus <i>concentrações de sacarose</i>	77
Figura 5	Porcentagem de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelada pela	

	interação <i>concentrações de DMSO</i> versus <i>concentrações de sacarose</i>	77
Figura 6	Tamanho de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelado pela interação <i>concentrações de DMSO</i> versus <i>concentrações de sacarose</i>	78
Figura 7	Porcentagem de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias, revelada pela interação <i>cultivares</i> versus <i>período de secagem</i> .	80
Figura 8	Tamanho de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias, revelado pela interação <i>cultivares</i> versus <i>período de secagem</i> .	81

SUMÁRIO DE TABELAS

		Página
	CAPÍTULO 1	
Tabela 1	Componente da solução e tempo de exposição utilizados na desinfestação de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	8
Tabela 2	Meios de cultivo testados na fase de estabelecimento de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	9
Tabela 3	Meios de cultivo testados na fase de estiolamento de brotos da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	9
Tabela 4	Meios de cultivo testados na fase de regeneração de plântulas estioladas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	10
Tabela 5	Meios de cultivo testados na fase de multiplicação de plântulas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	11
Tabela 6	Meios de cultivo testados na fase de enraizamento de plântulas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	12
Tabela 7	Proporção dos substratos utilizados na aclimação de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1	13
Tabela 8	Resumo das análises de variância dos dados coletados no desenvolvimento do protocolo de micropropagação da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	15
Tabela 9	Valores médios da contaminação de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio	17
Tabela 10	Valores médios da sobrevivência de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio	17
Tabela 11	Valores médios de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 estabelecidos em meio MS suplementado com reguladores de crescimento	18
Tabela 12	Valores médios do número de nós e comprimento de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 submetidos ao estiolamento em meio MS suplementado com reguladores de crescimento	20
Tabela 13	Valores médios da regeneração de plântulas estioladas cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento revelados através do número de plântulas regeneradas por broto e por nó	21
Tabela 14	Valores médios da taxa de multiplicação de plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio MS, suplementado com reguladores de	

	crescimento	22
Tabela 15	Valores médios do comprimento de plântulas submetidas ao alongamento aos 30 dias de cultivo em meio MS	23
Tabela 16	Valores médios da produção de raízes em plântulas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro na presença do ácido naftalenoacético	24
Tabela 17	Valores médios de altura da planta (AP), número de folhas (NF) e matéria seca (MS) das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, em função de diferentes substratos durante a aclimação	25
Tabela 18	Resumo da regressão na análise de variância dos fatores quantitativos coletados no desenvolvimento do protocolo de micropropagação da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro	96

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Análise de variância da viabilidade das sementes de abacaxizeiro, armazenadas a três temperaturas criogênicas (-18; -150 e - 196 °C), por três dias	48
Tabela 2	Valores médios da germinação e da matéria seca das sementes de abacaxizeiro, revelados pela interação <i>teor de umidade</i> versus <i>temperaturas criogênicas</i> , depois de três dias de crioconservação	49
Tabela 3	Análise de variância da viabilidade das sementes de abacaxizeiro, com teores de umidade de 12; 10 e 8 % b.u., acondicionadas em cápsulas multifolares e armazenadas em ambiente (± 25 °C); freezer (-18 °C); vapor do N ₂ L (-150 °C) e imersão no N ₂ L (-196 °C), durante 3; 45; 90 e 135 dias	52
Tabela 4	Valores médios da germinação e da matéria seca das sementes de abacaxizeiro, revelados pela interação teor de umidade versus temperatura de armazenamento	53
Tabela 5	Valores médios da matéria seca das sementes de abacaxizeiro, revelados pela interação teor de umidade versus período de armazenamento	99
Tabela 6	Valores médios da germinação e da matéria seca das sementes de abacaxizeiro, revelados pela interação temperatura de armazenamento versus períodos de armazenamento	100
Tabela 7	Resumo da regressão na análise de variância dos fatores quantitativos coletados na crioconservação de sementes de abacaxizeiro	101

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Análise de variância da porcentagem e do tamanho de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias	73
Tabela 2	Análise de variância da porcentagem e do tamanho de gemas axilares vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias	79
Tabela 3	Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelados pela interação <i>cultivares versus concentrações de DMSO</i>	104
Tabela 4	Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelados pela interação <i>cultivares versus concentrações de sacarose</i>	105
Tabela 5	Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelados pela interação <i>concentrações de DMSO versus concentrações de sacarose</i>	106
Tabela 6	Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias, revelados pela interação <i>cultivares versus período de secagem</i>	107
Tabela 7	Resumo da regressão na análise de variância dos fatores quantitativos coletados na criopreservação de gemas axilares de abacaxizeiro	108

PREFÁCIO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é um dos frutos de maior importância econômica para o estado da Paraíba, maior produtor brasileiro dessa *Bromeliaceae* (CUNHA, 2006); entretanto, esta frutífera apresenta sementes susceptíveis a danos fisiológicos durante o armazenamento convencional.

Os plantios comerciais desta espécie são realizados através de mudas tipo filhote, filhote rebentão, rebentão e coroa, as quais contribuem para a disseminação de pragas e doenças, quando mal manejadas.

O método convencional, bancos ativos de germoplasmas (BAGs), e a conservação do patrimônio genético da espécie, têm causado perda em diversos acessos, o que tem levado os pesquisadores a buscarem soluções não só referentes a este problema, mas também a outros, adiante referenciados; buscou-se assim, com o presente trabalho, definir metodologias viáveis e simplificadas de micropropagação e crioarmazenagem como método de conservação, por um prazo maior que os métodos convencionais de conservação do patrimônio genético da espécie *Ananas comosus* var. *comosus*, para o que, se fez oportuno o desenvolvimento de protocolos que permitissem o alcance do objetivo.

Na elaboração do estudo sentiu-se a necessidade de apresentar a totalidade do trabalho em capítulos, que tratam sobre temas semelhantes, embora, de identidade própria, razão por que podem ser lidos de forma autônoma.

Estudou-se, no Capítulo 1, o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro; no Capítulo 2, a crioconservação de sementes obtidas por polinização livres, em que foram estabelecidos os teores de umidade limite para esta técnica e, no Capítulo 3, um protocolo de criopreservação, empregando-se as técnicas de vitrificação e encapsulamento-dessecamento, em que se utilizaram, como material genético, gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1.

FOREWORD

The pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) is one of the most economically important crops produced in the state of Paraíba – the main producer of this kind of *Bromeliaceae* in Brazil (CUNHA, 2006). Its seeds, however, are prone to physiological damages when conventionally stored.

The commercial plantation of this species is carried out through seedlings of the following types: “filhote”, “filhote rebentão”, “rebentão” and “crown”. If such seedlings are inappropriately handled, it might contribute to the dissemination of plagues and diseases.

The conventional method known as active germplasm bank as well as the preservation of genetic patrimony have caused loss in diverse accesses, making researchers seek for solutions concerning not only this problem but also some others mentioned next in this study. Thus, the present work aims to define viable and simplified methodologies of micropropagation and cryostorage as conservation methods for a longer deadline than the conventional conservation methods of genetic patrimony of *Ananas comosus* var. *comosus*, being necessary to develop protocols to achieve the objective.

The study consisted of chapters related to similar themes, but with self identity that could be autonomously read.

Chapter 1 presents the development of a micropropagation protocol to create the pineapple EMEPA1. Chapter 2 refers to seed cryoconservation obtained via free pollination that could establish the basic moisture contents for this technique. Chapter 3 exposes a cryopreservation protocol, employing techniques of vitrification, capsuling and desiccating in which axillary gems of cultivar pearls and EMEPA 1 were used as genetic material.

CAPÍTULO 1

**PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO PARA A CV. EMEPA 1 DE
ABACAXIZEIRO
1 RESUMO**

MORAES, Ailton Melo de. **Protocolo de micropropagação para a cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro**. Areia: UFPB/CCA, 2007. p. 1-34. (Tese-Doutorado em Agronomia)

Mundialmente o Brasil se encontra entre os três maiores produtores de abacaxi e o Estado da Paraíba é reconhecido com primeiro produtor. A área cultivada tem aumentado pouco devido à pequena oferta de mudas de boa qualidade. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação para a cv. EMEPA 1 selecionada especialmente para o Estado da Paraíba. Utilizaram-se gemas axilares da cv. EMEPA 1, que foram desinfestadas e inoculadas em meio MS sólido, com pH de 5,8. A incubação foi em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C e fotoperíodo de 16 horas luz, a uma intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, exceto na fase de estiolamento, que foi em B.O.D. na ausência de luz com temperatura de 28 ± 1 °C. O protocolo de micropropagação para a cv. EMEPA 1 foi desenvolvido de acordo com a literatura existente e contempla as fases: tratamento e isolamento dos explantes (TI); estabelecimento de explantes (EE); estiolamento (ES); regeneração (RE); multiplicação (MU); alongamento (AL); enraizamento (EN) e aclimação (AC). Em todas as fases se empregou o delineamento inteiramente casualizado (DIC), conforme a seguir: TI – DIC com arranjo fatorial 4×4 (4 concentrações de hipoclorito de sódio x 4 tempos de exposição ao hipoclorito de sódio), com 10 repetições contendo 1 explante por frasco; EE – DIC com 6 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 explante por frasco; ES – DIC com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 plântula desfolhada por tubo de ensaio; RE – DIC com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 broto estiolado por placa de *Petri*; MU – DIC com 8 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 explante por frasco; AL – DIC com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 plântula por frasco; EN – DIC com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 plântula por frasco e AC – DIC com 11 tratamentos, composto de 4 repetições contendo 5 plantas cada. Concluiu-se que a concentração de 2% de hipoclorito de sódio por 10 minutos, promove a desinfestação das gemas e o estabelecimento pode ser em meio de cultivo sem reguladores de crescimento, o estiolamento pode ser realizado em meio MS com $1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e a regeneração em meio MS com $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Para a multiplicação o meio de cultivo indicado é o MS suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA; no alongamento o meio de cultura MS sem diluição proporciona o maior crescimento das plântulas, enquanto a adição do ANA promove o aumento no número e a diminuição do tamanho das raízes das plântulas e o composto orgânico favorece o crescimento e o desenvolvimento de plântulas de abacaxizeiro, produzidas *in vitro*, na fase de aclimação.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, gemas axilares, reguladores de crescimento, micropropagação.

MICROPROPAGATION PROTOCOL FOR CV. PINEAPPLE EMEPA 1

1 SUMMARY

MORAES, Ailton Melo de. **MICROPROPAGATION PROTOCOL FOR CULTIVAR PINEAPPLE EMEPA 1**. Areia: UFPB/CCA, 2007. p. 1-34 (Doctorate thesis in Agronomy).

Brazil is one of the three main pineapple producers in the world, being the state of Paraíba, especially, considered as the first of them. The area cultivated has slightly increased due to the small offer of good quality seedlings. This work aimed to develop a cv. EMEPA 1 micropropagation protocol especially selected to be cultivated in the state of Paraíba. The cv. EMEPA 1 axillary gems used were disinfested and inoculated in half MS solid with 5,8 pH. There was incubation in a growth room with temperature of $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ and photoperiod of 16 hours/light at a luminous intensity of $30 \text{ pmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, except for the etiolation phase, held at B.O.D, with no light and temperature of $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The cv. EMEPA 1 micropropagation protocol was developed according to the existing literature, comprising the following phases: treatment and isolation of explants (TI); establishing of explants (EE); etiolation (ES); regeneration (RE); multiplication (MU); extent; rooting ®; acclimatization (AC). A completely randomized design (CRD) was used in all the phases as follows: TI – CRD with 4×4 factorial array (4 concentrations of sodium hypochlorite x 4 exposition times to sodium hypochlorite), with 10 repetitions containing 1 explant per bottle; EE – DIC with 6 treatments comprised of 10 repetitions containing 1 explant per bottle; ES – CRD with 4 treatments, comprised of 10 repetitions containing 1 defoliated plantule per test tube; RE – DIC with 4 treatments, comprised of 10 repetitions containing 1 etiolated sprout per Petri's plaque; MU – CRD with 8 treatments, comprised of 10 repetitions containing 1 explant per bottle; AL – CRD with 4 treatments comprised of 10 repetitions containing 1 plantule per bottle; and AC – CRD with 11 treatments, comprised of 4 repetitions containing 5 plants each. It was concluded that the concentration of 2% of sodium hypochlorite for 10 minutes causes gems disinfestation and the establishment can be carried out by means of tillage without any growth regulators. The etiolation can be achieved in MS with $1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ of ANA and regeneration in MS with $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ of ANA + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ of BAP. For the multiplication, the type of tillage indicated is MS supplemented with $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ of BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ of ANA.; in extent, the type of crop MS without any dilution causes the highest growth of plantules, whereas the addition of ANA prompts increase in number and decrease of plantules root size and the organic compound favors increase and development of pineapple plantules produced *in vitro* during the acclimatizing phase.

Keywords: Ananas comosus, axillary gems, growth regulators, micropropagation.

PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO PARA A CV. EMEPA 1 DE ABACAXIZEIRO

3 INTRODUÇÃO

O Brasil se situa entre os três maiores produtores mundiais de abacaxi; esta cultura ocupa 55.340 ha aproximadamente, destacando-se o Estado da Paraíba, primeiro produtor, seguido dos Estados do Pará, Minas Gerais, Bahia, Rio Grande do Norte, São Paulo e Tocantins (CUNHA, 2006).

Para Praxedes et al. (2001), a área cultivada com abacaxizeiro no Brasil tem aumentado pouco ao longo dos anos, devido principalmente à pequena oferta de mudas de boa qualidade. Conforme Cunha e Reinhardt, 2004, além da escassez de mudas de boa qualidade, o vigor e a sanidade são fatores que afetam o bom desenvolvimento inicial das plantas possibilitando a ocorrência de pragas e doenças.

O abacaxizeiro pode ser propagado sexuadamente por meio de sementes e assexuadamente através de mudas, utilizando-se coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão, obtidas sobretudo por seccionamento do caule, destruição do meristema apical, tratamento químico durante a diferenciação floral e cultura de tecidos.

Obtêm-se mudas diretamente no campo, possibilitando a disseminação de doenças e pragas, fato agravado pelos poucos genótipos plantados, prevalecendo as cultivares Pérola e Smooth Cayenne, não diferenciando o Nordeste das demais regiões produtoras no País (WEBER et al., 2004); Tem-se, contudo, elevada suscetibilidade a doenças como fusariose (SPIONELLO et al., 1997a, b), causada pelo *Fusarium subglutinans* (SANTOS et al., 2002) as quais, conforme Matos e Cabral (2005), provocam perdas variáveis na produção de frutos, a depender do inóculo inicial, da região produtora e da época de produção.

Segundo Cunha e Reinhardt (2004), o sucesso econômico no cultivo de produtos agrícolas depende muito do uso de material de plantio de boa qualidade, que se constitui no insumo mais importante de qualquer cultura; em abacaxizeiro, a muda produzida em viveiro a partir de pedaços do talo ou caule de plantas que já foram colhidas, é adequada para a implantação de plantios com melhor sanidade, especialmente com relação à fusariose e também para multiplicação de novas

variedades; mas, na prática, é pouco utilizada por falta de viveiristas dedicados à sua produção; já o uso de muda produzida *in vitro* por meio de técnicas de cultura de tecidos – micropropagação, fica restrito à introdução de plantas matrizes de novas variedades geradas em programas de melhoramento genético.

Técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo largamente aplicadas não só pela possibilidade de se obter plantas mais resistentes a fatores de estresses bióticos (fusariose) e abióticos (salinidade), mas, também, pela rápida propagação clonal *in vitro* de plantas de novas variedades (MACÊDO et al., 2003). No caso do abacaxizeiro, tais técnicas estão sendo utilizadas comercialmente visando à produção de novas cultivares e do aumento na quantidade de mudas (ALBUQUERQUE, 1998).

A produção de mudas por cultura de tecidos permite obter milhares de mudas a partir de uma única gema, em pequeno período de tempo e totalmente livres de problemas fitossanitários (TEIXEIRA et al., 2001a; FIROOZABADY e GUTTERSON, 2003; BARBOZA et al., 2004).

Teixeira et al. (2001a), relatam que, embora as mudas de abacaxi obtidas via cultura de tecidos ainda tenham preços elevados, principal fator que tem limitado a sua utilização em lavouras comerciais, esse tipo de muda pode ser recomendado quando se deseja: (1) introdução da cultura em novas regiões de plantio; (2) introdução e/ou substituição de novas cultivares, para início de grandes plantios; (3) multiplicação rápida de genótipos selecionados pelos programas de melhoramento genético; (4) atender a programas de produção de mudas certificadas e (5) intercâmbio de germoplasma para se evitar a introdução de pragas e doenças exógenas.

Para Macêdo et al. (2003), após os primeiros trabalhos de Aghion e Beauchesne (1960) há na literatura, um número crescente de estudos que investigam aspectos como: sistema de micropropagação (cultura estacionária e imersão temporária), resposta de diferentes cultivares, tipos de explante, meio de cultura, tipos e concentrações de fitorreguladores (MATHEWS e RONGAN, 1979; CABRAL et al., 1984; LIU et al., 1988; MARCIANI-BENDEZÚ et al., 1990; ROCA e MROGINSKI, 1991; VENTURA, 1994; DAL VESCO et al., 1996; TENG, 1997; GUERRA et al., 1999; DAL VESCO et al., 2000; FEUSER et al., 2001; SÁ, 2001); no entanto, além do aprofundamento dos aspectos citados pode-se acrescentar, a esta

lista, o estudo das condições físicas de incubação, limpeza clonal, resistência a salinização, hidroponia, anatomia e aclimação (PRAXEDES et al., 2001; DAL VESCO et al., 2001; OMOKOLO et al., 2001; SILVA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2002; MOREIRA et al., 2003; MACÊDO et al., 2003; BARROSO et al., 2003; BARBOZA et al., 2004; MOGOLLÓN et al., 2004; MOREIRA et al., 2006; BARBOZA et al., 2006).

Com os estudos de micropropagação do abacaxizeiro, são exigidas melhorias nos protocolos regenerativos empregados, devido principalmente a respostas diferentes dos genótipos aos reguladores de crescimento testados.

Para atender aos produtores de abacaxi quanto à micropropagação desta cultura objetivou-se, neste trabalho, desenvolver um protocolo de micropropagação para a cv. EMEPA 1, selecionada especialmente para o estado da Paraíba.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB, e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Estação Experimental de Mangabeira (EEM), pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado da Paraíba (EMEPA/PB), João Pessoa, PB, cujo material biológico utilizado foi gemas axilares de mudas tipo coroa, retiradas de frutos da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro provenientes de campos experimentais da EMEPA/PB.

Os experimentos foram realizados em condições assépticas, utilizando-se como meio de cultura, o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com sacarose a 30 g.L⁻¹ e o solidificante ágar a 7 g.L⁻¹, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C com 1Kgf.cm⁻² de pressão, durante 30 minutos, enquanto a incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, exceto na fase de estiolamento, que foi em B.O.D. no escuro com temperatura de 28 ± 1 °C.

4.1 Fases do protocolo de micropropagação

- **Tratamento e isolamento dos explantes**

A desinfestação se processou em três etapas: (1) as mudas foram submersas em uma solução de formaldeído a 1%, durante 1 minuto; (2) após a secagem as mudas foram novamente submersas em uma solução contendo 0,3% do defensivo agrícola sistêmico Derosal 500[®], durante 10 minutos e (3) após o desfolhamento em câmara de fluxo laminar, as gemas axilares foram retiradas e subdivididas em 16 lotes contendo, cada um, 10 gemas axilares; em seguida, esses lotes de gema foram submersos em álcool a 70%, por 1 minuto; na seqüência, foram aplicados os tratamentos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações da solução e tempos de exposição utilizados na desinfestação de gemas axilares da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

Tempo de exposição (min.)	Hipoclorito de sódio (NaClO) %			
	1	2	3	4
5	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
10	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
15	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
20	T ₁₃	T ₁₄	T ₁₅	T ₁₆

O excesso de hipoclorito de sódio foi eliminado submetendo-se os explantes a lavagem com água destilada e deionizada estéril, 3 vezes; posteriormente, as gemas axilares foram inoculadas em meio MS básico e transferidas para a sala de crescimento; por fim, a avaliação foi realizada aos 45 dias de cultivo considerando o número de gemas contaminadas e vivas.

- **Estabelecimento de explantes**

Gemas axilares isoladas e desinfestadas com álcool a 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos, foram inoculadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento (Tabela 2) e os brotos foram subcultivados aos 30 dias da inoculação e a avaliação realizada aos 60 dias de cultivo, quantificando-se o número e a altura dos brotos estabelecidos.

Tabela 2. Meios de cultivo testados na fase de estabelecimento de gemas axilares da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

Tratamentos	
T ₁ (MS)	Testemunha
T ₂ (MS + 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,125 mg.L ⁻¹ de ANA)	Teixeira et al., 2001a
T ₃ (MS + 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ de ANA)	Ramirez e Bocardo, 2003
T ₄ (MS + 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ de ANA)	Macêdo et al., 2003 Albuquerque et al., 2000
T ₅ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP)	Almeida et al., 2002 Barboza et al., 2004
T ₆ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ de ANA)	Piza et al., 2001

- **Estiolamento**

Plântulas produzidas *in vitro* a partir de gemas axilares de mudas do tipo coroa foram totalmente desfolhadas, deixando-se apenas o talo; em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo o meio MS, suplementado com reguladores de crescimento, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Meios de cultivo testados na fase de estiolamento de brotos da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

Tratamentos	
T ₁ (MS)	Testemunha
T ₂ (MS + 1,0 mg.L ⁻¹ de ANA)	Praxedes et al., 2001
T ₃ (MS + 1,86 mg.L ⁻¹ de ANA)	Barboza e Caldas, 2001
T ₄ (MS + 1,8 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP)	Moreira et al., 2003

Após a inoculação, os tubos de ensaio foram envoltos em papel-alumínio e mantidos 45 dias em B.O.D. na ausência de luz, com temperatura de 28 ± 1 °C; enfim, a avaliação foi realizada aos 45 dias de cultivo levando-se em consideração o número de nós por broto estiolado e comprimento dos brotos.

- **Regeneração**

Broto estiolado *in vitro* durante 45 dias em meio MS, após a eliminação das raízes e do ápice, foram colocados horizontalmente em placas de *Petri* de 9 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 40 mL⁻¹ de meio de cultura MS, suplementado com reguladores de crescimento, descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Meios de cultivo testados na fase de regeneração de plântulas estioladas da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

Tratamentos	
T ₁ (MS)	Testemunha
T ₂ (MS + 1,0 mg.L ⁻¹ de ANA)	Praxedes et. al., 2001
T ₃ (MS + 1,8 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP)	Moreira et. al., 2003
T ₄ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP)	Barboza e Caldas, 2001

A avaliação foi realizada aos 45 dias da inoculação levando em consideração o número de brotos regenerados por brotos estiolados e por nó.

- **Multiplicação**

Plântulas estabelecidas *in vitro* foram transferidas para o meio de cultura MS básico, suplementado com reguladores de crescimento, conforme Tabela 5, enquanto os brotos foram subcultivados aos 30 e 60 dias após a inoculação e as avaliações realizadas aos 30, 60 e 90 dias da inoculação levando-se em conta a taxa de multiplicação por plântula inoculada.

Tabela 5. Meios de cultivo testados na fase de multiplicação de plântulas da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

Tratamentos	
T ₁ (MS)	Testemunha
T ₂ (MS + 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP)	Ramírez e Bocardo, 2003
T ₃ (MS + 1,5 mg.L ⁻¹ de BAP)	Almeida et al., 2002
T ₄ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP)	Barboza et al., 2004
T ₅ (MS + 2,52 mg.L ⁻¹ de BAP)	Silva et al., 2002
T ₆ (MS + 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,01 mg.L ⁻¹ de ANA)	Mogollón et al., 2004
T ₇ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L ⁻¹ de ANA)	Teixeira et al., 2001a
T ₈ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L ⁻¹ de ANA)	Piza et al., 2001

- **Alongamento**

As maiores brotações produzidas na fase de multiplicação foram colocadas individualmente em frascos contendo os meios 1/1; 3/4; 1/2 e 1/4 MS, sem reguladores de crescimento, pelo tempo de 30 dias para promover o alongamento das plântulas. Ocasão em que se avaliou comprimento das plântulas inoculadas.

- **Enraizamento**

Os brotos obtidos após o alongamento foram selecionados aleatoriamente e transferidos, em câmara de fluxo laminar, para frascos contendo o meio MS suplementado com reguladores de crescimento (Tabela 6); sua avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo, tendo em vista o número e o comprimento médio das raízes.

Tabela 6. Meios de cultivo testados na fase de enraizamento de plântulas da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

Tratamentos	
T ₁ (MS)	Testemunha
T ₂ (MS + 0,2 mg.L ⁻¹ de ANA)	Ramírez e Bocardo, 2003
T ₃ (MS + 1,0 mg.L ⁻¹ de ANA)	Barboza et al., 2004 Mogollón et al., 2004
T ₄ (MS + 2,0 mg.L ⁻¹ de ANA)	Piza et al., 2001

- **Aclimação**

Após o enraizamento *in vitro* as mudas foram selecionadas por peso, em torno de 2 g, lavadas para se retirar o excesso do meio de cultura e depois submersas em uma solução contendo 0,3% do defensivo agrícola sistêmico Derosal 500®, durante 10 minutos, para prevenir doenças fúngicas; em seguida, foram colocadas em potes multiuso de polipropileno transparente de 250 ml, revestidos com papel alumínio.

