

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA  
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS - CESBA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE - PPGAA**

**JULIANA DE PAULA ALVES**

**MORFOFISIOLOGIA DO ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA EM CULTIVO  
FOTOMIXOTRÓFICO *IN VITRO* E EM CONDIÇÃO *EX VITRO***

**JULIANA DE PAULA ALVES**

**MORFOFISIOLOGIA DO ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA EM CULTIVO  
FOTOMIXOTRÓFICO *IN VITRO* E EM CONDIÇÃO *EX VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Eliemar Campostrini

Co-orientador: Prof. Dr. Diego Silva Batista

Alves, Juliana de Paula.

Morfofisiologia do abacaxizeiro cv. pérola em cultivo fotomixotrófico *in vitro* e em condição *ex vitro* / Juliana de Paula Alves. – Balsas, MA, 2021.

65 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agricultura e Ambiente, Centro de Estudos Superiores de Balsas, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Eliemar Campostrini.

1.*Ananas comosus* L. 2. Cultivo *in vitro*. 3.Trocas gasosas. 4.Vedação. 5.Sacarose. I. Título.

CDU: 634.774

**JULIANA DE PAULA ALVES**

**MORFOFISIOLOGIA DO ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA EM CULTIVO  
FOTOMIXOTRÓFICO *IN VITRO* E EM CONDIÇÃO *EX VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador (a): Prof. Dr. Eliemar Campostrini

Aprovada em 29 / 10 / 2021

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Eliemar Campostrini  
Fisiologia Vegetal  
UENF/CCTA  
Matr. 664-3

---

Prof. Dr. Eliemar Campostrini  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro



---

Prof.ª Dr.ª Thais Roseli Corrêa  
Universidade Estadual do Maranhão



---

Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis  
Universidade Estadual do Maranhão



---

Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro  
Universidade Estadual do Maranhão

*Dedico a todos os pesquisadores que se mantem firme na luta para realizar pesquisa e desenvolver a ciência.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

Aos meus pais Raimundo Nonato e Euraci e meus irmãos Renato e Rodrigo por todo amor, carinho, e confiança em mim. Por acreditarem em meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu noivo por todo amor, carinho, companheirismo e por me aturar até mesmo nos meus momentos de crise. Por acreditar na minha capacidade quando eu mesma duvidava. Enfim, por ser esse companheiro incrível.

A Universidade Estadual do Maranhão – UEMA e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e ambiente, pela oportunidade de participar de curso que ampliou meu conhecimento e me abriu portas para novas descobertas e crescimento pessoal e profissional.

A FAPEMA pela concessão de bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Eliemar Compostrini, por seus ensinamentos e apoio, que mesmo a distância conseguiu me ajudar para realização deste trabalho.

Aos professores. Thais Roseli Corrêa, Marcos Vinícius Marques Pinheiro e Diego Silva Batista pelos conselhos, orientação e amizade.

Aos professores Fábio e Tiago e ao bolsista Patrick por me ajudarem com as análises e ao Prof. Fabrício pela disponibilização dos equipamentos.

A minha amiga de mestrado Maria Luara, que esteve sempre ao meu lado me ajudando no desenvolvimento deste trabalho, pelos momentos de descontração e conselhos.

Ao Givago e Tácia por terem me ajudado tanto no desenvolvimento desde trabalho, desde inoculação até as análises. Por compartilharem seus conhecimentos comigo, vocês foram fundamentais para desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de cultura de cultura de tecidos - LCT Karina, Iris, Hidelbrando e Lúcio por toda ajuda, pelos momentos de descontração e estudos.

Aos amigos que fiz no mestrado Marciane, Karol, Victor, Valéria, Rayane, Célio, Raabe, Joe, Midylane e Henrique, pelos momentos de alegria e descontração.

Por fim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta pela execução deste trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO

O abacaxi (*Ananas comosus*) é uma fruta consumida mundialmente, e representa fonte de emprego e renda para vários países. Para atender a demanda por frutos, é necessário sempre ter uma oferta intensa de mudas. Para isso, a micropropagação se destaca como uma técnica para aumentar a produção e a qualidade de mudas em menor tempo. Assim, esta pesquisa teve como objetivo verificar se o ambiente fotoautotrófico/fotomixotrófico pode propiciar, otimização da capacidade fotossintética e crescimento das plantas, por meio da redução na concentração da sacarose no meio de cultivo, otimização das trocas gasosas e elevação da radiação fotossinteticamente ativa. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 2x3, sendo dois tipos de vedações (tampas de polipropileno sem e com orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases) e três concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g L<sup>-1</sup>), totalizando seis tratamentos, com cinco repetições cada e a unidade experimental composta por um frasco contendo três plantas. Aos 90 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados comprimento da parte aérea (CPA, cm), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR, cm), área foliar (AF, cm<sup>2</sup>), massa foliar específica (MFE, g m<sup>-2</sup>), massa fresca e seca da parte aérea e radicular (MFPA, MSPA, MFR, MSR, g, respectivamente), massa seca total (MST, g), partição de fotoassimilados para raiz (PFR, %), partição de fotoassimilados para a parte aérea (PFPA, %), relação massa seca parte aérea por massa seca da parte radicular (MSPA/MSPR), rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), o índice fotossintético (IF), a densidade de centros de reação ativos do fotossistema II por unidade de fótons absorvidos (RC/ABS), assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (A, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), índice SPAD, pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total, carotenoides, clorofila *a/b*, clorofila (*a+b*)/carotenoides (μg mm<sup>-2</sup>) e índice estomático (%). Ainda, cinco plantas de cada tratamento foram aclimatizadas em casa de vegetação e durante esta etapa foram avaliadas assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (A), rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), índice fotossintético (IF) e índice SPAD aos 5, 10 e 15 dias após aclimatização *ex vitro*. Foi possível observar que a total eliminação da sacarose do meio de cultivo *in vitro*, mesmo utilizando as membranas permeáveis, o abacaxizeiro cv. Pérola não produziu biomassa. Com a utilização das membranas permeáveis e com redução da sacarose para 10 g L<sup>-1</sup> no meio de cultivo, houve maior comprimento da parte aérea, da área foliar, incremento de massa fresca da parte aérea, maior índice fotossintético, e maiores teores de clorofila *a*, total e carotenoides. Este ganho na produção de biomassa no tratamento frasco com membranas e 10 g L<sup>-1</sup> não foi associado a maior assimilação fotossintética do carbono. Assim o cultivo fotomixotrófico do abacaxizeiro *in vitro*, é indicado o uso das membranas permeáveis e concentração de sacarose no meio de cultivo de 10 g L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* L., cultivo *in vitro*, trocas gasosas, vedação, sacarose

## ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus*) is a fruit consumed worldwide, and represents a source of employment and income for several countries. To meet the demand for fruit, it is always necessary to have an intense supply of seedlings. For this, micropropagation stands out as a technique to increase the production and quality of seedlings in less time. Thus, this research aimed to verify whether the photoautotrophic / photomixotrophic environment can provide, optimization of photosynthetic capacity and plant growth, by reducing the concentration of sucrose in the culture medium, optimizing gas exchange and increasing photosynthetically active radiation. The experiment was carried out in a completely randomized design, 2x3 factorial scheme, with two types of seals (polypropylene lids without and with holes covered by gas permeable membranes) and three using sucrose (10, 20 and 30 g L<sup>-1</sup>) totaling six treatments, with five repetitions each and the experimental unit consisting of a flask containing three plants. At 90 days of *in vitro* cultivation, shoot length (CPA, cm), number of leaves (NF), length of the longest root (CMR, cm), leaf area (AF, cm<sup>2</sup>), specific leaf mass (MFE) were obtained. , g m<sup>-2</sup>), fresh and dry mass of aerial and root parts (MFPA, MSPA, MFR, MSR, g, respectively), total dry mass (MST, g), photoassimilates partition for root (PFR,%), partition of photoassimilates to shoot (PFPA,%), ratio shoot dry mass to root dry mass (MSPA / MSPR), maximum quantum yield of photosystem II (PSII, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), photosynthetic index (IF) , the density of photosystem II active reaction centers per unit of absorbed photons (RC / ABS), photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation (A, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), SPAD index, photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b*, total , carotenoids, chlorophyll *a* / *b*, chlorophyll (*a* + *b*) / carotenoids (μg mm<sup>-2</sup>) and stomatal index (%) In addition, five plants from each treatment were acclimatized in a greenhouse photosynthetic assimilation of CO<sub>2</sub> (A), maximum quantum yield of photosystem II (PSII) (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), photosynthetic index (IF) and SPAD index at 5, 10 and 15 days after *ex vitro* acclimatization were evaluated. It was possible to observe that the total elimination of sucrose from the *in vitro* culture medium, even using pineapple cv. Pearl did not produce biomass. With the use of permeable membranes and the reduction of sucrose to 10 g L<sup>-1</sup> in the culture medium, there was a greater length of shoot and leaf area, increase in shoot fresh mass, higher photosynthetic index, and higher levels of chlorophyll *a*, total and carotenoids. This gain in biomass production in the treatment flask with membranes and 10 g L<sup>-1</sup> was not associated with greater photosynthetic carbon assimilation. Thus, the photomixotrophic cultivation of pineapple *in vitro*, the use of permeable membranes and sucrose concentration in the culture medium of 10 g L<sup>-1</sup> is indicated.

**Keywords:** *Ananas comosus* L., *in vitro* culture, gas exchange, sealing, sucrose

## LISTA DE SIGLAS

- A – Assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>
- AF - Área foliar
- ANA - Ácido naftaleno acético
- BAP - Benzilaminopurina
- C3 – Metabolismo C3
- CAM- Metabolismo ácido das crassuláceas
- Cl a – Clorofila *a*
- Cl b – Clorofila *b*
- Cl total – Clorofila total
- CMR - Comprimento da maior raiz
- CPA - Comprimento da parte aérea
- DIC - Delineamento inteiramente casualizado
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- ET/TR-ET - Eficiência no transporte de elétrons após Q<sub>a</sub> ter sido reduzida
- FAO - Organização da Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
- FFF - Fluxo de fótons fotossintéticos
- F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> - Rendimento quântico máximo do fotossistema II
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IE - Índice estomático
- IF - Índice fotossintético
- IRGA - Analisador de Gás Infravermelho
- LCT - Laboratório de cultura de tecidos de plantas - UEMA
- LED - Diodos Emissores de Luz
- MFE - Massa foliar específica
- MFPA – Massa fresca da parte aérea
- MFR – Massa fresca radicular
- MS – Murashige e Skoog
- MSPA – Massa seca da parte aérea
- MSPA/MSR - Relação massa seca parte aérea por massa seca da porção radicular
- MSR- Massa seca radicular
- MST - Massa seca total

NF - Número de folhas

PFPA- Partição de fotoassimilados para a parte aérea

PFR - Partição de fotoassimilados para raiz

pH – Potencial hidrogenionico

FSII – Fotossistema II

PTFE - Politetrafluoroetileno

Qa – Quinona a

RC/ABS - Densidade de centros de reação ativos do fotossistema II

RFA – Radiação fotossinteticamente ativa

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas aos diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. (A) com membranas e 10 g L<sup>-1</sup>; (B) sem membranas e 10 g L<sup>-1</sup>; (C) com membranas e 20 g L<sup>-1</sup>; (D) sem membranas e 20 g L<sup>-1</sup>; (E) com membranas e 30 g L<sup>-1</sup>; (F) sem membranas e 30 g L<sup>-1</sup>. Barras = 1cm. .... 34

**Figura 2.** Número de folhas (A), comprimento da parte aérea (B), comprimento da maior raiz (C) e área foliar (D) de plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Para variável comprimento da maior raiz, médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. .... 36

**Figura 3.** (A) Massa fresca da parte aérea (MFPA, g), (B) massa fresca radicular (MFR, g), (C) massa seca da parte aérea (MSPA, g) e (D) massa seca total (MST, g) de plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para variável MST, médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. .... 37

**Figura 4.** (A) Partição de fotoassimilados para parte aérea (PFPA, %), e (B) raiz (PFR, %), (C) relação massa seca da parte aérea/ massa seca radicular (MSPA/MSR) de plantas *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. .... 39

**Figura 5.** Índice estomático (A), índice SPAD (B), clorofila *a* (C), clorofila total (D), clorofila *a/b* e carotenoides (E) de plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. .... 41

**Figura 6.** (A) Índice fotossintético (IF), (B) densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS), (C, D) assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) de plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a

diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. .... 42

**Figura 7.** Temperatura e umidade relativa máxima, média e mínima dentro da casa de vegetação, durante o processo de aclimatização, 25/02/2021 a 17/03/2021. .... 44

**Figura 8.** Assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (A) e Índice SPAD (B) de plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 05 dias de aclimatização. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. .... 45

**Figura 9.** Índice SPAD de plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola, aos 10 dias de aclimatização. \*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. .... 46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 O abacaxizeiro .....	16
2.1.1 Importância econômica.....	16
2.1.2 Características gerais da cultura .....	16
2.2 Micropropagação .....	18
2.3 Fatores que afetam o cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	20
2.3.1 Sacarose .....	20
2.3.2 Radiação fotossinteticamente ativa (RFA) .....	21
2.3.3 Trocas gasosas .....	22
2.3.4 Eficiência fotoquímica.....	23
2.4 Aclimatização <i>ex vitro</i> de plantas .....	24
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo geral .....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Experimento I – Impacto das concentrações de sacarose e intensidade de luz nos parâmetros de crescimento e fisiológicos de abacaxizeiro cv. Pérola <i>in vitro</i> .....	27
4.1.1 Material vegetal e condições de cultivo .....	27
4.1.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas .....	28
4.1.3 Análises estatísticas .....	30
4.2 Experimento II – Potencial fisiológico de plantas de abacaxizeiro cv. pérola em condições de aclimatização <i>ex vitro</i> .....	31
4.2.1 Material vegetal e condições de cultivo .....	31
4.2.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas .....	31
4.2.3 Análises estatísticas .....	32
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
5.1 Experimento I – Impacto das concentrações de sacarose e intensidade de luz nos parâmetros de crescimento e fisiológicos de abacaxizeiro cv. pérola <i>in vitro</i> .....	33
5.2 Experimento II – Potencial fisiológico de plantas de abacaxizeiro cv. pérola em condições de aclimatização <i>ex vitro</i> .....	43
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
6.1 Experimento I – Impacto das concentrações de sacarose e intensidade de luz nos parâmetros de crescimento e fisiológicos de abacaxizeiro cv. pérola <i>in vitro</i> .....	47
6.2 Experimento II – Potencial fisiológico de plantas de abacaxizeiro cv. pérola em condições de aclimatização <i>ex vitro</i> .....	52
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) é uma planta herbácea, perene, pertencente à família Bromeliaceae, e tem origem na América tropical e subtropical (OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2016). Esta espécie é considerada rústica, e possui características anatômicas, morfológicas e fisiológicas as quais permitem essa planta sobreviver em condições desfavoráveis (REINHARDT et al., 2000). O abacaxizeiro possui grande importância econômica para o Brasil, sendo cultivado em todo território nacional. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), a produção no ano de 2019 alcançou 1.617.684 mil frutos, em uma área 67.167 hectares, com destaque as principais regiões brasileiras produtoras, Nordeste (35,7%), Norte (31,4%), Sudeste (26,5%), Centro Oeste (5,1%) e Sul (1,3%) da produção do País.