Os substratos utilizados, foram: solos de subsuperfície (S), esterco bovino (EB), vermiculita (V) e composto orgânico (CO), conforme Tabela 7.

Para seu uso, o solo foi misturado com areia, na proporção de 2:1 depois de ser peneirado, constituindo a mistura padrão para todas as misturas nas quais se utilizou solo (MOREIRA et al., 2006).

As mudas foram mantidas em telado com nebulização intermitente, sendo que nos primeiros 7 dias foram cobertas com copos de poliestireno transparente, para evitar o excesso de transpiração; por sua vez, as avaliações foram realizadas aos 90 dias do plantio das mudas, quantificando-se os seguintes parâmetros: altura da planta (raiz, caule e folhas), número de folhas e peso de matéria seca da planta (raiz, caule e folhas).

Tabela 7. Proporção de substratos utilizados na aclimação de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1

Tratamentos	Materiais (%)			
	Solo	Esterco bovino	Vermiculita	Composto orgânico
1	100	-	-	-
2	-	100	-	-
3	-	-	100	-
4	-	-	-	100
5	50	50	-	-
6	50	-	50	-
7	50	-	-	50
8	40	30	30	-
9	40	30	-	30
10	40	-	30	30
11	25	25	25	25

4.2 Procedimentos estatísticos

Em todas as fases estudadas para o desenvolvimento do protocolo de micropropagação da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), como se apresenta a continuação para cada fase:

- Tratamento e isolamento dos explantes – DIC, com arranjo fatorial 4 x 4 (4 concentrações de hipoclorito de sódio x 4 tempos de exposição ao hipoclorito de sódio), com 10 repetições contendo 1 explante por frasco;
- Estabelecimento de explantes – DIC, com 6 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 explante por frasco;
- Estiolamento – DIC, com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 talo por tubo de ensaio;
- Regeneração – DIC, com 4 tratamentos, formado de 10 repetições contendo 1 broto estiolado por placa de *Petri*;

-
- Multiplicação – DIC, com 8 tratamentos e 10 repetições contendo 1 explante por frasco;
 - Alongamento – DIC, com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 plântula por frasco;
 - Enraizamento – DIC, com 4 tratamentos, composto de 10 repetições contendo 1 plântula por frasco;
 - Aclimação – DIC, com 11 tratamentos, composto de 4 repetições contendo 5 plantas cada um.

A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 1 e 5 % de probabilidade. Determinaram-se as regressões quadráticas na análise de variância e se estabeleceram os coeficientes de determinação R^2 (Tabela 18 do apêndice).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de variância apresentam diferenças significativas a nível de 1% de probabilidade, em todos os caracteres estudados (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo das análises de variância dos dados coletados no desenvolvimento do protocolo de micropropagação da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro

CARACTERES	FONTE DE VARIAÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	F
Tratamento e isolamento dos explantes: gemas contaminadas	Concentração de hipoclorito de sódio (C)	3	313,12**
	Tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (T)	3	13,12**
	C x T	9	3,12**
	Resíduo	144	
Tratamento e isolamento dos explantes: gemas vivas	Concentração de hipoclorito de sódio (C)	3	57,56**
	Tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (T)	3	11,06**
	C x T	9	2,56**
	Resíduo	144	
Estabelecimento de explantes: nº. de brotos estabelecidos	Tratamentos	5	20,40**
	Resíduo	54	
Estabelecimento de explantes: altura de brotos estabelecidos	Tratamentos	5	6,00**
	Resíduo	54	
Estiolamento: comprimento de brotos estiolados	Tratamentos	3	100,62**
	Resíduo	36	
Estiolamento: número de nós por broto estiolado	Tratamentos	3	3293,31**
	Resíduo	36	
Regeneração: número de brotos regenerados por broto estiolado	Tratamentos	3	494,35**
	Resíduo	36	
Regeneração: número de brotos regenerados por nó	Tratamentos	3	147,66**
	Resíduo	36	
Multiplicação: taxa de multiplicação aos 30 dias	Tratamentos	7	50,52**
	Resíduo	72	
Multiplicação: taxa de multiplicação aos 60 dias	Tratamentos	7	136,25**
	Resíduo	72	

CARACTERES	FONTE DE VARIAÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	F
Multiplicação: taxa de multiplicação aos 90 dias	Tratamentos	7	323,10**
	Resíduo	72	
Alongamento	Tratamentos	3	22,84**
	Resíduo	36	
Enraizamento: número de raízes	Tratamentos	3	219,19**
	Resíduo	36	
Enraizamento: comprimento médio das raízes	Tratamentos	3	417,21**
	Resíduo	36	
Aclimação: altura da planta	Tratamentos	10	4955,57**
	Resíduo	99	
Aclimação: número de folhas	Tratamentos	10	86,14**
	Resíduo	99	
Aclimação: matéria seca	Tratamentos	10	2270,51**
	Resíduo	99	

** Significativo a 1% de probabilidade

• Tratamento e isolamento dos explantes

O efeito do hipoclorito de sódio na contaminação de gemas axilares de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, pode ser observado na Tabela 9 e na Figura 1 do apêndice, na qual se constata decréscimo na contaminação, com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio, além de tendência de diminuição da contaminação com o aumento do tempo de exposição ao agente desinfestante. Piza et al. (2001), obtiveram 97,2% de descontaminação com uma solução de hipoclorito de sódio comercial (Q-Boa) a 20%; no entanto, o número de gemas mortas foi considerado altíssimo, em torno de 12,9%, as quais se apresentavam totalmente oxidadas. De acordo com Teixeira et al. (2001a), os altos índices de contaminação bacteriana e/ou fúngica podem ser indício de presença de contaminantes endógenos, o que é um indicador de que a qualidade da muda é insatisfatória; no entanto, quando se detecta a presença de bactérias ou fungos endógenos devem-se utilizar meios de cultivo suplementados com antibióticos sistêmicos ou dar preferência a outras fontes de explantes.

Tabela 9. Valores médios da contaminação de gemas axilares da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio

Concentrações de hipoclorito de sódio (%)	Tempo de exposição (min.)								Média
	5		10		15		20		
1	5,0	aA	5,0	aA	4,0	aB	4,0	aB	4,5
2	2,0	bA	1,0	bB	1,0	bB	0,0	bC	1,0
3	1,0	cA	0,0	cB	0,0	cB	0,0	bB	0,25
4	0,0	dA	0,0	cA	0,0	cA	0,0	bA	0,0
Média	2,0		1,5		1,25		1,0		1,44
DMS/colunas = 0,86 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,86 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Observa-se na Tabela 10 e na Figura 2 do apêndice, a sobrevivência das gemas axilares de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, após a desinfestação.

Tabela 10. Valores médios da sobrevivência de gemas axilares da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas à desinfestação com hipoclorito de sódio

Concentrações de hipoclorito de sódio (%)	Tempo de exposição (min.)								Média
	5		10		15		20		
1	7,0	abA	7,0	bA	7,0	abA	6,0	aA	6,75
2	8,0	aA	9,0	aA	8,0	aA	6,0	aB	7,75
3	6,0	bcA	6,0	bcA	6,0	bcA	6,0	aA	6,0
4	5,0	cA	5,0	cA	5,0	cA	4,0	bA	4,75
Média	6,5		6,75		6,5		5,5		6,31
DMS/colunas = 1,22 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 1,22 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Nota-se um decréscimo no número de gemas vivas com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio; em valores absolutos, os tratamentos compostos de hipoclorito de sódio a 2% durante 10 e 15 minutos, apresentaram o melhor desempenho em relação ao número de gemas vivas (9,0 e 8,0,

respectivamente) e contaminadas (1,0). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), um problema freqüente durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos, que são liberados pelas células. A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas, que se podem ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula (TEIXEIRA, 2001b). Neste experimento não se observou morte de gemas por oxidação, devido, provavelmente, à retirada das gemas antes da desinfestação.

- **Estabelecimento de explantes**

Observa-se, para a variável número de brotos estabelecidos, superioridade do tratamento sem reguladores de crescimento sobre os demais suplementados com BAP e ANA, nas concentrações estudadas (Tabela 11 e Figura 3 do apêndice).

Tabela 11. Valores médios de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 estabelecidos em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

Tratamentos (mg.L ⁻¹)			Número de brotos estabelecidos (unidade)	Altura dos brotos estabelecidos (cm)
BAP	+	ANA		
-	-	-	10 a	0,5 a
0,5		0,125	8 b	0,4 ab
0,5		0,5	6 c	0,4 ab
1,0		0,5	6 c	0,3 b
2,0		-	8 b	0,3 b
2,0		1,0	8 b	0,3 b
DMS			1,39	0,13

As médias seguidas de letras distintas, na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Este resultado difere do constatado por Piza et al. (2001), que obtiveram maior freqüência de gemas sem desenvolvimento nos tratamentos com baixas concentrações de fitorreguladores. Sempre que as concentrações de BAP e ANA aumentaram ocorreu um número maior de gemas estabelecidas, apresentando-se mais vigorosas e com melhor conformação. Albuquerque et al. (2000), verificaram

uma porcentagem de necrose de 100% aos quarenta e cinco dias de cultivo, em ápices caulinares de abacaxizeiro da cultivar Pérola cultivada em meio MS. Resposta similar foi verificada para a variável altura de plântulas estabelecidas (Tabela 11 e Figura 3 do apêndice), constatando-se que não existem diferenças significativas entre a altura dos brotos estabelecidos na ausência de reguladores de crescimento e as plântulas estabelecidas em meios de cultivo suplementados com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,125 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, sendo essas estatisticamente iguais aos suplementados com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e diferentes dos tratamentos sem reguladores de crescimento; verifica-se, ainda, que não houve diferença significativa na altura das plântulas estabelecidas em meios de cultivo suplementado com reguladores de crescimento (BAP e ANA) fato se deve, provavelmente, a respostas distintas de cultivares a adição de reguladores de crescimento na fase de estabelecimento de explantes.

• Estiolamento

Verifica-se, através da análise estatística, que os resultados obtidos nas variáveis estudadas na fase de estiolamento apresentaram diferenças significativas, nos quatro meios de cultivo estudados (Tabela 12 e Figura 4 do apêndice).

Para a variável número de nós por broto estiolado, o meio de cultivo em que se obteve o melhor desempenho, foi o suplementado com $1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, seguido do meio de cultivo suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Não se verifica diferença significativa entre o meio de cultivo suplementado com $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e o meio sem reguladores de crescimento, porém inferiores estatisticamente aos demais, traduzindo-se nos resultados obtidos por Barboza e Caldas (2001), que obtiveram, em média, 7 e 6,7 nós por broto estiolado, para as cultivares Smooth Cayenne e para o híbrido PE x SC-52, respectivamente, em meio de cultivo MS suplementado com $1,86 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Em geral, os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos obtidos por Moreira et al. (2003), que conseguiram 10,26 brotações em meio MS suplementado com $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA + 2 mg.L^{-1} de BAP, para a cultivar Pérola, após 40 dias no escuro.

Tabela 12. Valores médios do número de nós e comprimento de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 submetidos ao estiolamento em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

Tratamentos (mg.L ⁻¹)		Número de nós por broto estiolado (unidade)	Comprimento de brotos estiolados (cm)
ANA + BAP			
-	-	3,90 c	3,19 c
1,0	-	5,10 b	3,90 b
1,86	-	8,90 a	7,07 a
1,8	2,0	3,10 c	2,39 d
DMS		0,97	0,13

As médias seguidas de letras distintas na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Em relação ao comprimento de brotos estiolados, observa-se um desenvolvimento melhor no meio de cultivo suplementado com ANA (1,86 mg.L⁻¹), como também o efeito negativo da adição do regulador de crescimento BAP nas variáveis estudadas. Praxedes et al. (2001) observaram que o estiolamento da cultivar Pérola de abacaxizeiro pode ser obtido sem reguladores de crescimento, mas Sá et al. (2000) obtiveram 4,3 cm de comprimento em segmentos estiolados em meio de cultivo com 10 µM de BAP + 10 µM de ANA.

• Regeneração

Notam-se, nesta fase, diferenças significativas para as variáveis número de brotos regenerados por broto estiolado e número de brotos regenerados por nó (Tabela 13 e Figura 5 do apêndice); os quatro meios de cultivo utilizados promoveram comportamentos distintos, apresentando melhor resultado para os brotos regenerados em meio de cultivo MS básico, suplementado com 1,8 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, seguido dos tratamentos compostos por meios de cultivo MS básico sem reguladores de crescimento e os meios suplementados com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Observa-se, ainda, que o pior resultado para a regeneração de brotos foi obtido no meio de cultivo MS, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de ANA nas duas variáveis em estudo. Moreira et al. (2003) obtiveram maior média de brotações

na cultivar Pérola, em meio MS suplementado com 1,8 mg.L⁻¹ de ANA + 2 mg.L⁻¹ de BAP, apresentando médias de brotações de 10,61, porém com calos em todos os nós; no entanto, a formação de calos não foi observada na cultivar EMEPA 1; já Barboza e Caldas (2001), obtiveram maior eficiência na regeneração de plântulas do híbrido PE x SC-52, com 10,4 plântulas por broto estiolado, em meio de cultivo adicionado com 2 mg.L⁻¹ de BAP, independentemente do número de nós por broto; Esses fatos revelam respostas distintas das cultivares a ação dos reguladores de crescimento nas fases de estiolamento e de regeneração de brotos.

Tabela 13. Valores médios da regeneração de brotos estiolados cultivados em meio MS suplementado com reguladores de crescimento revelados através do número de brotos regenerados por broto e por nó

Tratamentos (mg.L ⁻¹)		Número de brotos regenerados por broto estiolado (unidade)	Número de brotos regenerados por nó (unidade)
ANA + BAP			
-	-	8,19 b	1,18 b
1,0	-	7,53 c	1,06 c
1,8	2,0	10,33 a	1,48 a
-	2,0	8,11 b	1,15 b
DMS		0,21	0,05

As médias seguidas de letras distintas, na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

• Multiplicação

Os resultados da ação das diversas concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA sobre a taxa de multiplicação de plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, são apresentados na Tabela 14 e na Figura 6 do apêndice.

Tabela 14. Valores médios da taxa de multiplicação de plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

Tratamentos (mg.L ⁻¹)		Subcultivo (dias)			Média
BAP + ANA		30	60	90	
-	-	1,0 d	1,4 e	1,6 e	1,3
1,0	-	2,3 c	4,5 d	6,0 d	4,3
1,5	-	2,5 c	5,7 c	8,1 c	5,4
2,0	-	2,7 c	5,7 c	8,2 c	5,5
2,52	-	2,6 c	5,8 c	8,1 c	5,5
1,0	0,01	4,1 b	8,3 b	12,0 b	8,1
2,0	0,5	5,3 a	10,6 a	15,4 a	10,4
2,0	1,0	3,9 b	8,3 b	12,4 b	8,2
DMS		0,82	1,05	1,04	

As médias seguidas de letras distintas, na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Observa-se que o meio de cultivo MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, obteve a maior taxa de multiplicação aos 30, 60 e 90 dias de cultivo, mas não se constatou diferença na taxa de multiplicação nos três subcultivos entre os meios de cultivo MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,01 mg.L⁻¹ de ANA e o meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 1,0 mg.L⁻¹ de ANA; Ademias, há tendência de aumento na taxa de multiplicação quando se aumenta a concentração de BAP, além de uma baixa taxa de multiplicação nos três subcultivos em meio MS sem reguladores de crescimento, cujos resultados são equivalentes aos obtidos por Ramirez e Bocardo (2003), Almeida et al. (2002), Barboza et al. (2004), Silva et al. (2002), Mogollón et al. (2004) e Piza et al. (2001), para as cultivares: Champaka e MD2, Pérola, PE x SC-52, Primavera, Queen Austrália e Smooth Cayenne, respectivamente, revelando comportamentos similares em diversas cultivares aos reguladores de crescimento BAP e ANA, na fase de multiplicação.

- **Alongamento**

Observa-se, na Tabela 15 e na Figura 7 do apêndice, que as concentrações do meio de cultivo MS proporcionaram diferenças no comprimento dos brotos com decréscimo no alongamento dos brotos, decorrente da diluição do meio MS básico.

Tabela 15. Valores médios do comprimento de brotos submetidos ao alongamento aos 30 dias de cultivo em meio MS

Tratamentos	Comprimento de plântulas (cm)
1/1 MS	2,3 a
3/4 MS	2,1 b
2/4 MS	1,9 c
1/4 MS	1,9 c
DMS	0,13

As médias seguidas de letras distintas, na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Verifica-se maior comprimento dos brotos no meio de cultivo 1/1 MS e os piores desempenhos nas proporções 2/4 e 1/4 do meio MS. Grattapaglia e Machado e Machado (1998), relatam que pode ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento. Pasqual et al. (1998), descrevem a fase de alongamento no protocolo de micropropagação do abacaxi, como uma fase intermediária entre a multiplicação e o enraizamento; observa-se que esta fase é de suma importância, não só pelo alongamento das plântulas mas também, como período para eliminação dos reguladores de crescimento utilizados na fase de multiplicação, visto que em alguns casos os brotos continuam se multiplicando.

- **Enraizamento**

O efeito do ácido naftalenoacético sobre a produção de raízes na cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro pode ser observado na Tabela 16 e na Figura 8 do apêndice.

Tabela 16. Valores médios da produção de raízes em plântulas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro na presença do ácido naftalenoacético

Tratamentos ANA (mg.L ⁻¹)	Número de raízes (unidade)	Tamanho das raízes (cm)
-	7,0 c	2,3 a
0,2	7,3 c	1,9 b
1,0	11,4 b	1,2 c
2,0	15,8 a	0,7 d
DMS	1,06	0,12

As médias seguidas de letras distintas, na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Aos 30 dias de cultivo se observou a formação de raízes em todos os tratamentos testados, em que o número de raízes cresce com o aumento da concentração de ANA e o seu tamanho é afetado com o aumento da concentração deste regulador de crescimento nos meios de cultivo; tais resultados se apresentam inferiores, porém de comportamento semelhante aos estudados por Ramírez e Bocardo (2003), que obtiveram, em média, 9,7 e 9,9 raízes nas cultivares MD2 e Champaka, respectivamente, em meio de cultivo adicionado de 0,2 mg.L⁻¹ de ANA; com relação ao comprimento das raízes, conseguiram em média 2,9 em meio de cultivo sem reguladores de crescimento para as duas cultivares estudadas. Barboza et al. (2004) observaram que os brotos do híbrido PE x SC-52 e da cultivar Smooth Cayenne multiplicados na presença de BAP a 2 mg.L⁻¹ apresentaram melhor desempenho na rizogênese *in vitro*, independentemente da presença ou ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo. Para Piza et al. (2001), o meio de cultivo suplementado de 2 mg.L⁻¹ de ANA, foi o mais eficiente no enraizamento de plântulas da cultivar Smooth Cayenne.

• Aclimação

Os resultados relativos à aclimação das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, são apresentados na Tabela 17 e nas Figuras 9 e 10 do apêndice.

Tabela 17. Valores médios de altura da planta (AP), número de folhas (NF) e matéria seca (MS) das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, em função de diferentes substratos durante a aclimação

Tratamentos				Variáveis		
S	EB	V	CO	AP (cm)	NF (unidade)	MS (mg)
100	-	-	-	8,25 f	9,10 e	491,87 h
-	100	-	-	10,25 e	14,30 ab	901,78 d
-	-	100	-	6,22 h	8,20 e	422,41 i
-	-	-	100	15,15 a	15,30 a	1256,91 a
50	50	-	-	14,17 b	14,90 a	1181,01 b
50	-	50	-	7,16 g	8,90 e	480,35 h
50	-	-	50	13,17 c	14,50 a	1102,00 c
40	30	30	-	11,15 d	11,80 d	605,31 g
40	30	-	30	14,18 b	13,10 bc	883,73 d
40	-	30	30	13,29 c	11,90 cd	723,88 f
25	25	25	25	14,18 b	13,00 cd	786,65 e
DMS				0,20	1,27	28,43

As médias seguidas de letras distintas, na vertical, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A variável altura da planta apresentou o melhor resultado quando aclimatada somente em composto orgânico. Não se observa diferença entre os tratamentos 5, 9 e 11, compostos de 50% de solo + 50% de esterco bovino, 40% de solo + 30% de esterco bovino + 30% de composto orgânico e 25% de solo + 25% de esterco bovino + 25% de vermiculita + 25% de composto orgânico, respectivamente. O substrato que promoveu a menor altura das plantas aclimatadas foi o que continha 100% de vermiculita. Em relação ao número de folhas, verificam-se semelhanças entre os tratamentos 2, 4, 5 e 7, que contêm 100% de esterco bovino, 100% de composto orgânico, 50% de solo + 50% de esterco bovino e 50% de solo + 50% de composto orgânico, respectivamente, enquanto o pior desempenho com relação ao número de folhas foi constatado nos tratamentos compostos 100% de solo, 100% de vermiculita e 50% de solo + 50% de vermiculita.

Para a variável matéria seca destaca-se o tratamento com 100% de composto orgânico, seguido do tratamento que contém 50% de solo + 50% de esterco bovino; tem-se, ainda, que a menor produção de matéria seca foi obtida no substrato com 100% de vermiculita. Fauth et al. (1994) obtiveram o melhor desenvolvimento em mudas micropropagadas de abacaxizeiro, em misturas de solo/xaxim/turfa e solo/xaxim/areia/húmus, sem afetar o índice de sobrevivência. Souza Júnior et al. (2001) verificaram que os substratos contendo areia/xaxim/húmus e Plantmax proporcionaram maior crescimento e desenvolvimento de plântulas de abacaxizeiro cv. Pérola, produzidas *in vitro*, na fase de aclimação. A presença de matéria orgânica favorece o crescimento da parte aérea e raiz na aclimação de plantas da cultivar Pérola de abacaxizeiro (MOREIRA et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

- A concentração de 2% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos proporcionou o menor índice de contaminação sem afetar a sobrevivência das gemas axilares desinfestadas;
- O estabelecimento de gemas axilares da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro pode ser realizado em meio de cultivo sem reguladores de crescimento;
- O estiolamento *in vitro* de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 pode ser obtido eficazmente em meio de cultivo MS suplementado com 1,86 mg.L⁻¹ do ácido naftalenoacético;
- O meio de cultivo MS suplementado com 1,8 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP promove o maior número de regeneração de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 por broto e por nó estiolado;
- O meio de cultivo MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA é o mais indicado para multiplicação de plântulas da cv. EMEPA 1 de abacaxizeiro;
- Para o alongamento o meio de cultura MS sem diluição proporciona o maior crescimento das plântulas micropropagadas;
- A adição do ácido naftalenoacético promove o aumento no número e a diminuição do tamanho das raízes das plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1;
- O composto orgânico favorece o crescimento e o desenvolvimento de plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, regeneradas *in vitro*, na fase de aclimação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHION, D.; BEAUCHESNE, G. Utilization de la technique de culture sterile d'organes pour des clones d'*Ananas*. **Fruits**, Paris, v. 15. n. 10, p. 464-466, 1960.

ALBUQUERQUE, C.C. **Estudos de cultivares de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr.) propagadas in vitro quanto à resistência a fusariose**. 1998. 85f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Rural de Pernambuco, Recife, 1998.

ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v. 57, n. 2, p. 363-366, 2000.

ALMEIDA, W.A.B. de; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.A.P. de C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 2, p. 296-300, 2002.

BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 3, p. 417-423, 2001.

BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S.; SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PE x SC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 8, p. 725-733, 2004.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BARROSO, P.A.V.; MOURA, G.E.D.D.; BRITO, L.K.F.; MARTINS, C.P.; MACEDO, C.E.C.; LOPES, D.B.; ALLOUFA, M.A.I. Efeito do cultivo *in vitro* na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 7, n. 3, p. 473-477, 2003.

CABRAL, J.R.S.; CUNHA, G.A.P.; RODRIGUES, E.M. Micropropagação do abacaxizeiro. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1983, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: SBF, 1984. v. 1, p. 124-127.

CUNHA, G.A.P. da; REINHARDT, D.H.R.C. **Manejo de mudas de abacaxi**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMPF, 2004. 4p. (EMBRAPA-CNPMPF: Comunicado Técnico, 105).

CUNHA, G.A.P. da. **Estatística de abacaxi no Brasil – 2005**. Disponível em: <http://www.cnpmpf.embrapa.br/informativos/abacaxi/abacaxi_online_v4_2_06.pdf>. Acesso em: 15 de set. de 2006.

DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P.; PINTO, A. de A.; NODARI, R.O. Otimização do protocolo regenerativo *in vitro* para o abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 1996. 561p.

DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; BELÓ, A.; FEUSER, S.; OLIVEIRA, E.N.; BRANCHER, A.; ZAFFARI, G.R.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 80-85, 2000.

DAL VESCO, L.L.; PINTO, A. de A.; ZAFFARI, G.R.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. dos; GUERRA, M.P. **Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation**. Disponível em: <<http://www.fruits-journal.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=>

129&url=/articles/fruits/pdf/2001/03/dealvesco.pdf>. Acesso em: 05 de abr. 2007.

FAUTH, A.; TOFOL, A.L.M.; MARASCHIN, S. e M. Aclimação de mudas de abacaxi [*Ananas comosus* (L.) Merrill] resistentes à fusariose, cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 16, n. 2, p. 7-12, 1994.

FEUSER, S.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 1, p. 006-010, 2001.

FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective in vitro propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 9, p. 844-850, 2003.

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

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, set. 1999.

LIU, L.J.; ROSA-MARQUEZ, E.; LIZARDI, E. *In vitro* propagation of spineless Red Spanish pineapple. **Phytopathology**, St. Paul, v. 12, n. 77, p. 17-21, 1988.

MACÊDO, C.E.C. de; SILVA, M.G. da; NÓBREGA, F.S. da; MARTINS, C.P.; BARROSO, P.A.V.; ALLOUFA, M.A.I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

MARCIANI-BENDEZÚ, J.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 12, n. 1, p. 35-39, 1990.

MATHEWS, V.H.; RANGAN, T.S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explants *in vitro* culture of pineapple. **Science Horticulturae**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 319-328, 1979.

MATOS, A.P. de; CABRAL, J.R.S. **Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro**. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/abacaxi_32.pdf>. Acesso em: 10 de abr. 2007.

MOGOLLÓN, N.; DÍAZ, J.G.; HERNANDEZ, N. **Multiplificación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. “Queen Australia”**. Disponível em: <http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/suplemento_2004/Mogollon%20et%20al.pdf>. Acesso em: 30 de jun. 2006.

MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G. de; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, MG, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

MOREIRA, M.A.; CARVALHO, J.G. de; PASCOAL, M.; FRÁGUAS, C.B.; SILVA, A.B. da. Efeito de substratos na aclimação de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, MG, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

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

OMOKOLO, N.D.; TITA, M.A.; NIEMENAK, N. **Régénération directe *in vitro* de l'*Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne à partir de couronnes cultivées em milieu liquide**. Disponível em: < <http://www.fruits-journal.org/index.php?option=>

article&access=doi&doi=10.1051/fruits:2001104>. Acesso em: 15 de jan. 2006.

PASQUAL, M.; MOREIRA, M.A.; SOBRINHO, A. dos A. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.

PIZA, I.M. de T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Reguladores Vegetais na Micropropagação do Abacaxizeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 48, n. 280, p. 681-690, 2001.

PRAXEDES, S.C.; SILVA Jr., A.F. da; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M. de L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. de. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, RN, v. 14, n. 1/2, p. 13-15, 2001.

RAMÍREZ, B.R.; BOCARDO, L.E. **Micropropagación y formación de callo de dos cultivares de piña champaka y md2**. Disponível em: <<http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/cont2003.pdf>>. Acesso em: 12 de jan. 2006.

ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 66p.

SÁ, M.E.L. de; PEREIRA, F.D.; BRAGA, M.F.; MUSTAFÁ, P.C.; ALVES, A.P. Propagação *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus*) por meio de segmentos estiolados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 21.

SÁ, M.E.L. Propagação *in vitro* de diferentes genótipos de abacaxizeiro por meio de seccionamento de plântulas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2001.

SANTOS, B.A.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; VALE, F.X.R. Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl,

em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p. 101-103, 2002.

SILVA, A.B. da; PASCOAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; MOREIRA, M.A.; DUTRA, L.F. Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, MG, v. 26, n. 6, p. 1190-1196, Nov./dez. 2002.

SOUZA JÚNIOR, E.E. de; BARBOZA, S.B.S.C.; SOUZA, L.A.C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, GO, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SPIRONELLO, A.; BORTOLETTO, N.; SIGRIST, J.M.M.; NAGAI, V. Avaliação agrotecnológica e do ciclo de variedades de abacaxizeiro, em duas densidades, em Votuporanga (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 343-355, 1997.

SPIRONELLO, A.; NAGAI, V.; TEOFILIO SOBRINHO, J.; TEIXEIRA, L.A.J.; SIGRIST, J.M.M. Avaliação agrotecnológica de variedades de abacaxizeiro, conforme os tipos de muda, em Cordeirópolis (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 333-342, 1997b.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, n. 19, p. 42-47, 2001a.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosa**. Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20Batista%20Teixeira.pdf>. Acesso em: 12 de fev. 2006.

TENG, W.L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 454-457, 1997.

VENTURA, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro***. 1994. 111f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

WEBER, O.B.; TERAPO, D.; ROCHA, L.S.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. de S. Efeito de bactérias diazotróficas na produção de abacaxizeiro “Cayenne Champac”, sob irrigação, em dois níveis de abubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 2, p. 249-253, 2004.

CAPÍTULO 2

CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ABACAXIZEIRO OBTIDAS POR POLINIZAÇÃO LIVRE

1 RESUMO

MORAES, Ailton Melo de. **Crioconservação de sementes de abacaxizeiro obtidas por polinização livre**. Areia: UFPB/CCA, 2007. p. 35-63. (Tese-Doutorado em Agronomia).

O abacaxi pertence à família *Bromeliaceae*, subclasse das monocotiledôneas, a qual compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1.700 espécies de plantas herbáceas. Visando contribuir para o estabelecimento de métodos de conservação de sementes de abacaxizeiro; objetivou-se com este trabalho, avaliar a qualidade fisiológica das sementes de abacaxizeiro, com diferentes teores de umidade, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. As sementes de abacaxizeiro, adquiridas pelo método de polinização livre, foram caracterizadas mediante teste de germinação, vigor (matéria seca), teor de umidade e peso de 1.000 sementes. No estabelecimento do teor limite de umidade para crioconservação (TLUC) a umidade dos lotes de sementes foi ajustada para 6, 8, 10, 12, 13,46 e 15% b.u. e, em seguida, elas foram armazenadas 3 dias a ± 25 °C, -18 °C, -150 °C e -196 °C; posteriormente, as sementes com teores de umidade de 8, 10 e 12% b.u., foram crioconservadas (CR) a essas temperaturas, pelo tempo de 3, 45, 90 e 135 dias. O delineamento estatístico utilizado nos dois casos (TLUC e CR) foi o inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial com 4 repetições de 30 sementes por repetição. Os esquemas fatoriais utilizados foram: TLUC: 6 x 3, representado por 6 teores de umidade das sementes (6, 8, 10, 12, 13,46 e 15 % b.u.) e 3 temperaturas criogênicas (-18, -150 e -196 °C) e CR: 3 x 4 x 4, representado por 3 teores de umidade (8, 10 e 12 % b.u.), 4 temperaturas (± 25 , -18, -150 e -196 °C) e 4 períodos de armazenamento (3, 45, 90 e 135 dias). Concluiu-se, que o teor limite de umidade para a crioconservação de sementes de abacaxizeiro se encontra entre 6 e 13,46% base úmida; as sementes de abacaxizeiro obtidas pelo método da polinização livre podem ser classificadas como ortodoxas; a germinação e o vigor das sementes de abacaxizeiro com teores de umidade entre 8 e 12% base úmida não são afetados com a exposição a temperaturas criogênicas.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, sementes, crioconservação, nitrogênio líquido.

CRYOCONSERVATION OF PINEAPPLE SEEDLINGS OBTAINED VIA FREE POLINIXATION

1 SUMMARY

MORAES, Ailton Melo de. **Cryoconservation of pineapple seedlings obtained via free polinixation**. Areia: UFPB/CCA, 2007. p. 35-63. (Doctorate thesis in Agronomy).

The pineapple comes from *Bromeliaceae* species, subclass of *monocotiledoneas*, and comprises about 46 genders and around 1,700 species of herbaceous plants. This work aims to contribute to the establishment of conservation methods of pineapple seeds besides evaluating the physiological quality of these seeds with different moisture contents, submitted to different temperatures and storage periods. Obtained from the free pollination method, pineapple seeds were characterized under germination test, strength (dry material), moisture contents and weight of 1,000 seeds. To establish content limit of moisture conservation for cryoconservation, the moisture in the lots of seeds was adjusted to 6, 8, 10, 12, 13, 46 and 15% b.u. Then, the seeds were stored for three days at $\pm 25^{\circ}\text{C}$, -18°C , -150°C and -196°C . After that, the seeds with moisture contents at 8, 10, and 12% b.u. were cryoconserved (CR) at these temperatures for 3, 45, 90 and 135 days. The statistic plan used for both cases (TLUC and CR) was that completely randomized design presented in factorial scheme with four repetitions of 30 seeds per repetition. The factorial schemes used were TLUC: 6×3 represented by 6 moisture contents of seeds (6, 8, 10, 12, 13, 46, and 15% b.u.) and 3 cryogenic temperatures (-18 , -150 , and -196°C) and CR: $3 \times 4 \times 4$ represented by 3 moisture contents (8, 10, 12% b.u.), 4 temperatures (± 25 , -18 , -150 and -196°C) and 4 storage periods (3, 45, 90 and 135 days). It was concluded that the content limit of moisture for seed cryoconservation of pineapple is between 6 and 13, 46% of humid basis; The pineapple seeds obtained through the free pollination method can be classified as orthodox; the germination and strength of the pineapple seeds with moisture content between 8 and 12 % with humid basis are not affected by expositions at cryogenic temperatures.

Keywords: *Ananas comosus*, seeds, cryoconservation, liquid nitrogen.

CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ABACAXIZEIRO OBTIDAS POR POLINIZAÇÃO LIVRE

3 INTRODUÇÃO

O abacaxi, ou ananás (*Ananas comosus* (L.) Merrill) tem o nome originário do tupi-guarani e significa fruta cheirosa; pertence à família *Bromeliaceae*, subclasse das monocotiledôneas, a qual compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1.700 espécies de plantas herbáceas (QUEIROZ et al., 2003).

Cunha e Cabral (1999), revisando sobre a origem do abacaxizeiro relatam que esta planta é originária da região compreendida entre 15° N e 30° S de latitude e 40° L e 60° W de longitude, o que inclui as zonas central e sul do Brasil, o nordeste da Argentina e o Paraguai; sendo o Brasil, provavelmente, o país de origem do abacaxi.

No cenário mundial, o Brasil é o terceiro maior produtor de abacaxi com uma produção estimada em 1.400.190 toneladas de frutas por ano, destacando-se os estados da Paraíba, Pará e Minas Gerais, com uma produtividade de 325,612; 268,124 e 222,951 mil frutos, respectivamente (CUNHA, 2006).

O fruto das cultivares comerciais do abacaxizeiro é partenocárpico, isto é, formado sem fecundação devido à auto-incompatibilidade, não havendo produção de sementes; contudo, esta auto-incompatibilidade pode ser superada mediante o cruzamento de duas cultivares possibilitando a reprodução sexuada (originando sementes) e, conseqüentemente, a recombinação genética (LUZ et al., 1999).

Cabral (1999) descreve que as sementes de abacaxi como pequenas, medindo em média 5 mm de comprimento por 2 mm de largura; o tegumento é marrom e coriáceo; em geral são viáveis, aparentemente não exibem dormência e o poder germinativo diminui após alguns meses de armazenamento (LOISON-COBOT, 1990); entretanto, para outros autores as porcentagens de germinação das sementes de abacaxi são muito baixas devido à dureza do tegumento (MILES e HOLMES, 1930), dependendo a germinação dos procedimentos físicos, mecânicos e das condições de incubação (WEAVER, 1982).

Para Giacomelli (1974), o processo germinativo das sementes de abacaxi é bastante lento e desuniforme, iniciando a germinação aos 30 dias, após a semeadura, estabilizando-se aos 50 dias.

O método mais recomendado para superar a dormência das sementes de abacaxizeiro é a imersão em ácido sulfúrico (COLLINS, 1960); no entanto, não proporciona bons resultados (CABOT, 1989), já que a baixa percentagem de germinação de sementes continua sendo um grande problema para os melhoristas que utilizam os cruzamentos interespecíficos e intervarietais para obterem cultivares selecionadas (LUZ et al., 1999).

Apesar da existência de muitas variedades de abacaxi, a produção comercial é baseada nas cultivares Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Española Roja e Pérola (LEAL e COPPENS d'EECKENBRUGGE, 1996). Entre as cultivares de abacaxi mais cultivadas no Brasil se destacam Smooth Cayenne e Pérola, em que a cultivar Pérola representa 80% da produção nacional (REINHARDT e SOUZA, 2000).

Cabral et al. (2004) advertem que o predomínio de uma ou poucas cultivares para exploração comercial nos principais países produtores, a substituição de cultivares locais por outras de importância comercial mais ampla e o desmatamento acelerado que vem ocorrendo nos centros de diversidade do gênero, têm causado erosão genética em *Ananas comosus* e espécies afins de interesse para os programas de melhoramento genético. A inadequação de métodos de conservação de germoplasma, a eliminação de material de melhoramento, o aumento da população, a industrialização, as calamidades naturais e a expansão da fronteira agrícola, também contribuem para o desaparecimento dos recursos fitogenéticos (CHOER, 2001).

A conservação de recursos genéticos implica na manutenção de coleção *in situ*, ou seja, nos seus locais de ocorrência, ou *ex situ*, caso em que podem ser mantidos indivíduos, sementes, embriões ou outras estruturas vegetais, sob diferentes condições, dependendo do material utilizado no campo ou em casas de vegetação, em câmaras secas sob baixa temperatura, em meio de cultura com baixa concentração salina (conservação *in vitro*) ou criopreservadas (VIEIRA, 2000).

Para o Internacional Board for Plant Genetic Resources - IPBGR (1982), a crioconservação é uma técnica indicada para as espécies de propagação vegetativa,

espécies com sementes recalcitrantes, germoplasmas raros ou mesmo espécies ameaçadas de extinção e espécies de plantas silvestres; além disso, a conservação em nitrogênio líquido também pode ser usada para espécies de sementes de importância agrônômica (STANWOOD, 1980, 1985 e 1987).

Em geral, o armazenamento de sementes de muitas espécies se faz em temperatura e umidade baixas podendo, desta forma, serem preservadas por décadas e, mais tarde, germinadas, sem prejuízo de sua viabilidade (FAIAD, 1998; SANTOS, 2003). Esta forma de conservação de recursos genéticos é considerada econômica e segura (SLAGEREN, 2002); contudo, para que seja feita corretamente é necessário o conhecimento do comportamento das sementes durante a secagem e armazenamento (HONG et al., 1996).

A criopreservação é a conservação de material biológico a temperaturas extremamente baixas, em geral em nitrogênio líquido (-196°C); a esta temperatura reações metabólicas e deterioração biológica ocorrem muito lentamente ou são completamente suspensas; em decorrência disto, a criopreservação assegura alta estabilidade genética e integridade biológica do material conservado (MEDEIROS e CAVALLAR, 1992; SANTOS, et al., 2002).

Ante o exposto e visando contribuir para o estabelecimento de métodos de conservação de sementes de abacaxizeiro, neste trabalho se objetivou avaliar a qualidade fisiológica das sementes de abacaxizeiro, com diferentes graus de umidade, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no departamento de Fitotecnia da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB, e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Estação Experimental de Mangabeira, pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado da Paraíba-EMEPA/PB.

4.1 Sementes

As sementes de abacaxizeiro utilizadas foram adquiridas pelo método de polinização livre, em campos experimentais do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMP/EMBRAPA), Cruz das Almas, BA (Figura 1).



Figura 1. Sementes de abacaxizeiro produzidas pelo método da polinização livre

Inicialmente, avaliou-se a qualidade das sementes, mediante teste de germinação, vigor (matéria seca) e determinação do teor de umidade e peso de 1.000 sementes, obedecendo às recomendações prescritas nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992); essas análises e determinações foram realizadas sem que as sementes recebessem qualquer tipo de tratamento e os resultados foram tomados para o início dos trabalhos.

O peso das 1.000 sementes, expresso em grama, foi obtido de toda a semente pura, por contagem, proveniente de análise de pureza em que o número de decimais foi mantido através da fórmula (BRASIL, 1992):

$$\text{Peso de 1.000 sementes} = \frac{\text{Peso da amostra} \times 1.000}{\text{Número total de sementes}}$$

O teor de umidade (%) foi obtido mediante o método oficial de estufa, prescrito nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), a 103 ± 2 °C durante 17 ± 1 horas, utilizando-se 4 repetições de 100 sementes, em que o teor de umidade expresso em base úmida foi obtido por meio da expressão:

$$\% \text{ de Umidade (U)} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

em que:

P_i = Peso inicial (g)

P_f = Peso final (g)

O teste de germinação foi conduzido com 4 repetições de 30 sementes cada uma, que, após terem sido desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 10 minutos e, posteriormente, lavadas 3 vezes consecutivas com água destilada e esterilizada, para eliminar os resíduos do NaClO, foram semeadas em placa de *Petri*, com 9 cm de diâmetro, sobre 3 discos de papel *germitest* umedecidos com água destilada e deionizada, utilizando-se câmara de fluxo laminar. As placas de *Petri* foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C, intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz (Figuras 2).

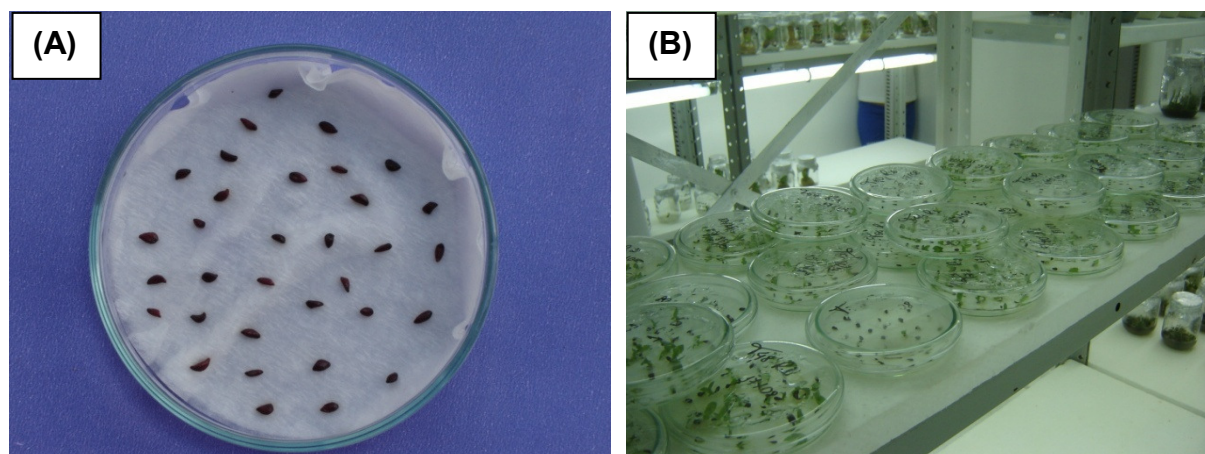


Figura 2. Sementes de abacaxizeiro semeadas em placa de *Petri* (A); Placas de *Petri* em sala de crescimento (B)

As contagens e apreciações das plântulas normais seguiram as prescrições das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), em que foram consideradas normais as plântulas compostas por primórdios de raízes, caules e folhas, medindo aproximadamente 0,5 cm de altura. Os testes foram finalizados quando ocorreu a estabilização da germinação, ou seja, aos 50 dias da semeadura, conforme Figura 3.



Figura 3. Plântulas de abacaxizeiro aos 50 dias da semeadura, compostas por primórdios de raízes, caule e folhas

Para o Peso da Matéria Seca de Plântulas (PMSP) utilizaram-se as mesmas plântulas normais dos testes de germinação, que foram retiradas das placas de *Petri*, contadas, pesadas e colocadas em sacos de papel, separadas por tratamentos e repetições; em seguida, postos para secar em estufa termoeleétrica

regulada a 80 °C, durante 24 horas; após este período as amostras foram retiradas da estufa e colocadas para esfriar em dessecador durante 30 minutos; em seguida, o material vegetal contido nos sacos de papel foi pesado, determinando-se o peso da matéria seca total das plântulas normais por repetição, expresso em g/repetição e se obtendo o peso médio da matéria seca das plântulas pela média aritmética das repetições conforme Nakagawa, 1994 (Figura 4).

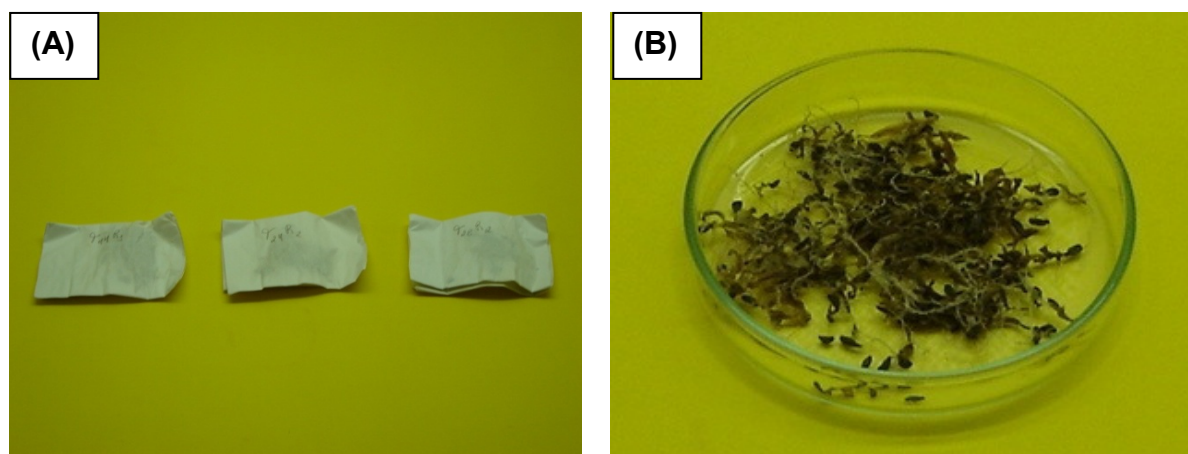


Figura 4. Sacos de papel contendo plântulas normais (A); Matéria seca (B)

4.2 Teor Limite de Umidade para Crioconservação (TLUC)

Na determinação do TLUC se formaram 18 lotes de 120 sementes cada um, os quais foram submetidos aos processos de hidratação ou secagem, até alcançarem os teores de umidade estabelecidos para a instalação dos diferentes ensaios de TLUC (6; 8; 10; 12; 13,46 e 15 % b.u.). A perda ou ganho de água pelas sementes foi determinada mediante a expressão matemática (ALMEIDA et al., 2006):

$$Pf = Pi \frac{100 - Xi}{100 - Xf}$$

em que:

Pf = peso final da amostra (g)

Pi = peso inicial da amostra (g)

Xi = teor de umidade (b.u.) inicial das sementes (%)

Xf = teor de umidade (b.u.) desejado das sementes (%)

Para a secagem, as sementes foram colocadas em um dessecador de vidro (Figura 5) que continha, como agente dessecante, sílica gel amorfa e pesadas a cada hora, até que atingissem os pesos referentes aos teores de água desejados; para este fim, se utilizou uma balança semi-analítica, modelo Marte AL 200C, com precisão de 0,001 g.

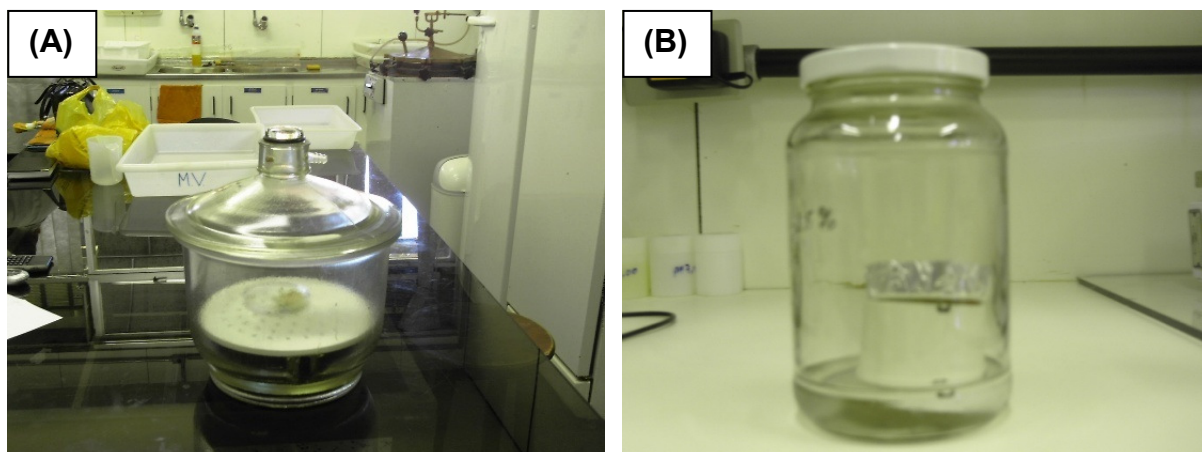


Figura 5. Dessecador de vidro contendo sílica gel utilizado na secagem das sementes (A); hidratação das sementes em recipiente de vidro (B)

No umedecimento das sementes as amostras foram colocadas em pequenas cestas de alumínio, suspensas por um anel de PVC no interior de recipientes de vidro, hermeticamente fechados, contendo 1/5 do seu volume de água destilada (Figura 5). Os recipientes foram postos em uma câmara regulada a 10 °C; referidas cestas com as sementes foram pesadas a cada 2 horas, através de uma balança semi-analítica, modelo Marte AL 200C, com precisão de 0,001 g.