As cultivares mais plantadas no mundo são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Española Roja, Pérola (Pernambuco) e Perolera (CUNHA, 2007). Cerca de 70% dos plantios mundiais é da cultivar Smooth Cayenne, e no Brasil, a cultivar Pérola é a mais plantada (SAMPAIO et al., 2011). Ambas as cultivares são suscetíveis a fusariose, uma das principais doenças da cultura do abacaxi (CABRAL et al, 2003).

A propagação do abacaxizeiro é vegetativa, por meio do uso de diversas estruturas da planta adulta, denominadas coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão (CRESTANI et al., 2010). No entanto, estas estruturas apresentam irregularidades no material propagativo em tamanho e vigor, além da necessidade de muito material vegetativo, mão-de-obra e tempo (RAMALHO et al., 2009). Ainda, este tipo de propagação produz plantas de baixa qualidade fitossanitárias, podendo favorecer a disseminação de pragas e doenças (OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2016). Desta maneira, a micropropagação justificando-se pela elevada taxa de obtenção de mudas, alta qualidade fitossanitária, elevado vigor e uniformidade, e formação de plantas com sistema radicular desenvolvido (SANTOS et al., 2015).

No cultivo *in vitro* convencional (micropropagação convencional, se utilizam frascos vedados sem ventilação), as plantas possuem o metabolismo do tipo mixotrófico, uma vez que se tem na sala de cultivo, baixa radiação fotossinteticamente ativa (RFA), e, no frasco de cultivo, se tem alta umidade relativa do ar e limitadas concentrações de CO<sub>2</sub> (WOLF et al., 1998). Neste tipo de cultivo é usada a sacarose, como fonte exógena de carbono no meio de cultivo (ARIGITA et al., 2010; BRAGA et al., 2011). Ainda as plantas micropropagadas de forma convencional podem apresentar distúrbios anatômicos e metabólicos, sendo estes

distúrbios capazes de impossibilitar uma adequada capacidade fotossintética (XIAO e KOZAI, 2004; FUENTES et al., 2007), conseqüentemente, o processo de aclimatização pode ser comprometido (CHA-UM et al., 2010).

Algumas alterações no sistema de cultivo podem ser realizadas, como no caso do sistema fotomixotrófico, proporcionando aumento das trocas gasosas dos frascos de cultivo, elevação da qualidade e da intensidade de luz, e redução de carboidrato no frasco de cultivo, e assim, melhorar a eficiência fotoquímica e a assimilação fotossintética do carbono, o que se pode produzir plantas mais rústicas metabolicamente (XIAO e KOZAI, 2004; FUENTES et al., 2007; DAMIANI; SCHUCH, 2008). Com a elevação das trocas gasosas as plantas podem ser fisiologicamente mais desenvolvidas, proporcionando plantas mais resistentes durante o processo de aclimatização (KOZAI, 2010; XIAO et al., 2011; BATISTA et al., 2017). Alguns trabalhos foram realizados com a utilização de tampas que permitem as trocas gasosas, com resultados positivos, para *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2013; SALDANHA et al., 2014; CORRÊA et al., 2015), *Capsicum annuum* (BATISTA et al., 2017) *Vernonia condensata* (FORTINI et al., 2021).

Outros fatores podem ainda influenciar nas respostas das plantas produzidas *in vitro*, como as condições de intensidade luminosa também influenciam o metabolismo primário e secundário das plantas (BATISTA et al., 2016). Maior qualidade de luz pode contribuir para o sucesso do estabelecimento das plantas *in vitro*, favorecendo a estrutura foliar e possibilitando o desenvolvimento do sistema fotossintético (SZOPA e EKIERT, 2016; NERY et al., 2021). Com a elevação das trocas gasosas e da intensidade luminosa, a sacarose pode ser reduzida no meio de culturas sem causar danos às plantas. Por exemplo, estudos realizados em *Physalis angulata* e *Polygala paniculata* mostram maior crescimento das plantas quando ocorre a redução de sacarose (SANTOS et al., 2020; NERY et al., 2021). Segundo Couto et al. (2014) a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> pode ser inibida pela presença de sacarose no meio de cultura e quando ocorre o excesso de sacarose no meio de cultura pode exercer o mesmo estresse causado pela alta intensidade luminosa, e frio nas plântulas (BADR; ANGERS e DESJARDINS, 2011, SANTOS et al., 2020).

Muitos estudos têm sido realizados buscando melhorar a qualidade morfofisiológica das plantas, Corrêa et al. (2015) avaliando o potencial fotoautotrófico *in vitro* e o desempenho fotossintético *ex vitro* em *Pfaffia glomerata*, observaram que as plantas cultivadas em ambiente fotoautotrófico possuíam desempenho fotossintético e crescimento superiores. Assim como Couto et al. (2016) avaliando a capacidade fotossintética e

crescimento *ex vitro* de dois genótipos de abacaxizeiro provenientes de cultivo *in vitro* utilizando trocas gasosas observaram que essas plantas apresentaram bom desempenho fotossintético.