Para cada teor de umidade (6, 8, 10, 12, 13,46 e 15 % b.u.) as sementes foram acondicionadas em embalagens confeccionadas com papel, papel alumínio e plástico, para proporcionar o isolamento hidro e termodinâmico e, em seguida, submetidas ao congelamento em freezer (-18 °C); no vapor do N₂L (-150 °C) e no N₂L (-196 °C) por 03 dias; decorrido este período criogênico, as sementes foram reaquecidas a temperatura ambiente (± 25 °C) e avaliada sua qualidade fisiológica, através da germinação e do vigor (matéria seca) estabelecendo-se, assim, o TLUC (Figura 6).

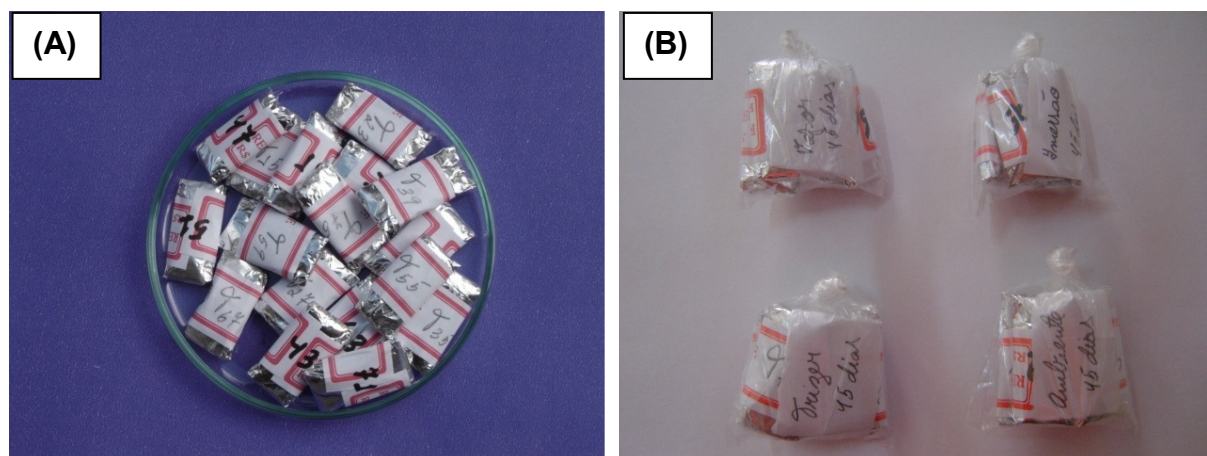


Figura 6. Embalagens multifolares compostas de papel, papel alumínio e plástico (A e B)

4.3 Crioconservação das sementes de abacaxizeiro

As sementes com teores de umidade de 8, 10 e 12 % b.u. foram acondicionadas em embalagens, conforme descrito anteriormente e, em seguida, armazenadas a ± 25 °C (ambiente); -18 °C (freezer); -150 °C (vapor do N₂L) e -196 °C imersão no N₂L), pelo tempo de 3, 45, 90 e 135 dias.

Transcorrido cada tempo de armazenamento, as sementes crioconservadas foram submetidas a descongelamento a temperatura ambiente ± 25 °C, durante 12 horas para, em seguida, submetê-las aos testes de germinação e vigor (matéria seca), seguindo-se os procedimentos já descritos.

4.4. Procedimentos estatísticos

Tanto para o teor limite de umidade para crioconservação (TULC) quanto para a crioconservação, o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial com 4 repetições de 30 sementes por repetição; os esquemas fatoriais utilizados, foram:

- Teor limite de umidade para crioconservação (TLUC): 6 x 3, representado por 6 teores de umidade das sementes (6, 8, 10, 12, 13,46 e 15 % b.u.) e 3 temperaturas criogênicas (-18, -150 e -196 °C);

- Crioconservação: 3 x 4 x 4, representado por 3 teores de umidade (8, 10 e 12 % b.u.), por 4 temperaturas (± 25 , -18, -150 e -196 °C) e 4 períodos de armazenamento (3, 45, 90 e 135 dias).

A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 1 e 5 % de probabilidade. Determinaram-se as regressões quadráticas na análise de variância e se estabeleceram os coeficientes de determinação R^2 (Tabela 7 do apêndice).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sementes

A caracterização das sementes de abacaxizeiro obtidas pelo método da polinização livre, provenientes de campos experimentais do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF-EMBRAPA), Cruz das Almas, BA, apresentou o peso de 1.000 sementes em torno de 6,34 g, com teor de umidade de 13,46% b.u.; a germinação foi de 90% e o vigor de 0,17 g de matéria seca, pela média aritmética das repetições.

5.2 Teor Limite de Umidade para Crioconservação (TLUC)

Pela análise de variância, observam-se valores significativos pelo Teste F para a germinação e matéria seca das sementes de abacaxi, nas variáveis teor de umidade e temperatura de crioconservação e também, para sua interação (Tabela 1). O resultado para a interação teor de umidade versus temperatura de crioconservação indica que o comportamento de uma variável interfere na outra.

Tabela 1. Análise de variância da viabilidade das sementes de abacaxizeiro, armazenadas a três temperaturas criogênicas (-18, -150 e - 196 °C), durante três dias

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	GERMINAÇÃO F	MATÉRIA SECA F
Teor de umidade (Tu)	5	169,32**	128,40**
Temperatura de crioconservação (Tc)	2	15,47**	4,10*
Tu x Tc	10	54,88**	17,36**
Resíduo	54		
Total	71		

**, * Significativo a 1 e 5 % de probabilidade

A viabilidade das sementes de abacaxizeiro, com diferentes teores de umidade, após a crioconservação em freezer, no vapor e na imersão em N₂L, por três dias, está representada na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios da germinação e da matéria seca das sementes de abacaxizeiro, revelados pela interação *teor de umidade* versus *temperaturas criogênicas*, depois de três dias de crioconservação

GERMINAÇÃO (%)				
Teor de umidade (% b.u.)	Temperaturas criogênicas (°C)			Média
	-18	-150	-196	
15	89,00 dA	88,00 dA	83,00 eB	86.66
13,46	91,00 cB	94,00 bA	88,00 dC	91.00
12	94,00 bB	98,00 aA	94,00 bB	95.33
10	96,00 aA	91,00 cB	97,00 aA	94.66
8	96,00 aA	92,00 cB	91,00 cB	93.00
6	88,00 dC	91,00 cB	94,00 bA	91.00
Média	92.33	92.33	91.16	91.94

DMS/colunas = 1.751 (letras minúsculas) DMS/linhas = 1.429 (letras maiúsculas)

MATÉRIA SECA (g)				
Teor de umidade (% b.u.)	Temperaturas criogênicas (°C)			Média
	-18	-150	-196	
15	0.12 cA	0.10 dB	0.10 dB	0.106
13,46	0.15 bA	0.16 bA	0.16 bA	0.156
12	0.18 aA	0.19 aA	0.19 aA	0.186
10	0.12 cA	0.15 bA	0.13 cB	0.133
8	0.14 bC	0.19 aA	0.16 bB	0.163
6	0.17 aA	0.13 cB	0.17 bA	0.156
Média	0.146	0.153	0.151	0.15

DMS/colunas = 0.017 (letras minúsculas) DMS/linhas = 0.014 (letras maiúsculas)

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A maior porcentagem da germinação das sementes é observada entre 8 e 12% b.u. de umidade, tendo atingido 96, 98 e 97% de germinação nas temperaturas criogênicas de -18, -150 e -196 °C, respectivamente; para matéria seca, os melhores resultados se revelaram nos teores de umidade de 6, 8 e 12% b.u., com 0,17, 0,19, 0,18 e 0,19 g de matéria seca, nas temperaturas -18, -150 e -18, -150 e -196 °C, respectivamente.

As sementes com teor de umidade de 15% b.u. obtiveram melhor taxa de germinação quando crioconservadas a -18 e -150 °C; a produção de matéria seca foi maior na crioconservação no vapor do N₂L (-150 °C) e não se verifica diferença significativa no vigor das plântulas produzidas de sementes crioconservadas em freezer (-18 °C) e na imersão no N₂L (-196 °C).

Para as sementes com teor de umidade de 13,46% b.u., a melhor germinação foi notada na crioconservação no vapor do N₂L (-150 °C), não havendo diferença significativa na produção de matéria seca nas três temperaturas de armazenamento, fato este também verificado nas sementes com 12% b.u. de umidade; não se verifica, portanto, diferença significativa entre as temperaturas criogênicas -18 e -196 °C na germinação das sementes com 10% b. u. de umidade, sendo que a produção de matéria seca foi maior nas plântulas de sementes submetidas a -150 °C de temperatura.

Com 8% b.u. de umidade, as sementes congeladas na freezer (-18 °C) apresentaram uma porcentagem maior de germinação; entretanto, o vigor (matéria seca) obteve maior incremento de peso nas plântulas produzidas de sementes congeladas a -150 °C.

O melhor desempenho da germinação das sementes de abacaxi com o teor de umidade de 6% b.u. foi obtido nas sementes imersas no N₂L; em relação à produção de matéria seca não existe diferença significativa entre as plântulas de sementes crioconservadas a -18 e -196 °C, resultados esse compatíveis com os obtidos por Moraes (2001) e Almeida et al. (2002), em estudos relacionados com o teor limite de umidade para crioconservação em duas variedades de mamona (nordestina e pernambucana), em que os autores referidos observaram que sementes podem ser crioarmazenadas com o teor de umidade entre 4 e 10% base úmida; esta indicação também encontra apoio nos trabalhos desenvolvidos com

Sesamum indicum, por Batista (2000) e Almeida et al. (2000) em 10 leguminosas crioconservadas com teores de umidade entre 6 e 7% b.u.

Carvalho et al. (2006), classificam como ortodoxas as sementes de *Aspidosperma polyneuron*, *Myroxylon peruiferum* e *Tabebuia crysotricha*, pelo fato de que elas suportam a secagem e o armazenamento a -18 °C sem prejudicar a viabilidade; da mesma forma, as sementes de abacaxi se comportaram como sementes ortodoxas, haja vista que apresentaram tolerância à dessecação reduzindo provavelmente, o metabolismo, até níveis mínimos, permitindo que as sementes permaneçam vivas retornando o metabolismo direcionado para o processo de germinação, após a hidratação, o que está plenamente de acordo com as observações de Bewley e Black, 1994.

5.3 Crioconservação das sementes do abacaxizeiro

Observam-se, pelo Teste F da análise de variância (Tabela 3) valores significativos para todas as variáveis e suas interações, exceto para germinação das sementes na interação teor de umidade versus período de armazenamento; ditos resultados indicam que as variáveis estudadas não são independentes, isto é, uma interfere no comportamento da outra.

Os valores médios da viabilidade das sementes de abacaxizeiro com teores de umidade de 8, 10 e 12% b.u., acondicionadas em cápsulas multifolares e armazenadas nas temperaturas ± 25 °C (ambiente), -18 °C (freezer), -150 °C (vapor do N₂L) e -196 °C (imersão no N₂L), durante 3, 45, 90 e 135 dias, são apresentados na Tabelas 4 e nas Tabelas 5 e 6 do apêndice.

As sementes armazenadas no ambiente (± 25 °C) e no vapor do N₂L (-150 °C) obtiveram a melhor porcentagem de germinação, com 12% b.u. de umidade, enquanto as sementes armazenadas na freezer (-18 °C) e na imersão em N₂L (-196 °C) apresentaram a maior germinação quando armazenadas com teor de umidade de 10% b.u. A maior produção de matéria seca foi verificada em sementes armazenadas com teor de umidade de 12% b.u., em todas as temperaturas estudadas (Tabela 4). Segundo Mello (2000) o controle da temperatura e do teor de água nas sementes interfere na conservação, após comprovar a perda da

viabilidade de várias espécies de orquídeas do Cerrado brasileiro, quando armazenadas a 25 °C.

Tabela 3. Análise de variância da viabilidade das sementes de abacaxizeiro com teores de umidade de 12; 10 e 8 % b.u., acondicionadas em cápsulas multifolares e armazenadas em ambiente (± 25 °C); freezer (-18 °C); vapor do N₂L (-150 °C) e imersão no N₂L (-196 °C), durante 3; 45; 90 e 135 dias

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	GERMINAÇÃO F	MATÉRIA SECA F
Teor de umidade (Tu)	2	151,71**	752,11**
Temperaturas de armazenamento (Ta)	3	31,41**	91,72**
Período de armazenamento (Pa)	3	27,67**	66,31**
Tu x Ta	6	144,45**	148,66**
Tu x Pa	6	0,72 ^{ns}	9,37**
Ta x Pa	9	9,57**	33,68**
Tu x Ta x Pa	18	3,24**	5,13**
Resíduo	144		
Total	191		

** * Significativo a 1 e 5 % de probabilidade

As sementes com teor de umidade de 8% b.u. podem ser armazenadas no ambiente e em freezer; não se observa diferença na germinação das sementes crioconservadas no vapor e na imersão no N₂L. A melhor temperatura revelada pela germinação, para o armazenamento das sementes com 10% b.u. de umidade, é -196 °C. Porém, as sementes com 12% b.u. de umidade apresentaram a melhor germinação, quando armazenadas no vapor do N₂L (Tabela 4). Para Walters et al. (1998) a capacidade de armazenamento é ampliada em muitas espécies, quando a redução do teor de água das sementes está associada à diminuição da temperatura de armazenagem.

Em relação à matéria seca as sementes armazenadas com teor de umidade de 8% b.u. apresentam a melhor produtividade quando armazenadas a -150 °C; para

as sementes com 10% b.u. de umidade, observa-se melhor desempenho em relação à matéria seca, quando foram armazenadas em temperatura ambiente (± 25 °C); no entanto, não se constata diferença significativa na matéria seca das plântulas produzidas de sementes armazenadas com 12% b.u. de umidade no vapor e na imersão em N₂L (Tabela 4).

Geralmente, a secagem pode ampliar a longevidade das sementes reduzindo as reações metabólicas e dificultando a ação de microrganismos e insetos prejudiciais à sua conservação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; VILLELA e PERES, 2004). As sementes de abacaxizeiro apresentam comportamento similar aos trabalhos citados, com relação ao teor de umidade e temperatura de armazenamento.

Tabela 4. Valores médios da germinação e da matéria seca das sementes de abacaxizeiro, revelados pela interação teor de umidade versus temperatura de armazenamento

GERMINAÇÃO (%)									
Teor de umidade (% b.u.)	Temperaturas de armazenamento (°C)								Média
	±25		-18		-150		-196		
8	94,00	bA	94,00	bA	91,50	bB	91,50	cB	92,75
10	94,50	bC	95,50	aB	90,50	cD	96,75	aA	94,31
12	96,50	aB	93,25	cC	98,00	aA	93,68	bC	95,35
Média	95,00		94,25		93,33		93,97		94,13
DMS/colunas = 1.630 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 1.630 (letras maiúsculas)				
MATÉRIA SECA (g)									
Teor de umidade (% b.u.)	Temperaturas de armazenamento (°C)								Média
	±25		-18		-150		-196		
8	0,12	cD	0,13	bC	0,18	bA	0,16	bB	0,14
10	0,14	bA	0,11	cB	0,09	cC	0,10	cB	0,11
12	0,15	aB	0,15	aB	0,19	aA	0,19	aA	0,17
Média	0,13		0,13		0,15		0,15		0,14
DMS/colunas = 0.016 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0.016 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados do estudo da influência dos teores de umidade nos períodos de armazenamento de sementes de abacaxizeiro podem ser observados na Figura 1 e na Tabela 5, através da matéria seca.

As sementes de abacaxizeiro armazenadas com teor de umidade de 12% b.u., apresentam-se superiores as demais, na produção de matéria seca, em todos os períodos de armazenamento estudados (Figura 7 e Tabela 5 do apêndice).

Não se nota diferença significativa na matéria seca de plântulas produzidas de sementes armazenadas com 8% b.u. de umidade aos 3, 45 e 90 dias de armazenamento nem entre os períodos: 3, 90 e 135 dias de armazenamento (Figura 7 e Tabela 5 do apêndice).

As plântulas produzidas por sementes armazenadas com 10% b.u. de umidade apresentam maior produção de matéria seca aos 3 e 45 dias de armazenamento, tendendo a diminuir a produção de matéria seca nos dois períodos de armazenamento subseqüentes (Figura 7 e na Tabela 5 do apêndice).

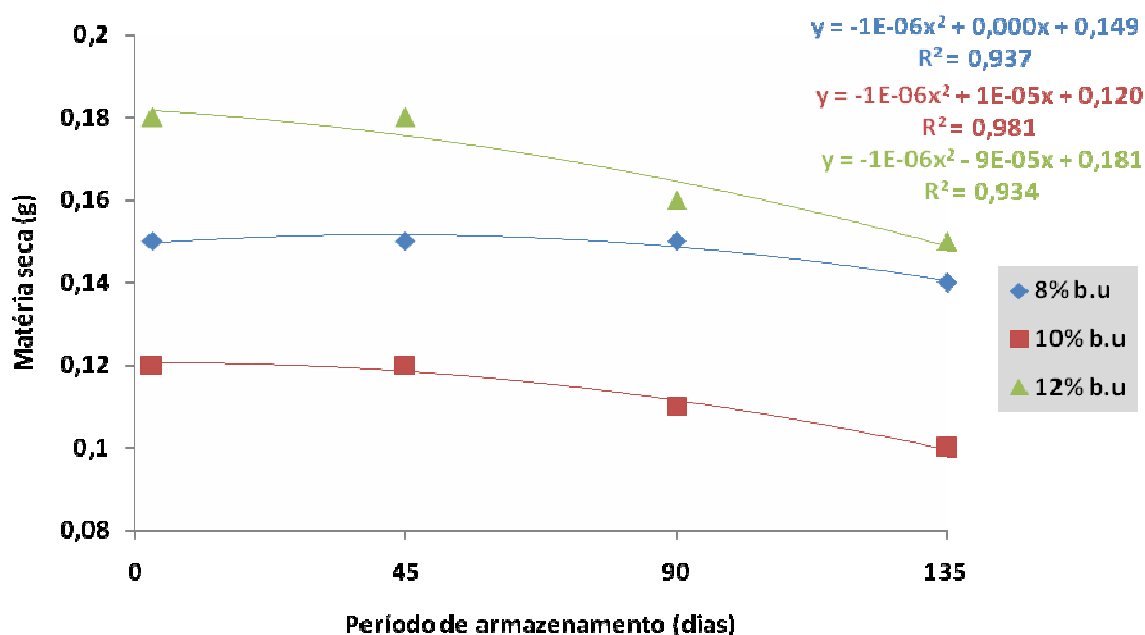


Figura 7. Matéria seca produzida por plântulas provenientes de sementes de abacaxizeiro, após o armazenamento, revelada pela interação *teor de umidade* versus *períodos de armazenamento*

Ainda na Figura 7 e na Tabela 5 do apêndice, observa-se que as sementes armazenadas com teor de umidade de 12% b.u. obtiveram uma produção de matéria seca de 0,18; 0,18; 0,16 e 0,15, nos períodos de armazenamento de 3, 45, 90 e 135 dias, respectivamente. Apesar da não existência de trabalhos com sementes de abacaxizeiro que tratem, especificamente, da influência do teor de umidade nos períodos de armazenamento, esses resultados são similares aos obtidos por Hellmann et al. (2006), que armazenaram sementes de pau-brasil com teor de umidade próximo a 10%, em que no final do segundo ano de armazenamento a -18 °C não observaram diferenças quanto à qualidade fisiológica.

Os valores médios da interação temperatura de armazenamento versus períodos de armazenamento, encontram-se na Tabela 6 do apêndice e nas Figuras 8 e 9, nas quais se verifica diferença significativa entre as temperaturas nos quatro períodos de armazenamento.

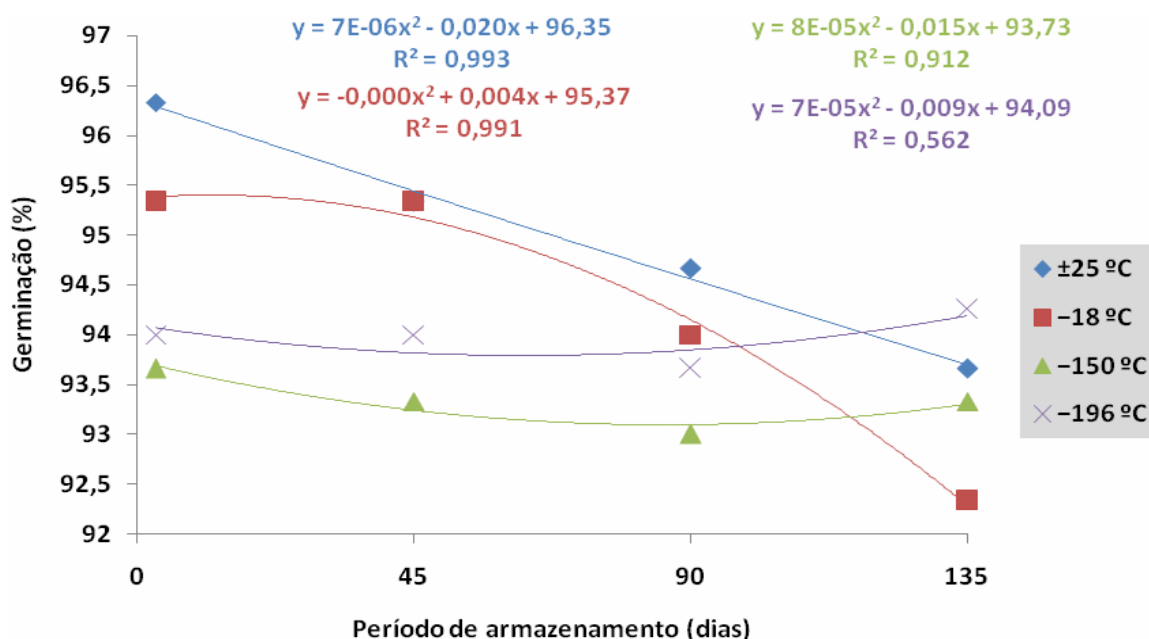


Figura 8. Porcentagem de germinação de sementes de abacaxizeiro após o armazenamento, revelada pela interação *temperaturas de armazenamento* versus *períodos de armazenamento*

Aos 3 dias de armazenamento as sementes de abacaxizeiro tiveram o melhor desempenho na germinação (Figura 8 e Tabela 6 do apêndice), quando armazenadas em temperatura ambiente (±25 °C) e o pior no vapor (-150 °C) e na

imersão (-196 °C) no N₂L; em 45 dias de armazenamento não se observa diferença na germinação entre os armazenamentos em ambiente (±25 °C) e no freezer (-18 °C), nem entre o vapor (-150 °C) e na imersão (-196 °C) em N₂L. Quando armazenadas 90 dias, o melhor desempenho da germinação se apresenta nas sementes armazenadas em ambiente (±25 °C) e no freezer (-18 °C), e o pior no vapor (-150 °C) de N₂L; já aos 135 dias de armazenamento observa-se que a maior porcentagem de germinação se deu nas sementes armazenadas em ambiente (±25 °C) e na imersão (-196 °C) no N₂L, seguidas das sementes armazenadas no vapor (-150 °C) do N₂L e, por último, nas sementes armazenadas no freezer (-18 °C).

As sementes de abacaxizeiro crioconservadas no vapor e na imersão no nitrogênio líquido, apresentaram comportamento distinto aos observados por Batista (2000) que obteve, em duas variedades de *Sesamum indicum*, maior porcentagem de germinação depois de 60 dias das sementes imersas em nitrogênio líquido, frente à germinação calculada aos 5 e 30 dias de crioconservação. Almeida et al. (2000) também observaram respostas heterogêneas para algumas sementes de leguminosas, depois de sua imersão em nitrogênio líquido. Moraes (2001) e Almeida (2002) não notaram diferença significativa na viabilidade das sementes de duas variedades de mamona crioarmazenadas no vapor do nitrogênio líquido, em três períodos de crioarmazenagem; contudo, a -196 °C verificou-se aumento da germinação e da matéria seca aos 30 dias e tendência à estabilização aos 60 dias de armazenamento.

Em relação à matéria seca, as sementes armazenadas 3 dias apresentam o melhor desempenho quando armazenadas na temperatura ambiente (±25 °C) e no vapor (-150 °C) de N₂L; com 45 dias de armazenamento a produção de matéria seca foi igual nas plântulas produzidas por sementes armazenadas em ambiente (±25 °C), no vapor (-150 °C) e na imersão (-196 °C) no N₂L; aos 90 e 135 dias de armazenamento a produção de matéria seca foi maior nas plântulas produzidas de sementes armazenadas no vapor (-150 °C) e na imersão (-196 °C) em N₂L (Figura 9 e Tabela 6 do apêndice).