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo verificar se o ambiente fotomixotrófico proporcionará nas plantas de abacaxizeiro a otimização da capacidade fotossintética e do crescimento, por meio da redução na concentração da sacarose no meio de cultivo, otimização das trocas gasosas por meio do uso de membranas permeáveis, e a elevação da RFA.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O abacaxizeiro

#### 2.1.1 Importância econômica

Segundo a Organização da Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2019) a produção mundial de abacaxi em 2017 foi estimada em 27,4 milhões de toneladas, ou seja, um acréscimo de 12,52% da produção desta fruta no período de 2012. O principal continente produtor é o asiático com 43,63% da produção da fruta (67,4 milhões de toneladas), seguido do americano com 36,91% (57,04 milhões de toneladas) (FAO, 2019).

No Brasil, o abacaxi é produzido em todo território nacional. Segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), a produção no ano de 2019 alcançou 1.617.684 mil frutos, em uma área 67.167 hectares. As principais regiões brasileiras produtoras são o Nordeste com 35,7%, Norte com 31,4%, Sudeste com 26,5%, Centro Oeste com 5,1% e Sul com 1,3% da produção do país. Em 2015, a produção de abacaxi alcançou o maior índice nacional, contudo, de 2015 para 2019, houve queda de aproximadamente 8,56% da produção, saindo de 1.769.097 para 1.617.684 mil frutos (IBGE, 2019). O estado do Pará se destaca como principal produtor, com média de 311.947 mil frutos numa área de 14.032 hectares, e o Maranhão se encontra na posição 16º no ranking de produção nacional, com média de 28.660 mil frutos em uma área de 1.318 hectares (IBGE, 2019).

#### 2.1.2 Características gerais da cultura

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) é uma planta angiosperma monocotiledônea, herbácea, semiperene e terrestre, pertence à família Bromeliaceae, e esta família possui 2700 espécies distribuídas em 56 gêneros (CRESTANI et al., 2010). A espécie se encontra no gênero *Ananas*, em que todas as cultivares comerciais pertencem a mesma espécie (GURGEL, 2017). O abacaxi teve a origem no continente americano, onde pode ser encontrado desde a América Central até o norte da Argentina. Há indícios de que o centro de origem foi o Brasil central, e a partir deste centro, espalhou-se para as demais regiões (SIMÃO, 1998; CRESTANI et al., 2010).

Como o abacaxizeiro é uma espécie tropical, se adapta bem em altitudes de até 100m, com menor ciclo, maior produção e melhor qualidade dos frutos (SILVA e TASSARA, 2001).

A espécie é bastante exigente em luz e temperatura, e locais com temperaturas entre 21°C a 31°C e Radiação Fotossinteticamente Ativa entre 1500 a 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 6,8 a 8,2 horas de luz solar por dia são ideais para o bom crescimento e desenvolvimento dessas plantas (CUNHA, 1999).

O abacaxizeiro possui em torno de 1 metro de altura, mas pode chegar até 1,5 m. Quando está completamente formada, a planta é composta de raízes, caule (talo), folhas, frutos e brotações. O sistema radicular é do tipo fasciculado, fibroso e superficial, em que um grande número de raízes se encontra entre 15 e 30cm do solo, e pode chegar até 60cm de profundidade. O caule tem o formato de clava curta e grossa. As folhas possuem formato de calha, são estreitas e rígidas e possuem espinhos. Contudo, já existem híbridos com ausência desses espinhos, como é o caso do híbrido “Vitória” (CRESTANI et al., 2010; ZAMPERLINI, 2010; LIMA, 2011).

As folhas do abacaxizeiro são classificadas conforme o formato e posição, onde a partir da folha mais externa para as folhas mais internas, são assim consideradas A, B, C, D, E e F, contando da folha mais velha e externa, para a folha mais nova e interna, respectivamente. A folha D é considerada a mais importante, pois é a folha mais jovem dentro das adultas e a mais metabolicamente ativa, por isso é a mais utilizada para realizar avaliações de crescimento e fisiológicas (REINHARDT, 2000; REINHARDT et al., 2002).

A haste central, completa o crescimento vegetativo, neste local origina-se a inflorescência, a qual possui em torno de 150 a 200 flores em espiral. A infrutescência é caracterizada por um aglomerado de pequenos frutos (gomos), em torno de um eixo central, onde cada fruto cresce a partir de uma flor. Quando eles se fundem, dão origem a um grande corpo, denominada “infrutescência” (CRESTANI et al., 2010). No ápice do fruto, se origina um aglomerado de folhas denominada “coroa”. Esta estrutura localizada no ápice do fruto é o resultado do tecido meristemático apical da planta desde a formação (PEREIRA, 2013).

O abacaxizeiro possui o fruto normalmente cilíndrico ou levemente cônico, e este é constituído por 100 a 200 pequenos frutinhos unidos entre si, por um eixo central. Dependendo da cultivar, a polpa normalmente possui coloração esbranquiçada, amarelada ou laranja-avermelhada. O peso médio dos frutos está em torno de um quilo, em que 25% deste peso se deve a coroa (CABRAL et al., 2003).

No mundo, as cultivares mais plantadas são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Spañola Roja, Pérola (Pernambuco) e Perolera (CUNHA, 2007). Cerca de 70% dos plantios é da cultivar Smooth Cayenne, seu fruto tem forma ovoide, pesa em torno de 1,5 a

2,5kg, sua polpa é amarela, e apesar de ser a mais plantada, essa cultivar não é adequada para consumo *in natura*, uma vez que a polpa possui elevada acidez, o que a torna ideal para a indústria e exportação de fruta fresca (CABRAL et al., 2003). No Brasil a cultivar Pérola é a mais plantada, apresenta porte médio, e folhas com espinhos nas bordas. O fruto pesa entre 1 a 1,5kg, possui coroa grande, casca verde e formato cônico, com polpa esbranquiçada, teor de sólidos solúveis de 14 a 16°Brix, e pouco ácida, por isso é muito consumida *in natura* (CABRAL et al, 2003).

A propagação do abacaxizeiro se dá por meio de estruturas vegetativas denominadas filhote, filhote-rebentão, rebentão e coroa (CRESTANI et al., 2010; OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2016). Contudo, estes tipos de mudas necessitam de mais tempo em campo para crescer e desenvolver, as mudas são desuniformes quanto ao tamanho, se necessita de muita biomassa vegetal para o plantio, e o vigor muitas vezes é desuniforme (SANTOS et al., 2015). Além disso, esses materiais propagativos por virem do campo, podem ter contaminantes, o que compromete a sanidade da muda e reduz a vida útil da planta. Diante disso, a micropropagação vem ganhando destaque para essa cultura.

## 2.2 Micropropagação

Em larga escala, produzir mudas de abacaxizeiro é um fator limitante para expansão da cultura, pois as mudas produzidas de modo convencional (mudas produzidas no campo) podem ser contaminadas por patógenos, como a fusariose (*Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*), uma das principais doenças da cultura (SILVA et al., 2007). Além disso, esta propagação apresenta baixo rendimento, e necessita de maior tempo e espaço para se obter grande quantidade. A técnica de cultura de tecidos vem se tornando cada vez mais importante na produção de mudas livres de patógenos (REINHARDT e CUNHA, 1999).

O termo totipotência foi proposto por Haberlandt (1902), onde buscou descrever o potencial de uma célula vegetal de se desenvolver e originar uma planta completa. A partir disso muitos pesquisadores definem como cultura de tecidos o método de cultivar células, tecidos, órgão ou parte deles, por um período determinado, em um meio de cultivo nutritivo, com ambiente totalmente asséptico, com controle de temperatura, fotoperíodo, umidade e radiação fotossinteticamente ativa (CARVALHO et al., 2011)

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos bastante eficiente e viável para produção de mudas, pois produz mudas saudáveis e em larga escala, podendo ser utilizados como

explantes, meristema apical ou gemas laterais e terminais para realizar a multiplicação das plantas (ARAÚJO; SIQUEIRA e CECOM, 2008; SILVA et al., 2017).

No cultivo *in vitro* convencional, os explantes são colocados em frascos vedados com tampas de polipropileno, o que impossibilita as trocas gasosas. Com isso, se tem um microambiente com alta umidade relativa (aproximadamente 98 a 100%), alta concentração de etileno, e baixa concentração de CO<sub>2</sub> (ARIGITA et al., 2002). Além disso, normalmente são cultivadas sob reduzida RFA, sendo então necessário a adição de uma fonte de carbono via meio de cultivo, sendo a sacarose a mais utilizada (ARIGITA et al., 2002; ALVAREZ et al., 2012; BARBOSA, 2016). Nesta condição convencional, devido à elevada umidade presente nos frascos de cultivo, as plantas crescem em ambiente com elevado conteúdo de água e possuem uma elevada quantidade deste recurso nas células (ARIGITA et al., 2002; ALVAREZ et al., 2012). Assim, durante a fase de aclimatização, apresentam alto risco de desidratação (KUBOTA e KOZAI, 1992) ou podem apresentar distúrbios fisiológicos e anatômicos, os quais podem impossibilitar a atividade do aparato fotossintético durante as condições *ex vitro* (ARIGITA et al., 2002).

Os estudos realizados mostram que, durante o fotoperíodo utilizado (geralmente 16h luz/8h escuro), a reduzida taxa fotossintética em plantas micropropagadas é causada por baixas concentrações de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos (INOUE; GRAÇA e CORREA, 1998). O ideal para a micropropagação é oferecer condições semelhantes ao do ambiente externo, como por exemplo, aumentar dentro do frasco de cultivo a RFA e a concentração de CO<sub>2</sub> (XIAO; NIU e KOZAI, 2011). Com base nestas informações, o cultivo fotoautotrófico foi desenvolvido na década de 80, e desde então vem sendo uma nova alternativa de cultivo *in vitro*, e destaca-se pela maior eficiência técnica e econômica (WALTER, 2019). Vários estudos estão sendo realizados com este tipo de cultivo fotoautotrófico de diferentes espécies, como, *Actinidia deliciosa* (ARIGITA et al., 2010), *Pfaffia glomerata* (IAREMA et al., 2012), *Capsicum frutescens* (BARBOSA, 2016) *Capsicum annuum* (WALTER, 2019), *Etilingera Elatior* (PINHEIRO et al., 2021), *Capsicum frutescens* (GRIS et al., 2021).

Durante o cultivo *in vitro* convencional, ocorre a vedação do frasco para evitar contaminação do explante, e para realizar tal vedação, geralmente são utilizadas tampas rígidas de polipropileno, filmes de PVC, tampas metálicas e outros materiais (FERREIRA et al., 2021). Com a vedação, ocorre uma limitação das trocas gasosas durante o cultivo *in vitro* e conseqüentemente pode-se ter problemas na aclimatização, devido redução da competência fotossintética, e alterações anatômicas, causadas pela restrição da entrada de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>,

redução da RFA, e distúrbios nutricionais associados à saída da molécula de água (ALVAREZ et al., 2012; BARBOSA, 2016).