A produção de matéria seca se manteve estável nos dois primeiros períodos de armazenamento, diminuindo aos 90 e 135 dias nas sementes armazenadas nas temperaturas ambiente (±25 °C) e no freezer (-18 °C). Não se observa diferença

estatística na produção de matéria seca nas sementes armazenadas no vapor (-150 °C) do N₂L nos quatro períodos de armazenamento.

Não se verifica diferença estatística na produção de matéria seca em plântulas produzidas de sementes crioconservadas em N₂L (-196 °C) aos 45, 90 e 135 dias de armazenamento.

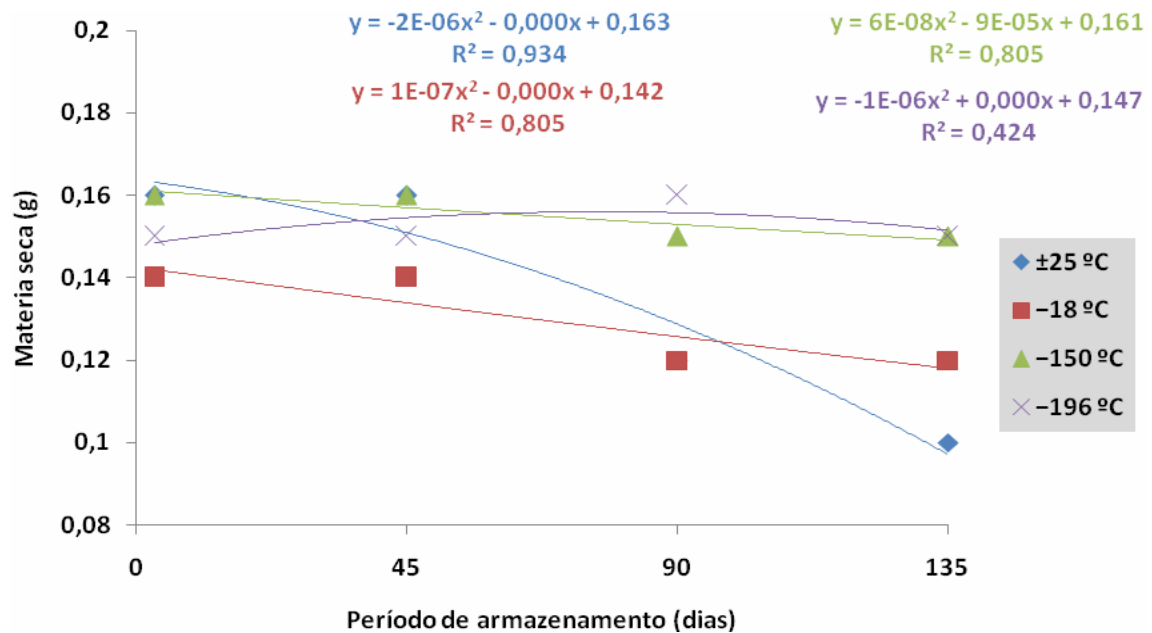


Figura 9. Matéria seca produzida por plântulas provenientes de sementes de abacaxizeiro, após o armazenamento, revelada pela interação *temperaturas de armazenamento versus períodos de armazenamento*

6 CONCLUSÕES

- O teor limite de umidade para a crioconservação de sementes de abacaxizeiro encontra-se entre 6 e 13,46% base úmida;
- As sementes de abacaxizeiro obtidas pelo método da polinização livre podem ser classificadas como ortodoxas;
- A qualidade fisiológica das sementes de abacaxizeiro com teores de umidade entre 8 e 12% base úmida não é afetada com a exposição a temperaturas criogênicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G. de. Efeito de la crioconservacion sobre la germinacion de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, PB, v. 2, n. 1, p. 67-71, 2000.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAES, A.M. de; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, PB, v. 6, n. 2, p. 295-302, 2002.

ALMEIDA, F. de A.C.; DUARTE, M.E.M.; CAVALCANTE, M.E.R.M. Teor de água nas sementes e sua relação com a tecnologia do armazenamento. In: ALMEIDA, F. de A.C.; DUARTE, M.E.M.; CAVALCANTE, M.E.R.M. **Tecnologia de Armazenamento em Sementes**. Campina Grande, PB. Universidade Federal de Campina Grande, 2006. Cap. 4, p. 147-188.

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. 2000. 83p.Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2000.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CABOT, C. Amélioration génétic de l'ananas. **Fruits**, Paris, v. 44, n. 4, p. 183-191, 1989.

CABRAL, J.R.S. Melhoramento genético. In: CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. (ed.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p. 83-103.

CABRAL, J.R.S.; CASTELLEN, M. da S.; SOUZA, F.V.D.; MATOS, A.P. de; FERREIRA, F.R. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMF, 2004. 33p. (EMBRAPA-CNPMF: Documentos 146).

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ª ed., Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, L.R. de; SILVA, E.A.A. da; DAVIDE, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, DF, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

CHOER, E.; AUGUSTIN E.; PEREIRA, A. das; LEITE, D.L.; CASTRO, L.A.S. de; FORTES, G.F. **Banco ativo de germoplasma de hortaliças da Região Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 2 p.

COLLINS, J.L. **The pineapple**. New York: Interscience Publishes, 1960. 294p.

CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. (ed.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 1999. p. 17-66.

CUNHA, G.A.P. da. **Estatística de abacaxi no Brasil – 2005**. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/informativos/abacaxi/abacaxi_online_v4_2_06.pdf>. Acesso em: 15 de set. de 2006.

FAIAD, M.G.R.; SALOMÃO, A.N.; FERREIRA, F.R.; GONDIM, M.T.P.; WETZEL, M.M.V.S.; MENDES, R.A.; GOESA, M. **Manual de Procedimentos para**

conservação de germoplasma-semente a longo prazo na Embrapa. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 21p. (EMBRAPA-CENARGEN: Documentos 30).

GIACOMELLI, E.J. **Curso de especialização em fruticultura em nível de pós-graduação: apontamentos de aulas.** Recife: UFRPE, 1974. 97p. (mimeografado).

HELLMANN, M.E.; MELLO, J.I.O.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BARBEDO, C.J. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. **Revista Brasileira de Botânica.** São Paulo, SP, v. 29, n. 1, p. 93-101, 2006.

HONG, T.D.; LININGTON, S.; ELLIS, R.H. **Seed storage behaviour: a compendium.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. (IPGRI. Handbooks for Genebanks).

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **The desing of seed storage facilites for genetic conservation.** Rome, 1982. p.95.

LEAL, F.; COPPENS d'EECKENBRUGGE, G. Pineapple. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (ed.). **Fruit Breeding**, New York, Wiley Publishing Co, 1996, p. 565-606.

LOISON-COBOT, C. État das connaissances botanique, Cytogénétiques et biologiques sur la reproduction de l'ananas. **Fruits**, Montpellier, v. 45, n. 4, p. 347-355, 1990.

LUZ, S.M.B.P.; MATOS, A.P. de; CABRAL, J.R.S.; COSTA, J.A. Tratamento para acelerar e uniformizar a germinação de sementes de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Joticabal, SP, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1999.

MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLAR, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 14, n. 1, p. 713-75, 1992.

MELLO, C.M.C. **Conservação de sementes de orquídeas do Cerrado**. 2000. 48p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

MILES, E.N.; HOLMES, N.E. The development and structure of the seedling and young plant of the pineapple (*Ananas sativus*). The seedling and young plant of the pineapple. **New Phytology**, n. 29, p. 119-229, 1930.

MORAES, A.M. de. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2001. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2001.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. cap.3, p.49-85.

REINHARDT, D.H.; SOUZA, J. da S. Pineapple industry and research in Brazil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 529, p. 57-71, 2000.

QUEIROZ, C.R.P.; LORENZONI, M.M.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. **Catálogo de caracterização e avaliação de germoplasma de abacaxi**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 2003. 52p. (EMBRAPA-CENARGEN: Documentos 80).

SANTOS, E.K. dos. Totipotência vegetal e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L.B. de; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 415-444.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C.; RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN: Comunicado Técnico 69).

SLAGEREN, M.W. van. The Millennium Seed Bank: building partnerships in arid regions for the conservation of wild species. **Journal of Arid Enviroments**, London, v. 54, n. 1, p. 195-201, 2002.

STANWOOD, P.C. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, Lincoln, n. 5, p. 26-31, 1980.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: STANWOOD, P.C. **Cryopreservation of plant cell and organs**. Boca Raton, Flórida: CRC, 1985. p.199-236.

STANWOOD, P.C. Survival of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed at the temperature of liquid nitrogen (-196°C). **Crop Science**, Madison, v.27, p.327-331, 1987.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*: tecnologias *in vitro* aplicadas à conservação de recursos genéticos vegetais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, ano 3, n. 14, p. 18-20, 2000.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Ed.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.265-281.

WALTERS, C.; RAO, N.K.; HU, X. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, p. 15-22, 1998.

WEAVER, R.J. **Reguladores Del crecimiento de las plantas en la agricultura**. Segunda reimpressão. México: Ed. Trillas, 1982.

CAPÍTULO 3

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS AXILARES DAS CULTIVARES PÉROLA E EMEPA 1 DE ABACAXIZEIRO

1 RESUMO

MORAES, Ailton Melo de. **Criopreservação de gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro**. Areia: UFPB/CCA, 2007. p. 64-88. (Tese-Doutorado em Agronomia).

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, herbácea perene, da família *Bromeliaceae*; atualmente, a conservação do germoplasma dessas espécies é realizada em banco ativo de germoplasma. Visando desenvolver uma nova alternativa para a preservação do germoplasma do abacaxi, com este trabalho se objetivou estudar a capacidade regenerativa *in vitro*, de gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1, submetidas a criogenia, pelos métodos da vitrificação e do encapsulamento e dessecação. As gemas axilares foram estabelecidas em meio MS sólido. A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por um período de 35 dias. No Método da Vitrificação (MV) as gemas axilares foram pré-cultivadas em meio MS líquido, contendo DMSO: 0, 5, 10 e 15% e sacarose: 0, 0,25, 0,50 e 0,75 M, por 48 horas; em seguida, acondicionadas em criotubos imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C), por 5 dias. O reaquecimento das gemas foi em banho-maria a 38 ± 2 °C, sob agitação, por 3 minutos. Método do encapsulamento e dessecação (MED) o encapsulamento das gemas foi realizado em uma solução de 3% de alginato de sódio e depois mergulhadas em uma solução 0,1 M de CaCl_2 , por 30 minutos; em seguida, foram transferidas para meio MS líquido suplementado com 0,75 M de sacarose, durante 12 horas, sob agitação a 180 rpm. A secagem das cápsulas foi realizada em câmara de fluxo laminar com temperatura ambiente (± 25 °C), por 0, 3, 6 e 9 horas e, posteriormente, elas foram imersas em nitrogênio líquido, por 5 dias. O descongelamento foi em banho-maria a 38 ± 2 °C, sob agitação, por 3 minutos. O meio de regeneração e a viabilidade após a desidratação e a criopreservação foram determinadas transferindo-se as cápsulas para frascos contendo meio MS básico solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), disposto em esquema fatorial com 4 repetições formada de 10 gemas axilares cada uma, para as duas cultivares em estudo. No MV: $2 \times 4 \times 4$, representado por 2 cultivares (Pérola e EMEPA 1), 4 concentrações de DMSO (0, 5, 10 e 15%) e 4 concentrações de sacarose (0, 0,25, 0,50 e 0,75 M); para MED: 2×4 , representado por 2 cultivares (Pérola e EMEPA 1) e 4 períodos de secagem (0; 3; 6 e 9 horas). Concluiu-se que as gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 podem ser criopreservadas pelos métodos estudados.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, gemas axilares, vitrificação, encapsulamento-dessecação, nitrogênio líquido.

AXILLARY GEM CRYOPRESERVATION OF CULTIVAR PEARL AND PINEAPPLE EMEPA 1

SUMMARY

MORAES, Ailton Melo de. **Axillary Gem Cryopreservation of Culivar Pearl and Pineapple EMEPA 1**. Areia: UFPB/CCA, 2007. p. 64-88. (Doctorate thesis Agronomy).

Pineapple is a monocotyledon and perennial herbaceous plant originated from *Bromelliaceae* species whose germplasm conservation is currently carried out in active germplasm banks. Aiming to develop a new alternative to preserve pineapple germplasm, this work analyzed the regenerative capacity *in vitro* of axillary gems in cultivar pearl and EMEPA 1 submitted to cryogeny via vitrification, capsuling and desiccating methods. The axillary gems were established in solid MS. Incubation was accomplished in growth room at temperature of $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ and 16 light/hour photoperiod at luminous intensity of $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 35 days. In the vitrification method (VM), the axillary gems were precultivated in MS liquid containing DMSO: 0, 5, 10, 15% and saccharose: 0, 0,25, 0,50 and 0,75 M for 48 hours; then conditioned in cryotubes directly immersed into liquid nitrogen (-196°C) for 5 days. The gems were reheated in water-bath at $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$, under shaking, for 3 minutes. In the capsuling and desiccating method, the gems were capsuled in a 3% alginate solution of sodium and then plunged into 0,1 M of CaCl_2 , for 30 minutes. Then, they were transferred into half MS liquid supplemented with 0,75 M of saccharose for 12 hours under shaking at 180 rpm. The capsules were dried in a laminar flow chamber with environment temperature ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) during 0, 3, 6, and 9 hours. After that, they were immersed into liquid nitrogen for 5 days. The thawing was done in water-bath at $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$, under shaking, for 3 minutes. The regeneration form and viability after dehydration as well as the cryopreservation were determined by transferring the capsules into bottles containing half basic solidified MS with 7 g.L^{-1} of agar. It was necessary to use the completely randomized design (CRD) presented in a factorial scheme with 4 repetitions comprised of 10 axillary gems each, for both cultivars studied: in MV: $2 \times 4 \times 4$ represented by 2 cultivars (Pearl and EMEPA1), 4 concentrations of DMSO (0, 5, 10, 15%) and 4 concentrations of saccharose (0, 0,25, 0,50, 0,75 M); for MED: 2×4 represented by 2 cultivars (Pearl and EMEPA 1) and 4 drying periods 0; 3; 6 and 9 hours). It was concluded that the axillary gems of cultivars (Pearl and EMEPA 1) can be cryopreserved by applying the methods studied.

Keywords: *Ananas comosus*, axillary gems, vitrification, capsulating-desiccating method, liquid nitrogen.

CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS AXILARES DAS CULTIVARES PÉROLA E EMEPA 1 DE ABACAXIZEIRO

3 INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, herbácea perene, da família *Bromeliaceae*, cujas espécies podem ser divididas em dois grupos distintos, em relação aos seus hábitos: as epífitas, aquelas que crescem sobre outras plantas, e as terrestres, que crescem no solo às expensas de suas próprias raízes (CUNHA e CABRAL 1999).

Atualmente, a conservação do germoplasma dessas espécies é realizada em banco ativo de germoplasma (BAG), a exemplo do BAG de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, constituído de 741 acessos, composto de *Ananas comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *ananassoides*, *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *parguasensis*, *A. macrodontes*, além de outras espécies dos gêneros *Ananas*, *Bromelia*, *Dickia*, *Tillandsia* e *Bilbergia*, sendo o *Ananas comosus* var. *comosus* o representante com maior número de acessos (CABRAL et al., 2004).

Para Jaramillo e Baena (2000), a conservação dos recursos fitogenéticos consiste em um trabalho contínuo, de longo prazo, que implica em investimentos importantes em tempo, pessoal, instalações e operacionalidade, justificáveis em função das necessidades de conservar o material genético.

Segundo Cabral et al. (2004), tem-se verificado a perda de acessos do BAG de abacaxi que não se adaptam às condições climáticas de Cruz das Almas, BA, o mesmo ocorrendo após cultivos sucessivos, provavelmente por acúmulo de pragas e doenças; no entanto, afirmam que a preservação de bancos de germoplasma *in vitro* tornou-se uma alternativa importante e quase fundamental para muitas espécies, ainda que sejam necessários alguns cuidados para seu pleno êxito.

Numerosas espécies de importância econômica, como: café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria* spp.), banana (*Musa* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), batata (*Solanum* spp.), batata-doce (*Ipomea batatas*) e videira (*Vitis* spp.) têm sido conservadas com sucesso pelo uso dessa metodologia (BAJAJ, 1995);

Santos (2001), porém, adverte para o fato de que a conservação *in vitro* envolve manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas de brotos e segmentos nodais e que essa técnica também permite conservar o germoplasma vegetal somente por curtos períodos de tempo (nove a doze meses) dependendo do procedimento ou da espécie de planta; em suma, nenhuma das diferentes metodologias existentes e em prática, no momento, para conservação do germoplasma vegetal, permite conservar, a longo prazo, espécies que são vegetativamente propagadas ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias com alta estabilidade genética e biológica.

A criobiologia alcançou grande progresso nos últimos anos e se desenvolveram com sucesso, protocolos de criopreservação para numerosas espécies de plantas de propagação vegetativa (FABRE e DEREUDDRE, 1990; MARIN et al., 1990; SCHNEIBEL-PREIKSTAS et al., 1992; NIWATA, 1995), cereais e gramíneas (BAJAJ, 1983; DELVALLÉE et al., 1989; PAULET et al., 1993), plantas ornamentais (DEREUDDRE et al., 1988; FUKAI, 1990), frutíferas tropicais e temperadas (MARIN e DURAN-VILA, 1988; PANIS et al., 1990; DEREUDDRE et al., 1990; PLESSIS et al., 1993; STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995; YONGJIE et al., 1997; SANTOS, 2004), leguminosas e oleaginosas (ASSY-BAH e ENGELMANN, 1992; RUNTHALA et al., 1993; BAJAJ, 1995; GONZALES-RIO et al., 1994; LOPES, 2005), estimulantes, medicinais e aromáticas (CHAUDHURY et al., 1991; ABDELNOUR et al., 1992; SANTOS et al., 2002) dentre outras.

Para Santos (2004) a criopreservação de material biológico usando-se nitrogênio líquido (-196 °C) tem grande potencial para o armazenamento em longo prazo de germoplasma vegetal, desde que sejam desenvolvidos protocolos que protejam os tecidos de injúria, causadas por desidratação e exposição a temperaturas ultra-baixas, e permitam a regeneração de material geneticamente estável; contudo, o grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células, que causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular; em consequência disso, as células entram em colapso e morrem (SANTOS, 2001).

Os métodos de criopreservação são empregados de acordo com a natureza do material a ser conservado. Em *Citrus*, diversos tipos de explante (óvulos,

embriões somáticos e zigóticos, células nucelares e calos), responderam satisfatoriamente ao congelamento no nitrogênio após a vitrificação com crioprotetores químicos, tais como Dimetilsulfóxido (DMSO), PVS2, etileno glicol e propileno glicol (MUMFORD e GROUT, 1979; MARIN e DURAN-VILA, 1988; KOBAYASHI et al., 1990; SAKAI et al., 1990 e 1991; RADHAMANI e CHANDEL, 1992; MARIN et al., 1993; SANTOS, 2004).

Ganzález-Arno et al. (2000) criopreservaram, pelos métodos da vitrificação e encapsulamento-dessecação, as variedades Porto Rico, Perolera e Smooth Cayenne, com sucesso; no entanto, sugerem melhorias no protocolo visando a uma sobrevivência maior das plântulas, como também para ser aplicável em um número maior de variedades porém, visando desenvolver uma nova alternativa para a preservação do germoplasma do abacaxi, neste trabalho se objetivou estudar a capacidade regenerativa *in vitro* de gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1, submetidas a criogenia pelos métodos da vitrificação e do encapsulamento e dessecação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no departamento de Fitotecnia da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Estação Experimental de Mangabeira, pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado da Paraíba-EMEPA/PB.

4.1 Material vegetal e procedimentos para obtenção dos explantes

Gemas axilares provenientes de mudas do tipo coroa retiradas de frutos das cultivares Pérola e EMEPA 1, foram desinfestadas em três etapas: (1) as mudas foram submersas em uma solução de formaldeído a 1%, durante 1 minuto; (2) após a secagem as mudas foram novamente submersas em uma solução contendo 0,3% do defensivo agrícola sistêmico Derosal 500[®], durante 10 minutos e (3) após o desfolhamento, em câmara de fluxo laminar as gemas axilares foram retiradas e desinfestadas com álcool a 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2% durante 10 minutos, o excesso de hipoclorito de sódio foi eliminado submetendo-se, 3 vezes, as gemas axilares à lavagem com água destilada e deionizada estéril.

As gemas axilares de abacaxizeiro foram estabelecidas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar, com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C com 1Kgf.cm⁻² de pressão por 30 minutos.

A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 5 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, pelo tempo de 35 dias.

4.2 Método da Vitrificação

As gemas axilares estabelecidas *in vitro* foram pré-cultivadas em meio MS líquido, contendo como agentes crioprotetores o DMSO [(CH₃)₂SO]: 0, 5, 10 e 15 % e sacarose: 0, 0,25, 0,50 e 0,75 M; em seguida, transferidas para a sala de crescimento, por 48 horas.

Decorrido o período de exposição aos agentes crioprotetores, parte das gemas axilares foi subcultivada e a outra parte acondicionada em tubos criobiológicos de polipropileno estéril de 4,5 ml, os quais foram selados com parafilme e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C), por 5 dias.

O reaquecimento das gemas axilares de abacaxizeiro se deu através do mergulho dos criotubos em banho-maria, a $38 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação, durante 3 minutos.

O cultivo das gemas axilares estabelecidas e criopreservadas foi realizado sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, em recipientes de vidro contendo 25 ml de meio MS sólido, adicionado de 30 g.L^{-1} de glucose, 10 mL.L^{-1} de cloreto de magnésio, os quais foram transferidos para a sala de crescimento, sob as condições citadas anteriormente, por 30 dias.

A viabilidade das gemas axilares foi avaliada semanalmente e os dados computados após 30 dias de cultivo, levando-se em consideração a porcentagem de gemas que produziram plântulas normais (caule e folhas) e o tamanho das gemas vivas.

4.2 Método do encapsulamento e dessecação

O encapsulamento das gemas axilares de abacaxizeiro em gel de alginato foi realizado transferindo-se as gemas estabelecidas *in vitro* para uma solução de 3% de alginato de sódio, mergulhando-as em seguida em uma solução 0,1 M de CaCl_2 (SANTOS 2004), onde permaneceram 30 minutos, formando bolhas; logo depois, foram transferidas para meio MS líquido suplementado com 0,75 M de sacarose, durante 12 horas, sob agitação a 180 rpm. As gemas encapsuladas foram colocadas para dessecar em placa de *Petri*, em câmara de fluxo laminar com temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), por 0, 3, 6 e 9 horas e, posteriormente, colocados em tubos criobiológicos de polipropileno estéril de 4,5 ml, os quais foram selados com parafilme e imersos diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C), por 5 dias; o conteúdo de umidade foi determinado após a secagem das cápsulas em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, antes e após cada período de desidratação; o conteúdo de umidade é expresso em porcentagem, com base no peso fresco; as gemas axilares

foram descongeladas mergulhando-se os criotubos em banho-maria, a 38 ± 2 °C, sob agitação, por 3 minutos; as gemas axilares foram imediatamente transferidas para o meio de regeneração e a viabilidade, após a desidratação e a criopreservação, foi determinada transferindo-se as cápsulas para frascos contendo meio MS solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar; a incubação foi em sala de crescimento sob as condições citadas em 4.1. A avaliação foi realizada conforme descrito no método da Vitrificação.

4.3 Procedimentos estatísticos

Nos dois métodos de criopreservação de gemas axilares de abacaxizeiro estudados, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), disposto em esquema fatorial com 4 repetições compostas de 10 gemas axilares cada uma, para as duas cultivares em estudo.

Os esquemas fatoriais utilizados, foram:

- Método da vitrificação: $2 \times 4 \times 4$, representado por 2 cultivares (Pérola e EMEPA 1), 4 concentrações de DMSO (0, 5, 10 e 15%) e 4 concentrações de sacarose (0, 0,25, 0,50 e 0,75 M);
- Método do encapsulamento e dessecação: 2×4 , representado por 2 cultivares (Pérola e EMEPA 1) e 4 períodos de secagem (0, 3, 6 e 9 horas).

A comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 1 e 5 % de probabilidade. Determinaram-se as regressões quadráticas na análise de variância e se estabeleceram os coeficientes de determinação R^2 (Tabela 7 do apêndice).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método da Vitrificação

Através da análise de variância (Tabela 1), se observam pelo Teste F, valores significativos na porcentagem de gemas viáveis e no tamanho das gemas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido, pelo método da vitrificação, por cinco dias, nas variáveis e interações estudadas, exceto no tamanho das gemas para a variável cultivares, revelando que as variáveis não atuam isoladamente, isto é, o comportamento de uma influencia no desempenho da outra.