Os explantes cultivados de forma heterotrófica apresentam certos distúrbios, tais como elevado conteúdo de água nas células (vitrificação ou hiperhidricidade), o que acaba aumentando a mortalidade das plantas durante a aclimatização *ex vitro*. No cultivo com baixa concentração de CO<sub>2</sub>, e reduzido valor de RFA, necessita-se da adição no meio de cultura de uma fonte de carbono, onde a sacarose é uma das fontes mais utilizada (ARIGITA et al., 2010). No entanto, quando se utiliza o cultivo fotoautotrófico, pode-se reduzir ou até mesmo suprimir o uso de carboidrato no meio de cultivo (BATISTA et al., 2017). Essa forma de cultivo pode ser chamada de cultivo fotossintético *in vitro*, cultivo inorgânico ou isento de açúcar, ou ainda cultivo fotoautotrófico (KOZAI; AFREEN e ZOBAYED, 2005; WALTER, 2019).

Em sistemas fotoautotróficos, com a otimização das trocas gasosas, pode-se ter elevação no crescimento e desenvolvimento da planta, redução dos distúrbios morfofisiológicos, elevação da assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>, e melhor estabelecimento *ex vitro* (SALDANHA et al., 2013; BATISTA et al., 2017). A utilização do cultivo fotoautotrófico pode resultar em um maior número de plantas sobreviventes na etapa de aclimatização, e plantas com características fisiológicas superiores ao sistema convencional de micropropagação (BARBOSA, 2016).

Com o aumento das trocas gasosas no sistema de cultivo, o CO<sub>2</sub> entra constantemente no frasco, expulsando o etileno e reduzindo a umidade relativa no interior dos frascos (KOZAI e NGUYEN, 2003). A alta umidade no interior dos frascos de cultivo proporciona aos tecidos foliares uma reduzida movimentação de água, impedindo a transpiração e consequentemente a translocação de nutrientes minerais, o que se pode ter inibição da síntese de celulose e lignina, com reduzida produção de biomassa (CARVALHO et al., 2011).

## 2.3 Fatores que afetam o cultivo *in vitro* de plantas

### 2.3.1 Sacarose

Na micropropagação convencional, a sacarose é utilizada como fonte de carbono para o explante, servindo para sustentar o crescimento e o desenvolvimento (KOZAI, 2010; XIAO; NIU e KOZAI, 2011; BATISTA et al., 2017), e a presença deste composto no meio de cultivo pode reduzir a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> do explante (CRESPO, 2007). A sacarose é a

fonte de carbono mais utilizada no cultivo *in vitro*, sendo considerada adequada ao crescimento, diferenciação dos tecidos e maior rapidez na absorção (WALTER, 2019).

Nas condições *in vitro*, quando a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> não é otimizada, a sacarose se torna importante, pois é a fonte de carbono para o crescimento e o desenvolvimento do explante. Contudo, a sacarose em excesso pode aumentar o grau de contaminação do meio de cultivo, promover alterações no estado hídrico (redução do potencial osmótico do meio de cultivo), inibir a síntese de clorofila, diminuir as atividades de algumas enzimas do ciclo de Calvin, e com isso pode comprometer a capacidade fotossintética da planta (KOZAI; FUJIWARA e KITAYA, 1996).

As concentrações de sacarose no meio de cultura podem variar de 10 a 40 gL<sup>-1</sup>. As concentrações acima desses valores podem ocasionar acúmulo de açúcares solúveis nas folhas, o que pode causar inibição da síntese da ribulose 1,5 – bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e da clorofila, e dificultar a regeneração da ribulose 1,5 – bifosfato (RuBP) (GEORGE, 1993). Como resultado, a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> das plantas *in vitro* podem ser reduzidas ou mesmo inibidas (ADELBERG et al., 1999). Essa desorganização fisiológica pode comprometer a etapa de aclimatização, em que as plantas podem ter dificuldades de conversão da condição mixotrófica (*in vitro*) para a condição autotrófica (*ex vitro*) (PARK et al., 2011).

### 2.3.2 Radiação fotossinteticamente ativa (RFA)

Conforme o estágio de micropropagação, tipo de explante e de espécies vegetais, torna-se necessária elevar a intensidade da RFA. Geralmente, nos estádios iniciais do cultivo *in vitro*, as brotações são mantidas em uma intensidade entre 5 a 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e na fase de enraizamento entre 30 a 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Assim, tal intensidade pode beneficiar a sobrevivência das mudas recém transplantadas (WALTER, 2019).

Durante o processo fotossintético, a RFA é absorvida pelos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*, e carotenoides). Estes pigmentos localizam-se nos tilacoides e utilizam energia do fóton na região do azul e vermelho para transformar CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos, por exemplo em carboidratos (MAGALHÃES e SILVA, 1980). A RFA geralmente é vista somente como um meio capaz de fornecer poder redutor para produzir energia, contudo ela também realiza importante papel na ativação de enzimas envolvidas na fotossíntese (TAIZ et al., 2017).