Tabela 1. Análise de variância da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	GEMAS VIÁVEIS F	TAMANHO DAS GEMAS VIÁVEIS F
Cultivares (C)	1	1837,50**	3,37 ^{ns}
Concentrações de DMSO (D)	3	22337,50**	59557,37**
Concentrações de sacarose (S)	3	21537,50**	45229,37**
C x D	3	37,50**	107,37**
C x S	3	437,50**	57,37**
D x S	9	604,16**	2680,04**
C x D x S	9	104,16**	60,04**
Resíduo	288		
Total	319		

** Significativo a 1% de probabilidade

^{ns} Não significativo

Os resultados da influência das concentrações do agente vitrificante DMSO na porcentagem de gemas viáveis e no tamanho de gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, após a criopreservação pelo método da vitrificação, podem ser observados na Tabela 3 do apêndice e nas Figuras 1 e 2.

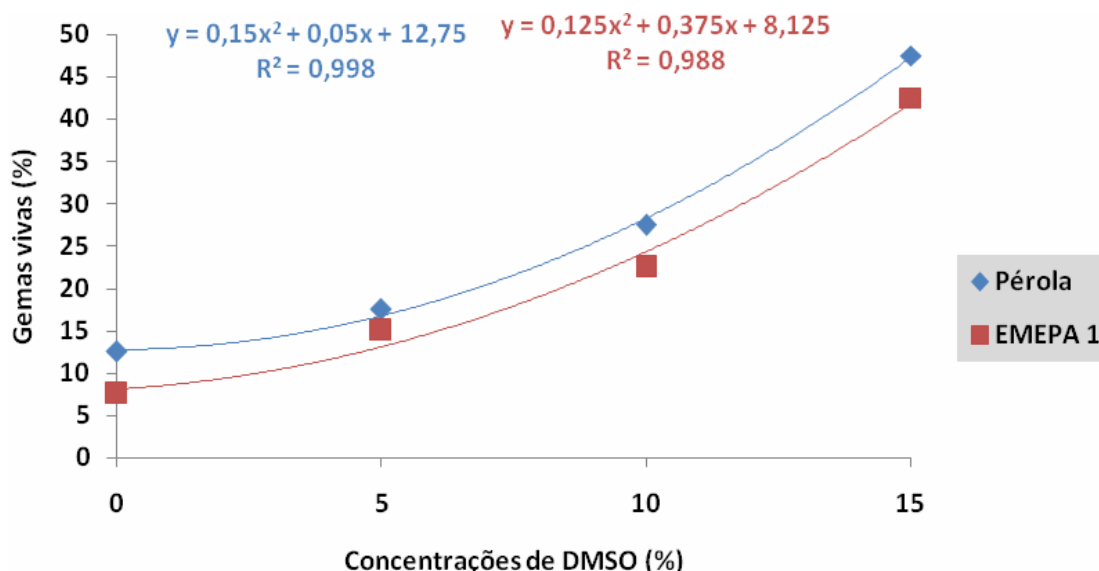


Figura 1. Porcentagem de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelada pela interação *cultivares* versus *concentrações de DMSO*

Observa-se a superioridade da cultivar Pérola na porcentagem de gemas viáveis em todas as concentrações de DMSO estudadas. Com relação ao tamanho das gemas viáveis nota-se uma inversão de superioridade para a cultivar EMEPA 1 nas concentrações de 5 e 10% de DMSO, verifica-se, também, um aumento gradativo na porcentagem de gemas viáveis e no tamanho das gemas axilares de abacaxizeiro com aumento da concentração do agente vitrificante DMSO, nas duas cultivares em estudo; esta alternância de superioridade entre as cultivares Pérola e EMEPA 1 é explicada pelo fato de que cada cultivar apresenta respostas distintas às concentrações do agente dessecante DMSO (Tabela 3 do apêndice e Figuras 1 e 2). Segundo Lopes (2005), as altas concentrações de DMSO afetam a viabilidade de explantes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.); no entanto, a desidratação pode ser bem sucedida através de soluções altamente concentradas, a exemplo do

DMSO, que tem a função de crioprotetor mas pode causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética (Kantha, 1985; SAKAI, 1995).

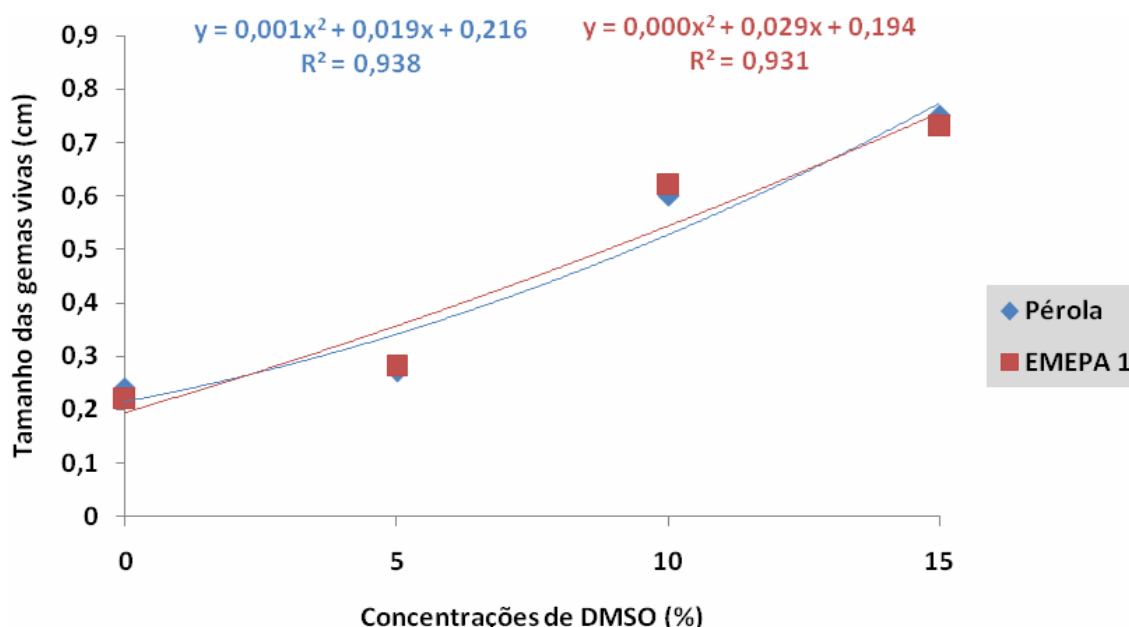


Figura 2. Tamanho das gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, durante cinco dias, revelado pela interação *cultivares* versus *concentrações de DMSO*

Tem-se na Tabela 4 do apêndice e nas Figuras 3 e 4, o efeito da concentração de sacarose na porcentagem e no tamanho das gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, criopreservadas em nitrogênio líquido pelo método da vitrificação, por cinco dias.

Verifica-se superioridade na porcentagem de gemas viáveis da cultivar Pérola nas concentrações de 0, 0,50 e 0,75 M de sacarose, e igualdade entre as cultivares em estudo, na porcentagem de sobrevivência das gemas pré-cultivadas com 0,25 M de sacarose. Em relação ao tamanho das gemas viáveis, verifica-se igualdade entre as cultivares Pérola e EMEPA 1 na ausência da sacarose e também superioridade da cultivar EMEPA 1, quando pré-cultivada com sacarose em concentrações maiores (0,5 e 0,75 M); observa-se, também, o aumento da porcentagem e do tamanho das gemas axilares viáveis nas duas cultivares de

abacaxizeiro, com o incremento da concentração de sacarose, fato este explicado pelo aumento do potencial osmótico das células, provocado pelas altas concentrações de sacarose, diminuindo o risco de formação de cristais de gelo no interior das células.

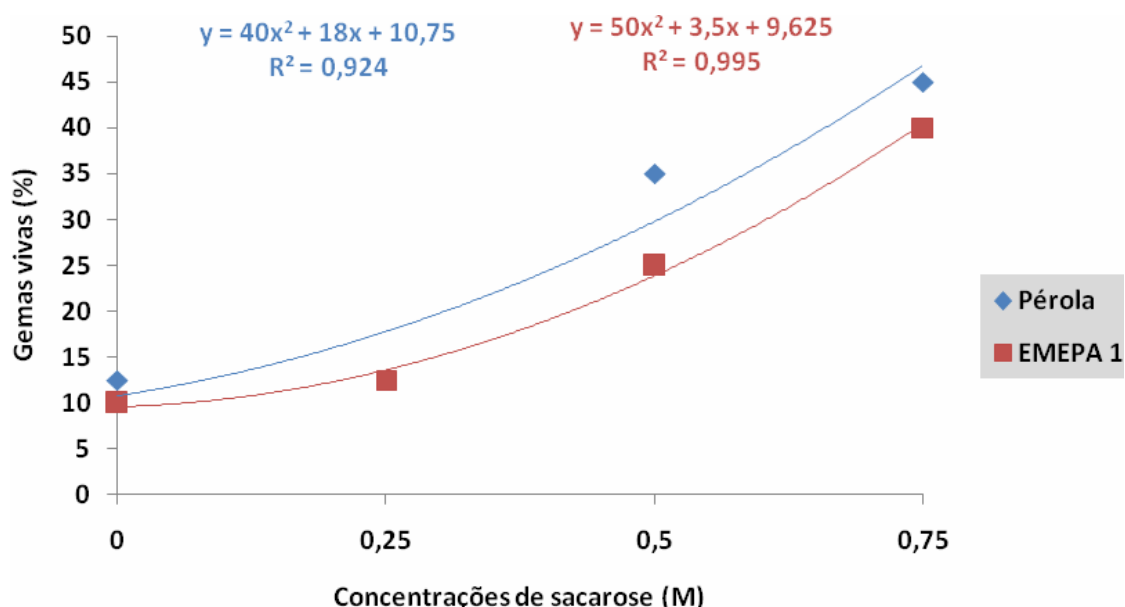


Figura 3. Porcentagem de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, durante cinco dias, revelada pela interação *cultivares* versus *concentrações de sacarose*

Os valores médios da porcentagem e do tamanho das gemas viáveis revelados pela interação *concentrações de DMSO* versus *concentrações de sacarose*, estão contidos na Tabela 5 do apêndice e nas Figuras 5 e 6, nas quais se observa o aumento do desenvolvimento das gemas criopreservadas pelo método da vitrificação, com o aumento da concentração dos crioprotetores, destacando-se as gemas axilares de abacaxizeiro pré-cultivadas na combinação do agente crioprotetor DMSO a 15% com 0,75 M de sacarose. A baixa viabilidade das gemas axilares de abacaxizeiro é provocada pelo alto teor de água intracelular, contudo, a ação dos agentes dessecantes (DMSO e sacarose) reduz consideravelmente o conteúdo de água das gemas e, conseqüentemente, aumenta o índice de sobrevivência.

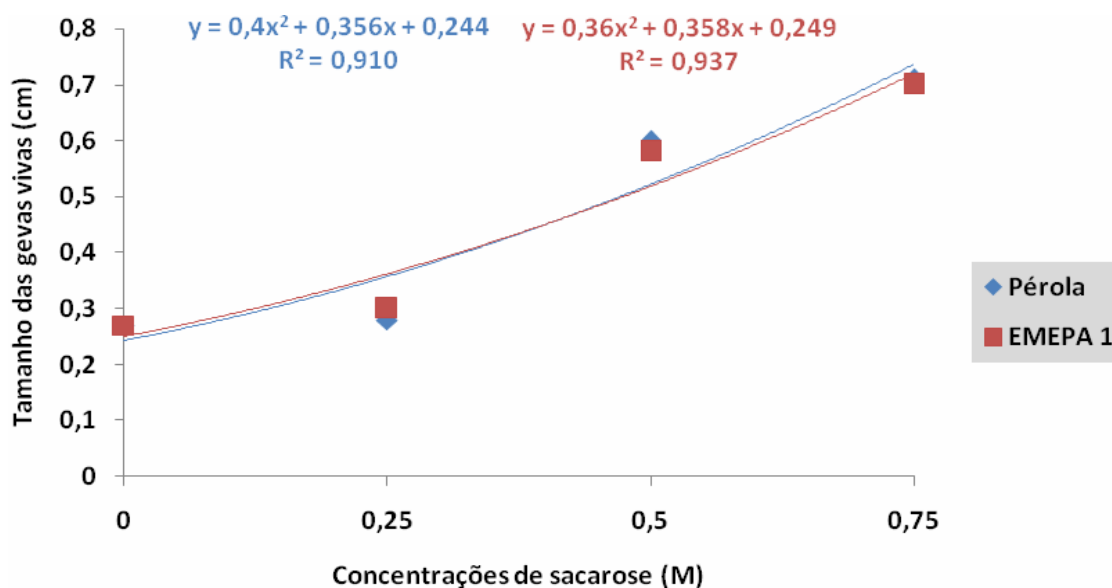


Figura 4. Tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, durante cinco dias, revelado pela interação *cultivares* versus *concentrações de sacarose*

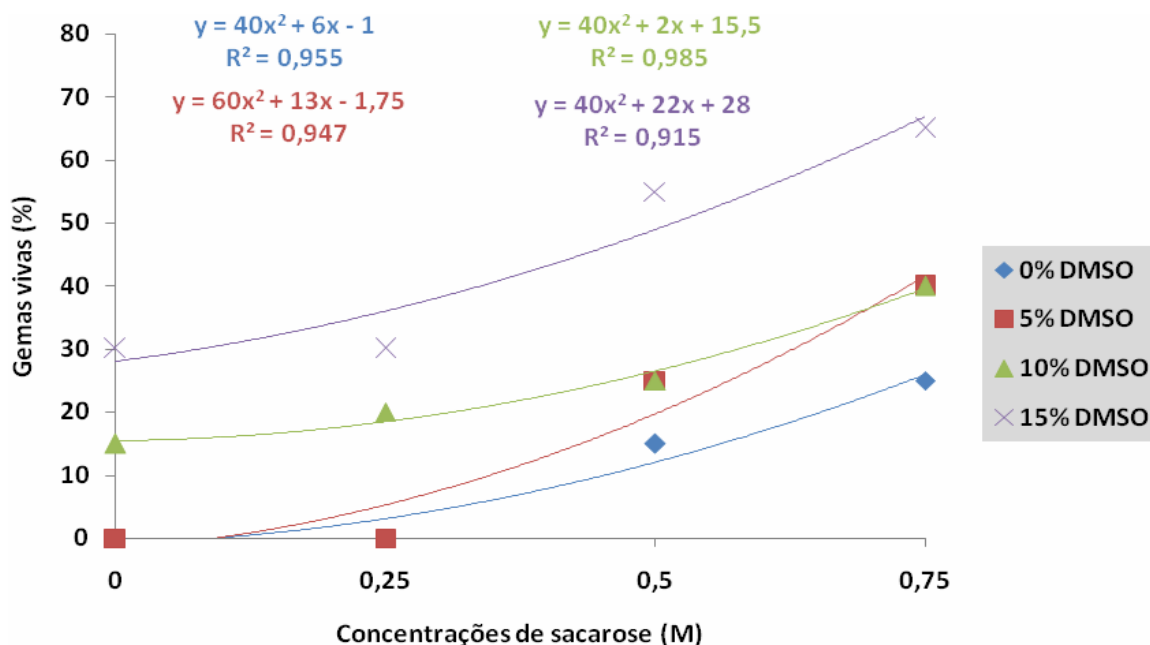


Figura 5. Porcentagem de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, durante cinco dias, revelada pela interação *concentrações de DMSO* versus *concentrações de sacarose*

Esses resultados encontram apoio nos trabalhos desenvolvidos por Uemura e Sakai (1980), que obtiveram elevada taxa de sobrevivência de ápices de cravo (*Dianthus caryophyllus*), empregando o DMSO a 10%, isolado ou associado a outros crioprotetores, mas Escobar et al. (2000) afirmam que altas concentrações de sacarose e DMSO elevaram a pressão osmótica das células dos ápices de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), alternando suas respostas morfogênicas, causando a formação de calos.

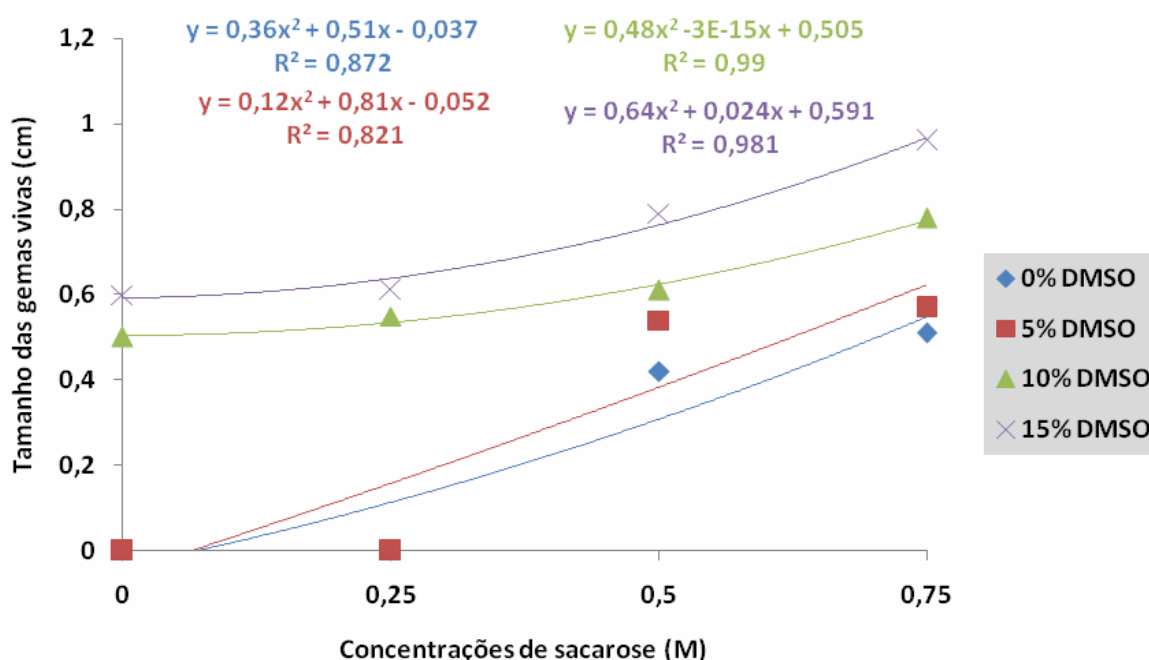


Figura 6. Tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelado pela interação concentrações de DMSO versus concentrações de sacarose

5.2 Método do encapsulamento e dessecação

A análise de variância (Tabela 2), revela valores significativos pelo Teste F para as variáveis e sua interação, na porcentagem e no tamanho das gemas vivas das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias.

Este fato confirma a influência da secagem na criopreservação das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro.

Tabela 2. Análise de variância da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro, submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	GEMAS VIÁVEIS F	TAMANHO DAS GEMAS VIÁVEIS F
Cultivares (C)	1	225,00**	1764,00**
Período de secagem (S)	3	14025,00**	71172,00**
C x S	3	225,00**	684,00**
Resíduo	72		
Total	79		

** Significativo a 1% de probabilidade

Os resultados do estudo da influência do período de secagem na porcentagem e no tamanho das gemas viáveis das cultivares em estudo, submetidas à criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, encontram-se na Tabela 6 do apêndice e nas Figuras 7 e 8.

Observa-se uma porcentagem maior de gemas viáveis na cultivar EMEPA 1 desidratadas 6 horas e igualdade entre as cultivares em estudo nos demais períodos de secagem (0, 3 e 9 horas). Não se verifica diferença no tamanho das gemas viáveis, submetidas a secagem pelos períodos de 0 e 3 horas. As gemas viáveis da cultivar Pérola apresentam-se maiores que a cultivar EMEPA 1, após a secagem por 6 e 9 horas, antes da imersão em nitrogênio líquido (-196 °C). O aumento do período de secagem proporciona incremento na porcentagem de gemas viáveis. As gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 apresentaram o melhor desempenho no tamanho, quando submetidas a secagem por 6 e 9 horas, respectivamente.

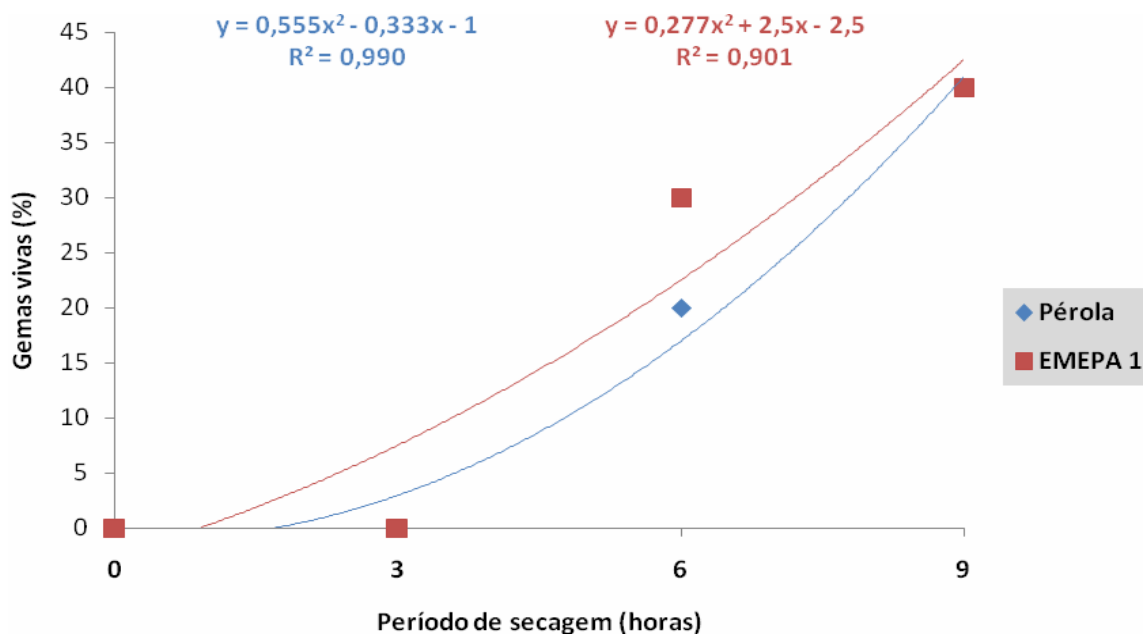


Figura 7. Porcentagem de gemas viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, durante cinco dias, revelada pela interação *cultivares versus período de secagem*

Esses resultados são justificados pelas altas taxas de desidratação das cápsulas de alginato de sódio utilizadas como crioprotetor, que proporciona a vitrificação dos explantes sem a formação de cristais de gelo, e diferem, em parte, dos resultados obtidos por Lopes (2005) que, por sua vez observa as maiores taxas de regeneração em explantes de algodão encapsulados e dessecados por períodos superiores a 6 horas, com ou sem pré-cultivo, na presença de sacarose. González-Benito e Perez (1997) relatam que a concentração de sacarose nas cápsulas de alginato de sódio não exerce nenhuma influência na sobrevivência de nós encapsulados de *Centaurium rigualli* devido, provavelmente, à difusão da sacarose para o meio de cultura mas Fabre e Dereuddre, 1990; Hasan e Takagi, 1995; Panis et al., 1996; Santos e Stushnoff, 2002, relatam que o emprego do pré-cultivo com sacarose torna as estruturas celulares mais resistentes e minimiza os danos causados pelo congelamento.

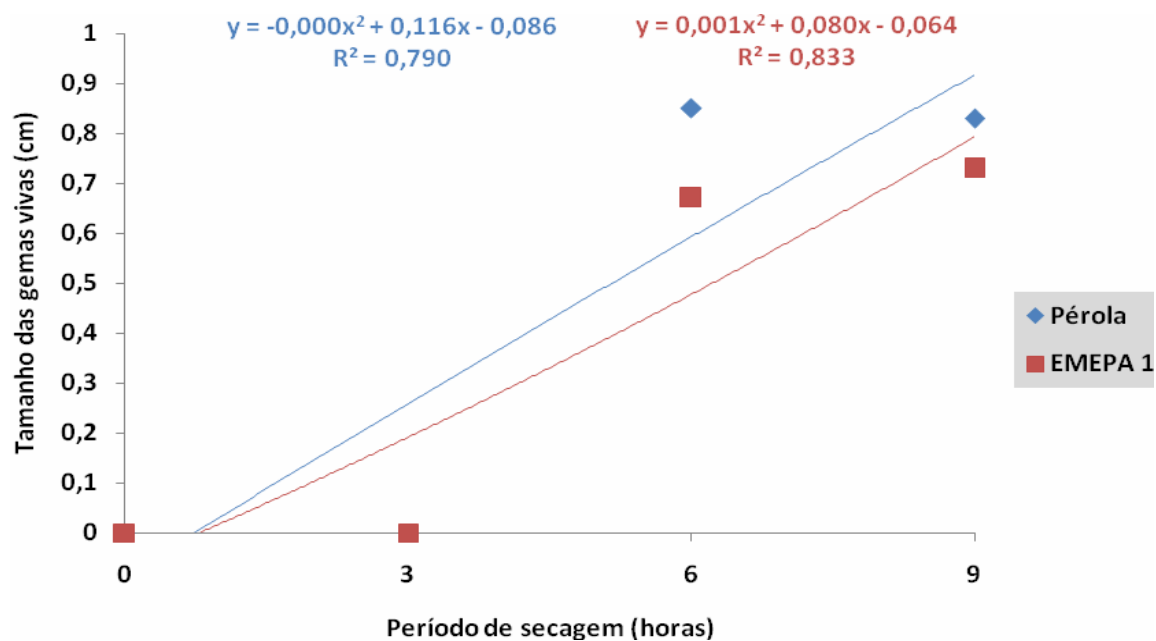


Figura 8. Tamanho de gemas viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, durante cinco dias, revelado pela interação *cultivares* versus *período de secagem*

6 CONCLUSÕES

- A viabilidade das gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro é menos afetada pela exposição ao nitrogênio líquido, quando tratadas com as concentrações de 10 e 15% de DMSO;
- A viabilidade das gemas axilares das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro é superior com a adição de 0,75 M de sacarose ao pré-cultivo, antes da criopreservação;
- A ausência de agentes crioprotetores inviabiliza a criopreservação de gemas axilares de abacaxizeiro pelo método da vitrificação;
- A combinação das concentrações de 15% de DMSO com 0,75 M de sacarose proporciona altas porcentagens de sobrevivência das gemas criopreservadas;
- O encapsulamento com alginato de sódio e a dessecação por 6 e 9 horas possibilita a criopreservação de gemas axilares de abacaxizeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR, A.; VILLALOBOS, V. ENGELMANN, F. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 13, p. 297-302, 1992.

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 13, p. 67-74, 1992.

BAJAJ YPS. Cryopreservation of germplasm of cereals. Progress and prospects. In: Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium, Kyoto, Japan, 1983. p 565-574

BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm I**. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha: Heidelberg, 1995. v. 32, p 3-28.

CABRAL, J.R.S.; CASTELLEN, M. da S.; SOUZA, F.V.D.; MATOS, A.P. de; FERREIRA, F.R. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA-CNPMF, 2004. 33p. (EMBRAPA-CNPMF: Documentos 146).

CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; CHANDEL, K.P.S. Preliminary observations on the cryopreservation of desiccated embryonic axes of tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) seeds for genetic conservation. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 12, p. 31-36, 1991.

CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. (ed.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 1999. p. 17-66.

DELVALLÉE I; GUILLAUD J; BECKERT M; DUMAS C. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and in vitro. **Plant Sci** v. 60, p. 129-136, 1989.

DEUREUDDRE, J.; FABRE, J.; BASSAGLIA, C. (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. **Plant Cell Rep**, v. 7, p. 170-173, 1988.

DEREUDRE, J.; SCOTTEZ, C.; ARNAUD, Y. DURON, M. Resistance d.apex caulinaires de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy), enrobes dans l.alginate, a une deshydratation puis a une congelation dans l.azote liquide: Effet d.un endurcissement prealable au froid. **C R Acad Sci Paris Ser**, Paris, França, v. 3, n.310, p. 317-323, 1990.

ESCOBAR, R.H.; MAFLA, G.; ROCA, W.M. Cassava cryopreservation. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research progress and application**, Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 404-407.

FABRE, J.; DEREUDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 11, p. 413-426, 1990.

FUKAI, S. Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. **Sci Hortic**, v. 45, p. 167-174, 1990.

GONZALES-RIO, F.; GURRIARAN, M.J.; GONZALES-BENITO, E.; REVILLA, M. A. Desiccation and cryopreservation of olive (*Olea europea* L.) embryos. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 15, p. 337-342, 1994.

GONZALEZ-ARNAO, M.T.; MARQUEZ R.M.; VILLAVICENCIO, C.U.; MARTINEZ, M.M.E., ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices

by vitrification. **JIRCAS International Agriculture Series**, Japan, v. 8, p. 390-392, 2000.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; PÉREZ, C. Cryopreservation of nodal explants of na endangered plant species (*Centaurim rigualli* Esteve) using the encapsulation-dehydration method. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 583-590, 1997.

HASAN, S.M.Z.; TAKAGI, H. Alginated-coated nodal segments of yam (*Dioscorea* spp.) for germplasm exchange and distribution. **Plant Genetic Resources Newsletter**. n. 103, p. 32-35, 1995.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Material de apoyo a La capacitación em conservación ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos, Cali, 2000.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K. K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985. p.115-134.

KOBAYASHI, S.; SAKAI, A.; OIYAMA, I. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 23, p. 15-20, 1990.

LOPES, K.P. **Criopreservação de germoplasma de oleoginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. 2005. 131p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.

MARIN, M.L.; DURAN-VILA, N. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) after immersion in liquid nitrogen. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 14, p. 51-57, 1988.

MARIN, M.L.; MAFLA, G.; ROCA, W.M.; WITHERS, L.A. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 11, p. 257-264, 1990.

MARIN, M.L.; GOGORCENA, Y.; ORTIZ, J.; DURAN-VILA, N. Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing/thawing treatments. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 27-33, 1993.

MUMFORD, P.M.; GROUT, B.W.W. Desiccation and low temperature (-196 °C) tolerance of *Citrus limon* seed. **Seed Science and Tecnology**, v. 7, p. 407-410, 1979.

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

NIWATA, E. Cryopreservation of meristems of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent regeneration. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 16, p. 102-107, 1995.

PANIS, B.; WITHERS, L.A.; DE LANGHE, E. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 11, p. 337-350, 1990.

PANIS, B.; TOTTE, N.; VAN NIMMÉN, K.; WITHERS, L.A. SWENNER, R. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after pre-culture on sucrose. **Plant Science**, v. 121, p. 95-106, 1996.

PAULET F.; ENGELMANN, F.; GLAZMANN, J.C. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Sacharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 525-529, 1993.

PLESSIS, P.; LEDDET, C.; COLLAS, A.; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot-tips by encapsulation dehydration: effects of

pretreatment, cooling and postculture conditions. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 14, p.309-320, 1993.

RADHAMANI, J.; CHANDEL, K.P.S. Cryopreservation of embryonic axes of trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.). **Plant cell Reports**, v. 11, p. 204-206, 1992.

RUNTHALA, P.; JANA, M.K.; MOHANAN, K. Cryopreservation of groundnut (*Arachis hypogea* L.) embryonic axes for germplasm conservation. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 14, p. 335-338, 1993.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. Var.) by a simple freezing method. **Plant Science**, v. 74, p. 243-248, 1991.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 53-69.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p. 60-65, 2001.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C.; RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN: Comunicado técnico 69).

SANTOS, I.R.I.; STUSHNOFF, C. Cryopreservation of embrionic axés *Citrus* species by encapsulation-dehydration. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 131, p. 36-41, 2002.

SANTOS, I.R.I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 2004. 23p. (EMBRAPA-CENARGEN: Documentos 115).

SCHNEIBEL-PREIKSTAS, B.; EARLE, E.D.; STEPONKUS, P.L. Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. **Cryobiology**, v. 29, p. 738-739, 1992.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. (1995) Cryopreservation of Apple (*Malus species*) Genetic Resources. In YPS Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha: Heidelberg, New York: v. 32, p. 87-101.

UEMURA, M.; SAKAI, A. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. **Plant and Cell Physiology**. v. 21, n. 1, p. 85-94, 1980.

YONGJIE, W.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C.; WITHERS, L. A. Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 18, p. 317-324, 1997.

APÊNDICE

CAPÍTULO 1

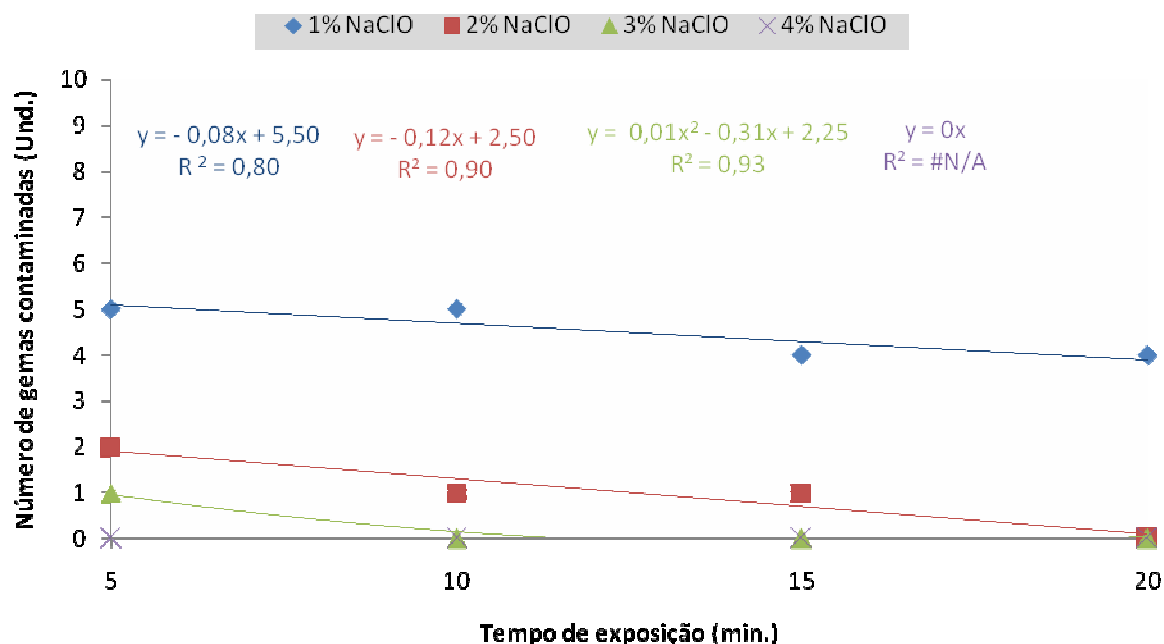


Figura 1 Valores médios da contaminação de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio

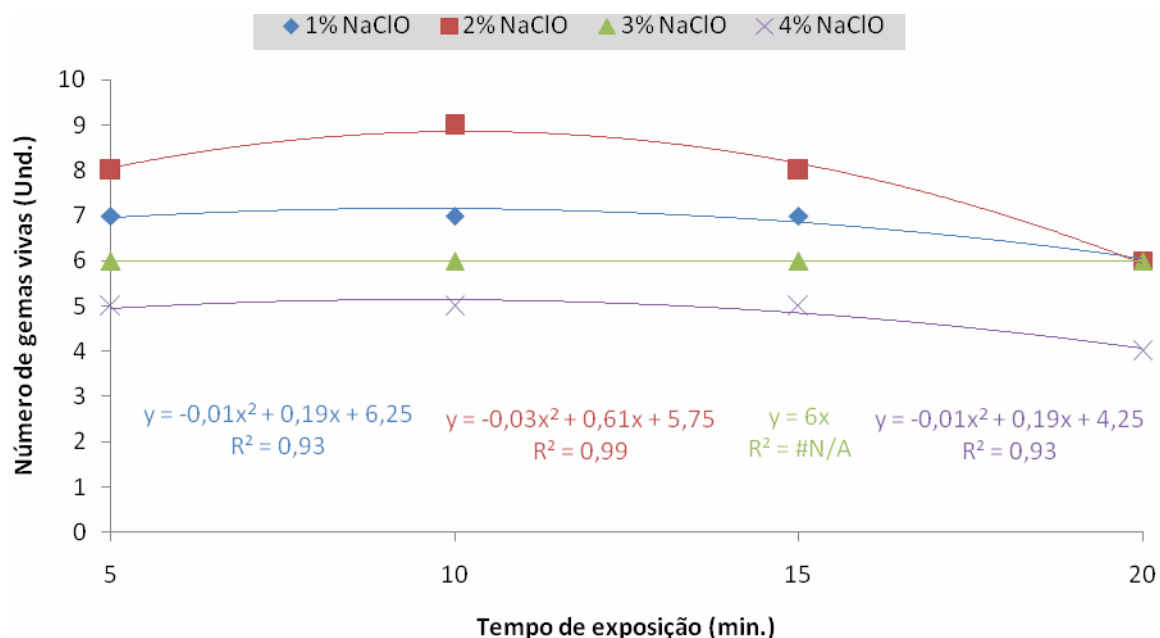


Figura 2. Valores médios da sobrevivência de gemas axilares da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a desinfestação com hipoclorito de sódio

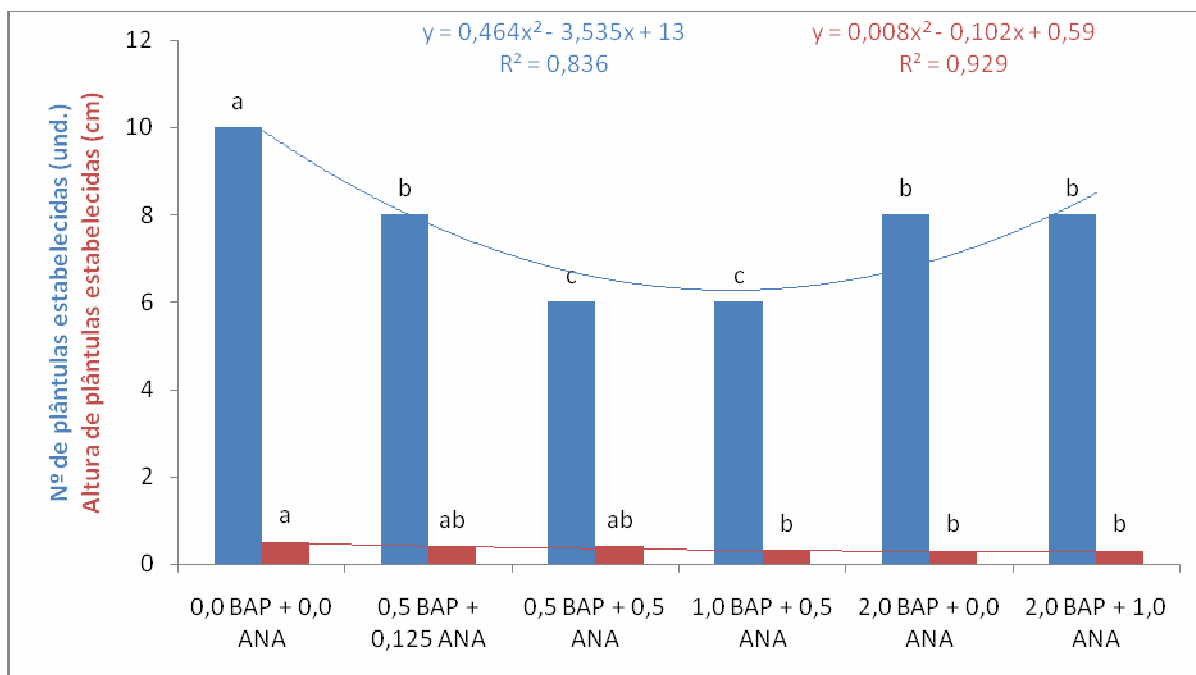


Figura 3. Valores médios de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 estabelecidos em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

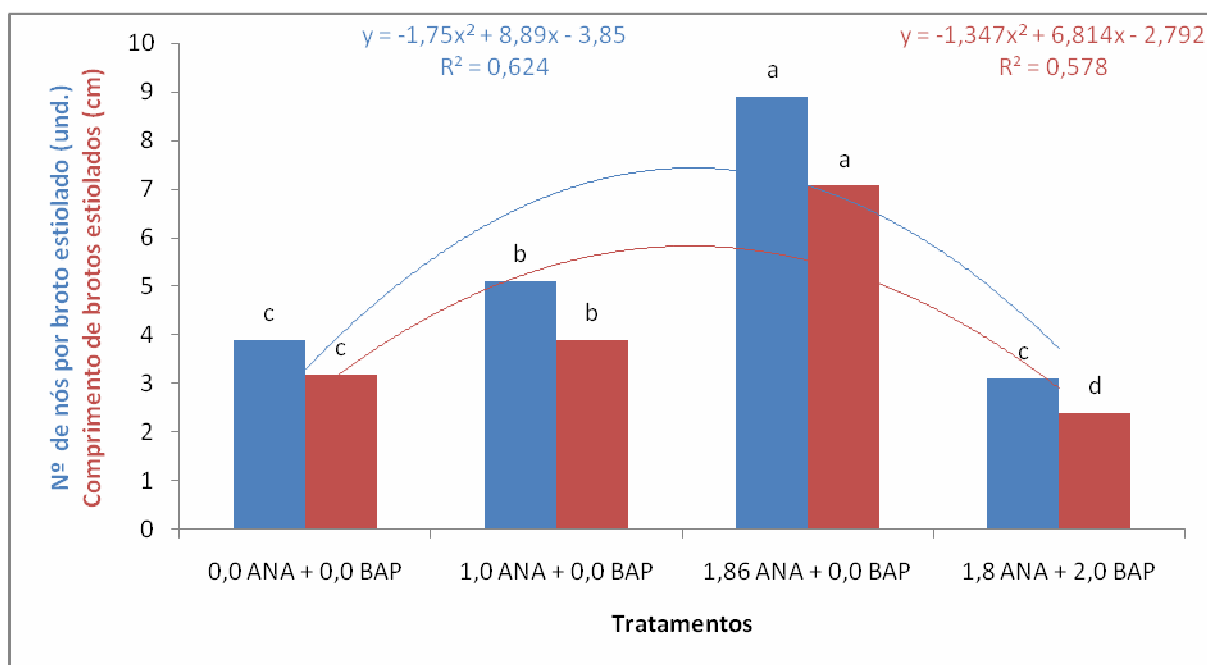


Figura 4. Valores médios do número de nós e comprimento de brotos de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 submetidos ao estiolamento em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

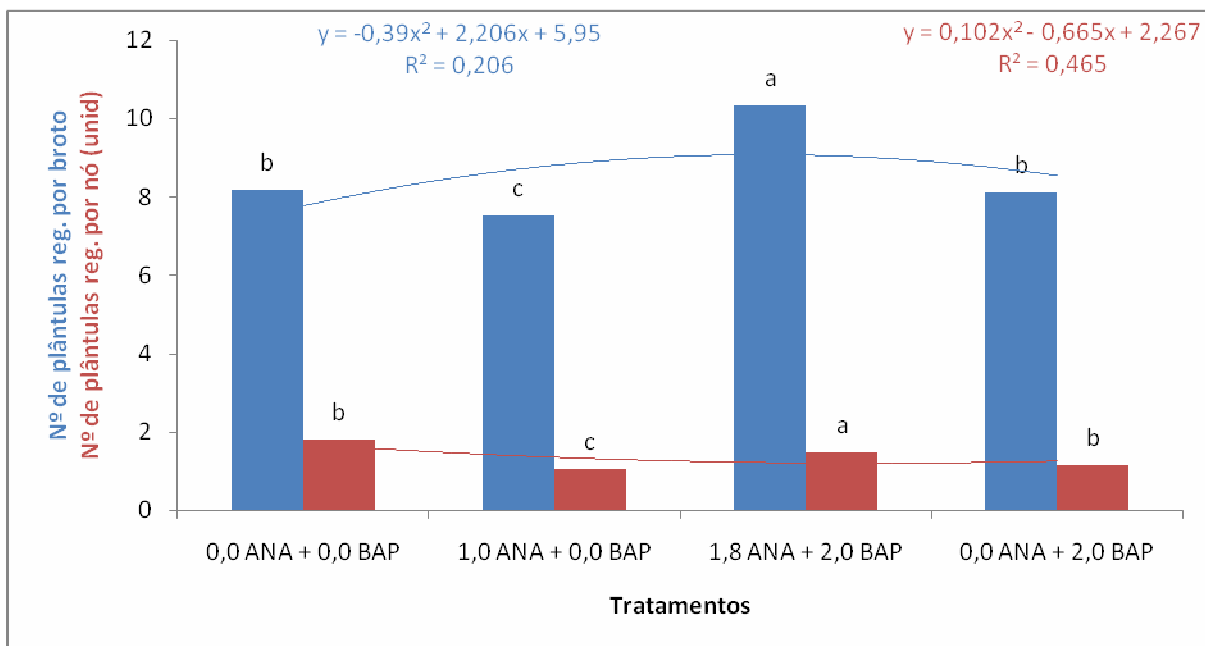


Figura 5. Valores médios da regeneração de plântulas estioladas cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento revelados através do número de plântulas regeneradas por broto e por nó

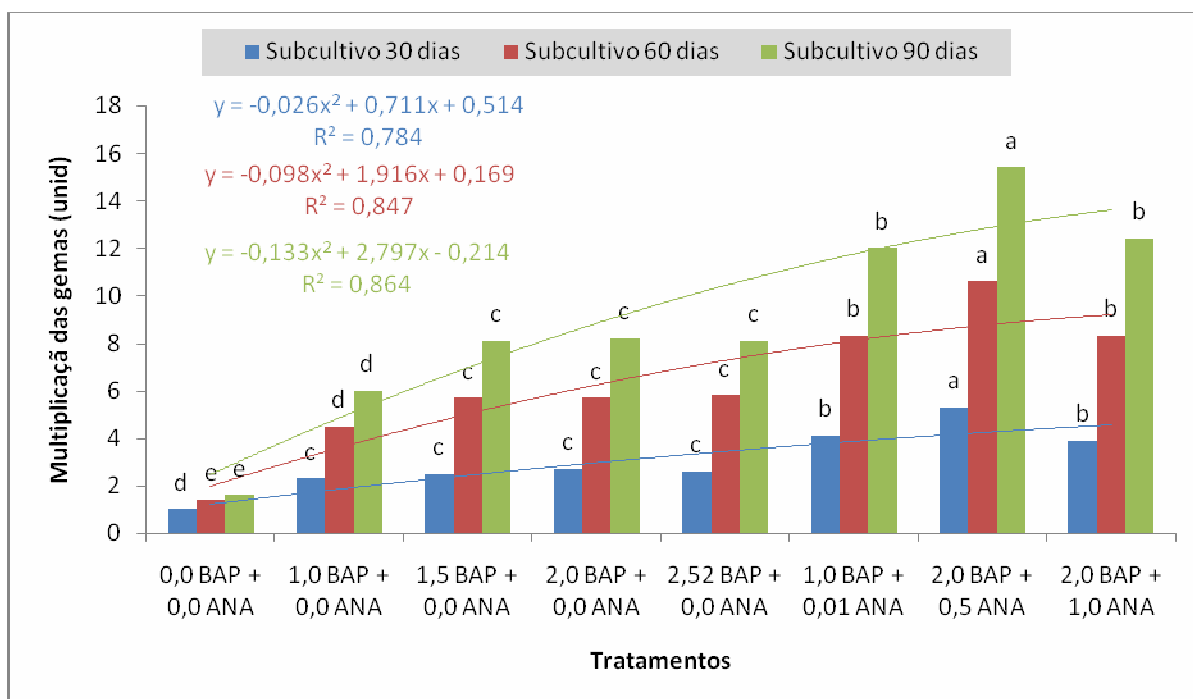


Figura 6. Valores médios da taxa de multiplicação de plântulas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1 aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio MS, suplementado com reguladores de crescimento

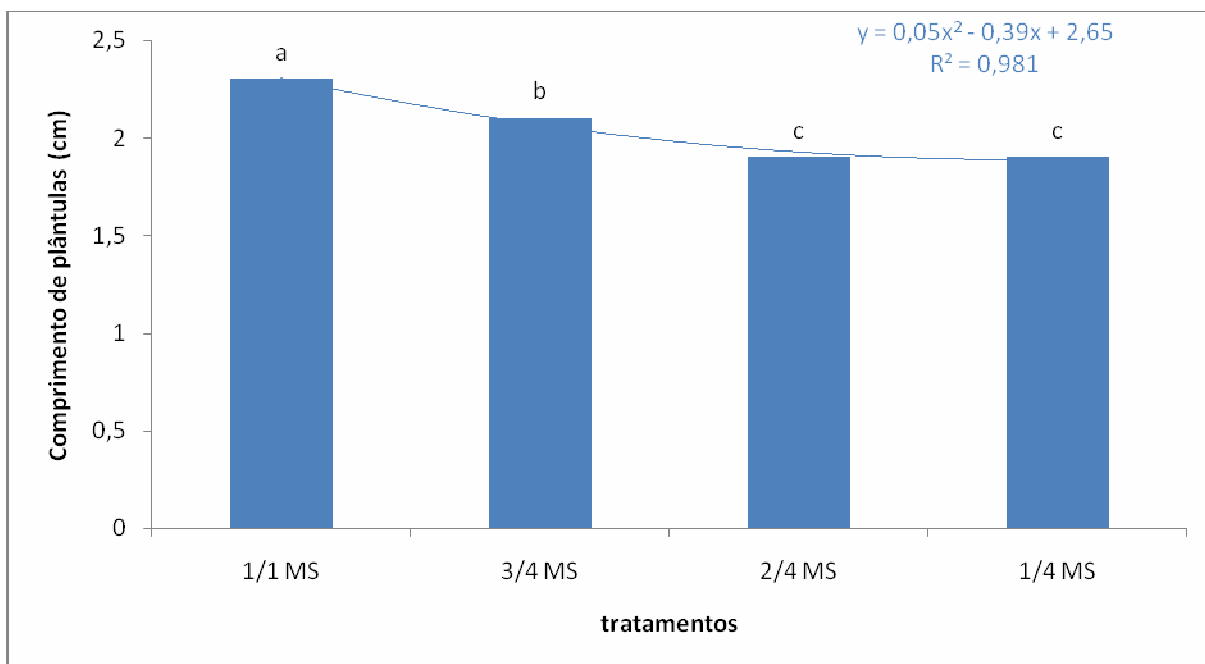


Figura 7. Valores médios do comprimento de plântulas submetidas ao alongamento aos 30 dias de cultivo em meio MS

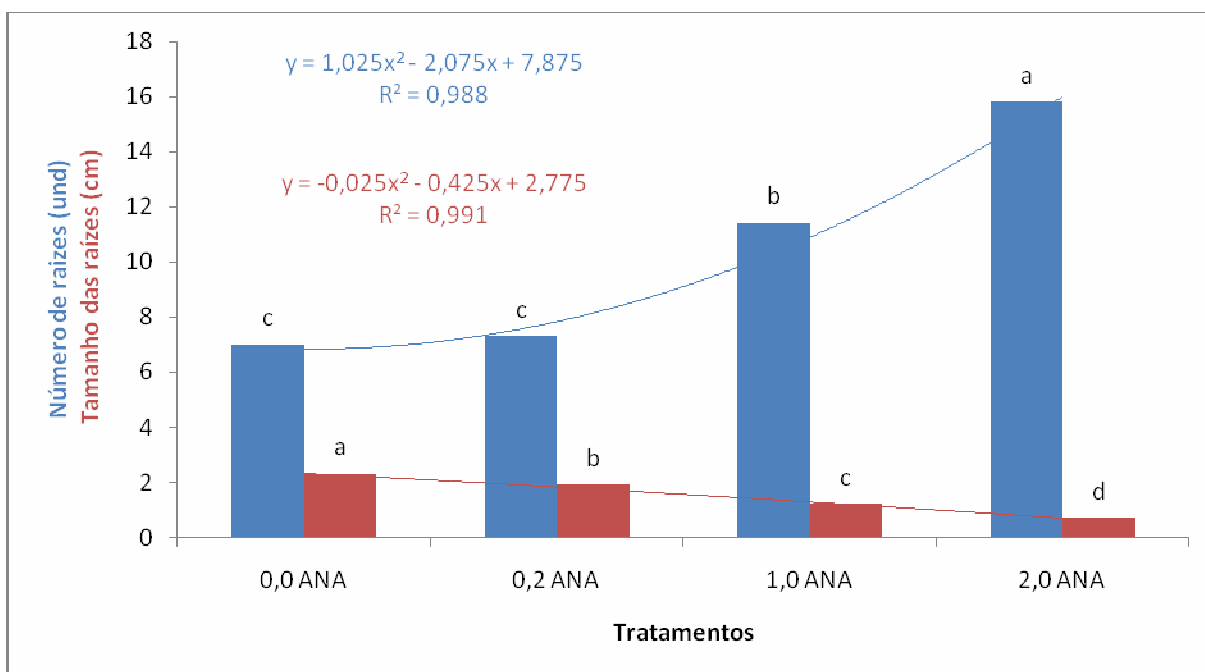


Figura 8. Valores médios da produção de raízes em plântulas da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro na presença do ácido naftalenoacético

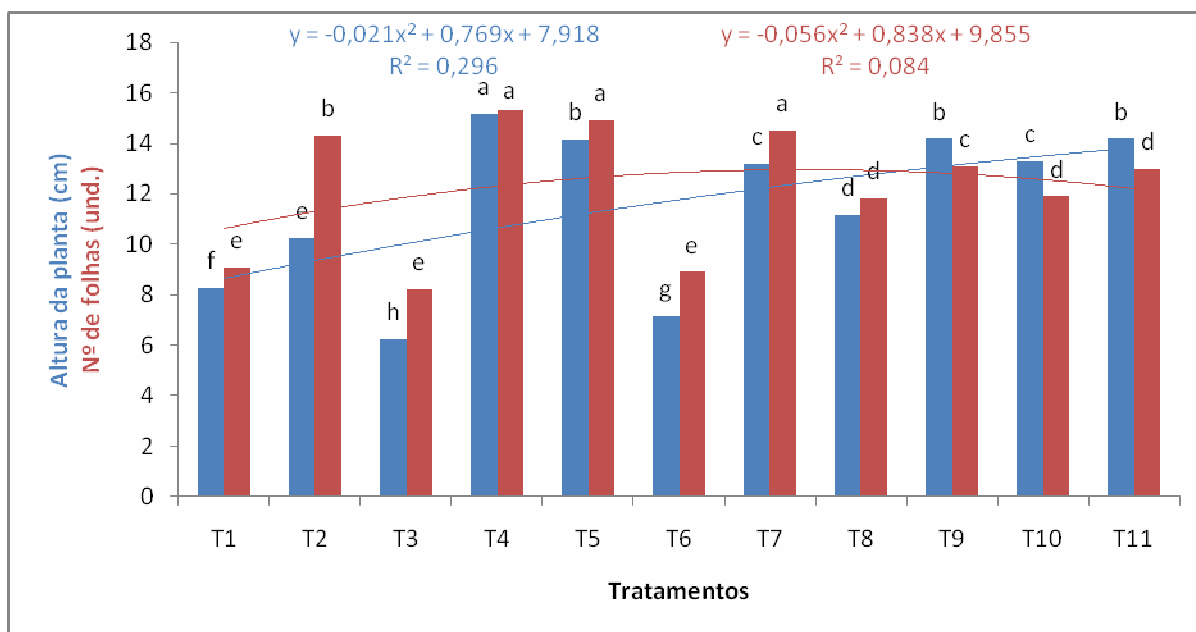


Figura 9. Valores médios de altura da planta (AP) e número de folhas (NF) das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, em função de diferentes substratos durante a aclimação

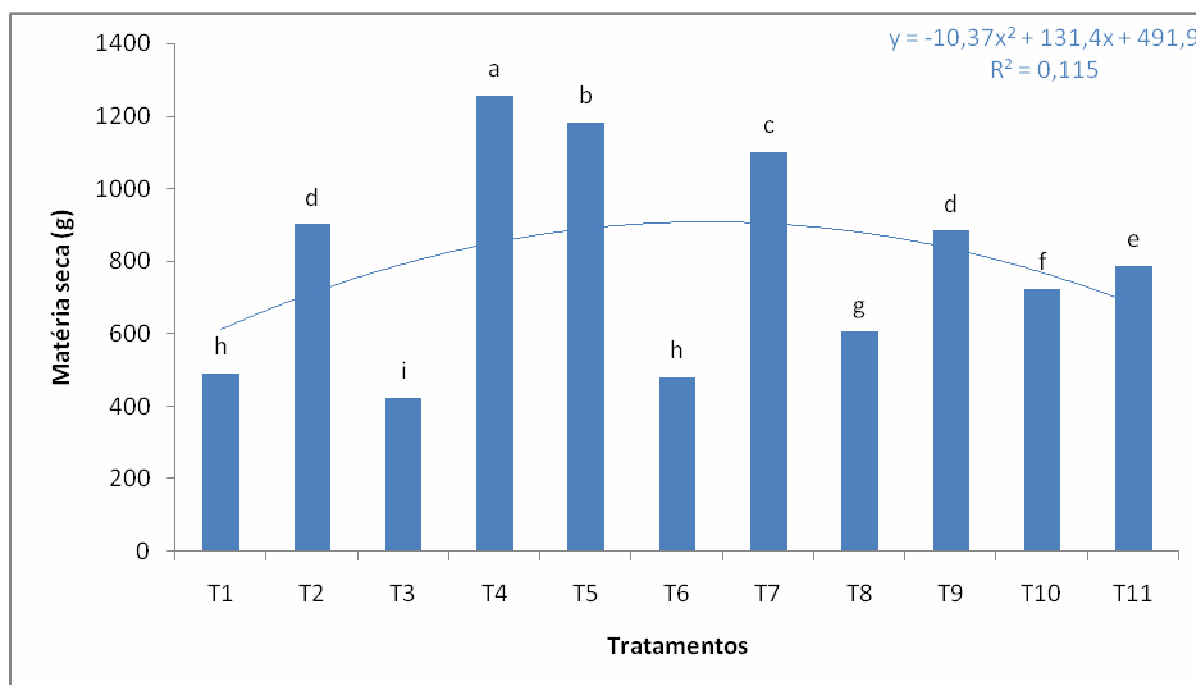


Figura 10. Valores médios da matéria seca (MS) das mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. EMEPA 1, em função de diferentes substratos durante a aclimação

Tabela 18. Resumo da regressão na análise de variância dos fatores quantitativos coletados no desenvolvimento do protocolo de micropropagação da cultivar EMEPA 1 de abacaxizeiro

Fonte de variação	GL	F	R ²	CV (%)
Contaminação das gemas axilares				
Hipoclorito de sódio a 1%				
Linear	1	0,80 ^{ns}		
Quadrática	1	0,00*		
Cúbica	1	0,20 ^{ns}		
Tratamentos	3	0,33 ^{ns}		
Resíduo	4			
			0,80	31,42
Hipoclorito de sódio a 2%				
Linear	1	2,40 ^{ns}		
Quadrática	1	0,00*		
Cúbica	1	0,26 ^{ns}		
Tratamentos	3	0,88 ^{ns}		
Resíduo	4			
			0,90	122,47
Hipoclorito de sódio a 3%				
Linear	1	2,27 ^{ns}		31,42
Quadrática	1	1,26 ^{ns}		
Cúbica	1	0,25 ^{ns}		
Tratamentos	3	1,26 ^{ns}		
Resíduo	4			
			0,00	174,62
Hipoclorito de sódio a 4%				
Linear	1	0,00*		
Quadrática	1	0,00*		
Cúbica	1	0,00*		
Tratamentos	3	0,00 ^{ns}		
Resíduo	4			
			0,00	141,42
Gemmas axilares vivas				
Hipoclorito de sódio a 1%				
Linear	1	0,45 ^{ns}		
Quadrática	1	0,25 ^{ns}		
Cúbica	1	0,05 ^{ns}		
Tratamentos	3	0,25 ^{ns}		
Resíduo	4			
			0,00	20,95
Hipoclorito de sódio a 2%				
Linear	1	2,45 ^{ns}		
Quadrática	1	2,25 ^{ns}		
Cúbica	1	0,05 ^{ns}		
Tratamentos	3	1,58 ^{ns}		
Resíduo	4			
			0,00	18,24

(continuação da Tabela 18)

Hipoclorito de sódio a 3%			
Linear	1	0,00*	
Quadrática	1	0,00*	
Cúbica	1	0,00*	
Tratamentos	3	0,00 ^{ns}	
Resíduo	4		
		0,00	23,57
Hipoclorito de sódio a 4%			
Linear	1	0,45 ^{ns}	
Quadrática	1	0,25 ^{ns}	
Cúbica	1	0,05 ^{ns}	
Tratamentos	3	0,25 ^{ns}	
Resíduo	4		
		0,00	29,77

CAPÍTULO 2

Tabela 5. Valores médios da matéria seca das sementes de abacaxizeiro revelados pela interação teor de umidade versus período de armazenamento

MATÉRIA SECA (g)									
Teor de umidade (% b.u.)	Período de armazenamento (dias)								Média
	3		45		90		135		
8	0,15	bAB	0,15	bA	0,15	bAB	0,14	bB	0,14
10	0,12	cA	0,12	cAB	0,11	cB	0,10	cC	0,11
12	0,18	aA	0,18	aA	0,16	aB	0,15	aB	0,16
Média	0,15		0,15		0,14		0,13		0,14
DMS/colunas = 0.016 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0.016 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 6. Valores médios da germinação e da matéria seca das sementes de abacaxizeiro revelados pela interação temperatura de armazenamento versus períodos de armazenamento

GERMINAÇÃO (%)									
Temperaturas de armazenamento (°C)	Período de armazenamento (dias)								Média
	3		45		90		135		
±25	96,33	aA	95,33	aB	94,66	aB	93,66	abC	94,99
-18	95,33	bA	95,33	aA	94,00	abB	92,33	cC	94,24
-150	93,66	cA	93,33	bA	93,00	cA	93,33	bA	93,33
-196	94,00	cA	94,00	bA	93,66	bcA	94,25	aA	93,97
Média	94,83		94,49		93,83		93,39		94,13
DMS/colunas = 1.630 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 1.630 (letras maiúsculas)				
MATÉRIA SECA (g)									
Temperaturas de armazenamento (°C)	Período de armazenamento (dias)								Média
	3		45		90		135		
±25	0,16	aA	0,16	aA	0,12	bB	0,10	cC	0,13
-18	0,14	bA	0,14	bA	0,12	bB	0,12	bB	0,13
-150	0,16	aA	0,16	aA	0,15	aA	0,15	aA	0,15
-196	0,15	bB	0,15	aAB	0,16	aA	0,15	aAB	0,15
Média	0,15		0,15		0,13		0,13		0,14
DMS/colunas = 0.016 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0.016 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 7. Resumo da regressão na análise de variância dos fatores quantitativos coletados na crioconservação de sementes de abacaxizeiro

Fonte de variação	GL	F	R ²	CV(%)
Matéria seca (g)				
Teor de umidade 8% b.u.				
Linear	1	1,35 ^{ns}		
Quadrática	1	0,75 ^{ns}		
Cúbica	1	0,15 ^{ns}		
Tratamentos	3	0,75 ^{ns}		
Resíduo	12			
			0,00	7,82
Teor de umidade 10% b.u.				
Linear	1	5,03*		
Quadrática	1	2,99 ^{ns}		
Cúbica	1	0,66 ^{ns}		
Tratamentos	3	2,89 ^{ns}		
Resíduo	12			
			0,58	106,79
Teor de umidade 12% b.u.				
Linear	1	18,15**		
Quadrática	1	0,75 ^{ns}		
Cúbica	1	1,35 ^{ns}		
Tratamentos	3	6,75**		
Resíduo	12			
			0,90	6,89
Germinação (%)				
Temperatura de armazenamento (±25 °C)				
Linear	1	1,07 ^{ns}		
Quadrática	1	2,99 ^{ns}		
Cúbica	1	0,26 ^{ns}		
Tratamentos	3	1,44 ^{ns}		
Resíduo	12			
			0,00	1,22
Temperatura de armazenamento (-18 °C)				
Linear	1	160063,35**		
Quadrática	1	20916,75**		
Cúbica	1	1470,15 -		
Tratamentos	3	60816,75**		
Resíduo	12			
			0,99	0,01
Temperatura de armazenamento (-150 °C)				
Linear	1	2613,60**		
Quadrática	1	3267,00**		
Cúbica	1	653,40 -		
Tratamentos	3	2178,00**		
Resíduo	12			
			0,91	0,01

(continuação da Tabela 7.)

Temperatura de armazenamento (-196 °C)				
Linear	1	252,15**		
Quadrática	1	2610,75**		
Cúbica	1	2419,35**		
Tratamentos	3	1760,75**		
Resíduo	12			
			1,00	0,01
Matéria seca (g)				
Temperatura de armazenamento (±25 °C)				
Linear	1	3,79 ^{ns}		
Quadrática	1	2,84 ^{ns}		
Cúbica	1	0,82 ^{ns}		
Tratamentos	3	2,49 ^{ns}		
Resíduo	12			
			0,00	96,62
Temperatura de armazenamento (-18 °C)				
Linear	1	9,60**		
Quadrática	1	0,00*		
Cúbica	1	2,40 ^{ns}		
Tratamentos	3	4,00*		
Resíduo	12			
			0,80	8,88
Temperatura de armazenamento (-150 °C)				
Linear	1	0,80 ^{ns}		
Quadrática	1	0,00*		
Cúbica	1	0,20 ^{ns}		
Tratamentos	3	0,33 ^{ns}		
Resíduo	12			
			0,80	9,12
Temperatura de armazenamento (-196 °C)				
Linear	1	0,05 ^{ns}		
Quadrática	1	0,25 ^{ns}		
Cúbica	1	0,45 ^{ns}		
Tratamentos	3	0,25 ^{ns}		
Resíduo	12			
			0,00	9,27

CAPÍTULO 3

Tabela 3. Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelados pela interação *cultivares versus concentrações de DMSO*

GEMAS VIÁVEIS (%)									
Cultivares	Concentrações de DMSO (%)								
	0		5		10		15		Média
Pérola	12,5	aD	17,5	aC	27,5	aB	47,5	aA	
EMEPA 1	7,5	bD	15,0	bC	22,5	bB	42,5	bA	21,87
Média	10,0		16,25		25,0		45,0		24,06
DMS/colunas = 0,401 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,526 (letras maiúsculas)				
TAMANHO DAS GEMAS VIÁVEIS (cm)									
Cultivares	Concentrações de DMSO (%)								
	0		5		10		15		Média
Pérola	0,24	aD	0,27	bC	0,60	bB	0,75	aA	
EMEPA 1	0,22	bD	0,28	aC	0,62	aB	0,73	bA	0,46
Média	0,23		0,275		0,61		0,74		0,46
DMS/colunas = 0,004 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,005 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 4. Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelados pela interação *cultivares* versus *concentrações de sacarose*

GEMAS VIÁVEIS (%)									
Cultivares	Concentrações de sacarose (M)								
	0		0,25		0,50		0,75		Média
Pérola	12,5	aC	12,5	aC	35,0	aB	45,0	aA	
EMEPA 1	10,0	bD	12,5	aC	25,0	bB	40,0	bA	21,87
Média	11,25		12,5		30,0		42,5		24,06
DMS/colunas = 0,401 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,526 (letras maiúsculas)				
TAMANHO DAS GEMAS VIÁVEIS (cm)									
Cultivares	Concentrações de sacarose (M)								
	0		0,25		0,50		0,75		Média
Pérola	0,27	aD	0,28	bC	0,60	aB	0,71	aA	
EMEPA 1	0,27	aD	0,30	aC	0,58	bB	0,70	bA	0,46
Média	0,27		0,29		0,59		0,705		0,46
DMS/colunas = 0,004 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,005 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 5. Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método da vitrificação, por cinco dias, revelados pela interação *concentrações de DMSO* versus *concentrações de sacarose*

GEMAS VIÁVEIS (%)									
Concentrações de DMSO (%)	Concentrações de sacarose (M)								Média
	0		0,25		0,50		0,75		
0	0,0	cC	0,0	cC	15,0	cB	25,0	cA	10,0
5	0,0	cC	0,0	cC	25,0	bB	40,0	bA	16,25
10	15,0	bD	20,0	bC	25,0	bB	40,0	bA	25,0
15	30,0	aC	30,0	aC	55,0	aB	65,0	aA	45,0
Média	11,25		12,5		30,0		42,5		24,06
DMS/colunas = 0,745 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,745 (letras maiúsculas)				
TAMANHO DAS GEMAS VIÁVEIS (cm)									
Concentrações de DMSO (%)	Concentrações de sacarose (M)								Média
	0		0,25		0,50		0,75		
0	0,00	cC	0,00	cC	0,42	dB	0,51	dA	0,23
5	0,00	cC	0,00	cC	0,54	cB	0,57	cA	0,27
10	0,50	bD	0,55	bC	0,61	bB	0,78	bA	0,61
15	0,60	aD	0,61	aC	0,79	aB	0,96	aA	0,74
Média	0,27		0,29		0,59		0,70		0,46
DMS/colunas = 0,007 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,007 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 6. Valores médios da porcentagem e do tamanho de gemas axilares viáveis das cultivares Pérola e EMEPA 1 de abacaxizeiro submetidas a criopreservação pelo método do encapsulamento e dessecação, por cinco dias, revelados pela interação *cultivares* versus *período de secagem*

GEMAS VIÁVEIS (%)									
Cultivares	Período de secagem (horas)								Média
	0		3		6		9		
Pérola	0,0	aC	0,0	aC	20,0	bB	40,0	aA	15,0
EMEPA 1	0,0	aC	0,0	aC	30,0	aB	40,0	aA	17,5
Média	0,0		0,0		25,0		40,0		16,25
DMS/colunas = 0,664 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,877 (letras maiúsculas)				
TAMANHO DAS GEMAS VIÁVEIS (cm)									
Cultivares	Período de secagem (horas)								Média
	0		3		6		9		
Pérola	0,0	aC	0,0	aC	0,85	aA	0,83	aB	0,42
EMEPA 1	0,0	aC	0,0	aC	0,67	bB	0,73	bA	0,35
Média	0,0		0,0		0,76		0,78		0,38
DMS/colunas = 0,006 (letras minúsculas)					DMS/linhas = 0,008 (letras maiúsculas)				

As médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 7. Resumo da regressão na análise de variância dos fatores quantitativos coletados na criopreservação de gemas axilares de abacaxizeiro

Fonte de variação	GL	F	R ²	CV(%)
Gemas vivas (%)				
Cultivar Pérola				
Linear	1	66125,00**		
Quadrática	1	5625,00**		
Cúbica	1	125,00**		
Tratamentos	3	23958,33**		
Resíduo	4			
			1,00	0,53
Cultivar EMEPA 1				
Linear	1	63281,25**		
Quadrática	1	3906,25**		
Cúbica	1	781,25 -		
Tratamentos	3	22656,25**		
Resíduo	4			
			0,98	0,64
Tamanho das gemas vivas (cm)				
Cultivar Pérola				
Linear	1	1729,80**		
Quadrática	1	36,00**		
Cúbica	1	115,20**		
Tratamentos	3	627,00**		
Resíduo	4			
			1,00	3,04
Cultivar EMEPA 1				
Linear	1	1748,45**		
Quadrática	1	6,25 ^{ns}		
Cúbica	1	130,05 -		
Tratamentos	3	628,25**		
Resíduo	4			
			0,92	3,05
Gemas vivas (%)				
Cultivar Pérola				
Linear	1	72000,00**		
Quadrática	1	2500,00**		
Cúbica	1	6125,00 -		
Tratamentos	3	26875,00**		
Resíduo	4			
			0,92	0,53
Cultivar EMEPA 1				
Linear	1	698,08**		
Quadrática	1	51,91**		
Cúbica	1	3,73 ^{NS}		
Tratamentos	3	251,24**		
Resíduo	4			
			0,99	5,60

(continuação de Tabela 7.)

Tamanho das gemas vivas (cm)				
Cultivar Pérola				
Linear	1	1344,80**		
Quadrática	1	25,00**		
Cúbica	1	135,20 -		
Tratamentos	3	501,66**		
Resíduo	4		0,91	3,04
Cultivar EMEPA 1				
Linear	1	1232,45**		
Quadrática	1	20,25*		
Cúbica	1	84,05 -		
Tratamentos	3	445,58**		
Resíduo	4		0,93	3,05
Gemas vivas (%)				
Concentração de DMSO 0%				
Linear	1	810,00**		
Quadrática	1	50,00**		
Cúbica	1	40,00 -		
Tratamentos	3	300,00**		
Resíduo	4		0,95	10,00
Concentração de DMSO 5%				
Linear	1	2102,50**		
Quadrática	1	112,50**		
Cúbica	1	122,50 -		
Tratamentos	3	779,16**		
Resíduo	4		0,94	6,15
Concentração de DMSO 10%				
Linear	1	320,00**		
Quadrática	1	25,00**		
Cúbica	1	5,00 ^{NS}		
Tratamentos	3	116,66**		
Resíduo	4		0,98	5,65
Concentração de DMSO 15%				
Linear	1	845,00**		
Quadrática	1	25,00**		
Cúbica	1	80,00 -		
Tratamentos	3	316,66**		
Resíduo	4		0,91	3,14

(continuação de Tabela 7.)

Tamanho das gemas vivas (cm)				
Concentração de DMSO 0%				
Linear	1	3802,50**		
Quadrática	1	40,50**		
Cúbica	1	562,50 -		
Tratamentos	3	1468,50**		
Resíduo	4		0,87	4,30
Concentração de DMSO 5%				
Linear	1	5062,50**		
Quadrática	1	4,50 ^{ns}		
Cúbica	1	1102,50 -		
Tratamentos	3	2056,50**		
Resíduo	4		0,82	3,60
Concentração de DMSO 10%				
Linear	1	405,00**		
Quadrática	1	36,00**		
Cúbica	1	5,00 ^{ns}		
Tratamentos	3	148,66**		
Resíduo	4		0,98	2,31
Concentração de DMSO 15%				
Linear	1	793,80**		
Quadrática	1	64,00**		
Cúbica	1	16,20 -		
Tratamentos	3	291,33**		
Resíduo	4		0,98	1,91
Gemas vivas (%)				
Cultivar Pérola				
Linear	1	1960,00**		
Quadrática	1	200,00**		
Cúbica	1	40,00 -		
Tratamentos	3	733,33**		
Resíduo	4		0,98	6,66
Cultivar EMEPA 1				
Linear	1	2250,00**		
Quadrática	1	50,00**		
Cúbica	1	250,00 -		
Tratamentos	3	850,00**		
Resíduo	4		0,90	5,71

(continuação de Tabela 7.)

Tamanho das gemas vivas (cm)				
Cultivar Pérola				
Linear	1	11155,60**		
Quadrática	1	2,00 ^{ns}		
Cúbica	1	2958,40 -		
Tratamentos	3	4705,33**		
Resíduo	4		0,79	2,38
Cultivar EMEPA 1				
Linear	1	8179,60**		
Quadrática	1	18,00*		
Cúbica	1	1638,40 -		
Tratamentos	3	3278,66**		
Resíduo	4		0,83	2,85