Conforme a utilização de diferentes fontes de RFA, ocorre a distribuição do espectro de luz, podendo variar significativamente. Em micropropagação, as lâmpadas fluorescentes brancas são as mais utilizadas, pois produzem pouca quantidade de calor e possibilitam uma distribuição mais uniforme da RFA sobre os frascos de cultivo (ERIG e SCHUCH, 2005).

Outra variável associada às trocas gasosas que é influenciada pela RFA é a condutância estomática. O carotenoide conhecido como zeaxantina, ativado pela luz azul, e localizado no tilacoide dos cloroplastos das células guardas dos estômatos induzem a abertura estomática por causa do desencadeamento de um processo que resulta na ativação das bombas hidrogeniônicas (SHIMAZAKI et al., 1993). Por meio dessa ação, é promovido o bombeamento de íons de  $H^+$  para o exterior da célula, desenvolvendo um gradiente eletroquímico. Esse gradiente se torna a força motriz para a absorção de  $K^+$  e  $Cl^-$ , promovendo assim a entrada de água para o interior das células guardas, o que incrementa o potencial de pressão, culminando com a abertura dos estômatos. Essa abertura possibilita a entrada de  $CO_2$  no mesofilo (SHIMAZAKI et al., 1993).

### 2.3.3 Trocas gasosas

O ambiente dentro dos frascos de cultivo é responsável pelas respostas fisiológicas das plantas, ou seja, uma menor ou maior concentração de gases dentro dos frascos podem ser determinantes para o sucesso do cultivo *in vitro*. Os materiais utilizados para fazer a vedação dos frascos podem ser dos mais variados, desde tampas rígidas de polipropileno, filme PVC, papel alumínio e tampas rígidas de polipropileno com membranas microporo, dependendo do material utilizado a entrada do  $CO_2$  no interior dos frascos pode ser facilitada, favorecendo a fotossíntese, conseqüentemente a aclimatização (ZOBAYED, 2000; GONÇALVES et al., 2008).

Nas plantas micropropagadas e nas plantas em processo de aclimatização, as trocas gasosas podem ser avaliadas por meio de analisadores de gases a infravermelho, onde se quantificam a assimilação fotossintética de  $CO_2$  e a transpiração, e tais avaliações podem indicar as respostas da planta no ambiente que ela está inserida (TAKAHASHI et al., 2007).

A avaliação da fotossíntese é feita por meio da quantificação do diferencial de concentração de  $CO_2$  do ar que entra e do ar que sai da câmara onde a folha, ou parte da folha, está inserida. Este sistema determina reduzidas alterações nas trocas gasosas de forma rápida e precisa (TAKAHASHI et al., 2007). É muito importante avaliar a assimilação fotossintética

de CO<sub>2</sub>, pois o crescimento e a produtividade vegetal podem ter relação direta com essa variável.

Ao se elevar os valores das trocas gasosas nos frascos de cultivo com o ar externo, pode-se reduzir a concentração interna de etileno nos frascos. Sem trocas gasosas eficientes, pode ocorrer o acúmulo de etileno e assim reduzir o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*. Tal comprometimento no crescimento é devido à alteração na diferenciação celular, na morfologia, por meio da redução na expansão foliar, e na redução do comprimento dos brotos (JACKSON et al., 1991). Estes efeitos afetam negativamente a regeneração de novos brotos (BIDDINGTON, 1992), por meio da necrose apical nas plantas cultivadas *in vitro* (FERREIRA, 2014).

#### 2.3.4 Eficiência fotoquímica

A análise da emissão da fluorescência da clorofila *a*, em função do tempo, também é uma técnica que pode ser utilizada para avaliar a eficiência fotossintética, por meio da avaliação da eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII) (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

Assim como as avaliações das trocas gasosas, a emissão da fluorescência da clorofila *a* também é um bom indicador da atividade do aparato fotossintético das plantas, já que a molécula de clorofila é essencial para a ocorrência do processo fotossintético. A fluorescência da clorofila permite analisar a atividade do fotossistema II e do transporte de elétrons da fase fotoquímica, proporcionando uma análise completa desta fase da fotossíntese (MEYER e GENTY, 1999). Indiretamente, a análise de fluorescência em função do tempo pode avaliar a atividade/estrutura das membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Nestas membranas, localizam-se os complexos proteína/pigmentos responsáveis pela captura da energia dos fótons. Caso estas membranas estejam comprometidas, é possível estimar o dano por meio da emissão da fluorescência (RIBEIRO et al., 2003; BAKER e ROSENQVST, 2004).

Na avaliação da fluorescência da clorofila *a*, uma das variáveis determinadas é a eficiência quântica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ). Essa relação mede a eficiência quântica dos centros de reações abertos do fotossistema II, mostrando a probabilidade com que um elétron absorvido pelos pigmentos fotossintéticos do fotossistema II consiga reduzir a quinona A (Qa) localizada no polipeptídeo D1 do FSII (KRAUSE e WEIS, 1991). Em condições ambientais ótimas, a relação  $F_v/F_m$  encontra-se em torno de 0,75 a 0,85, ou seja, em uma folha saudável

existe a probabilidade de 75% a 85% de que o elétron absorvido pelo sistema antena consiga causar redução na quinona A localizada no FSII (BOLHÀR-NORDENKAMPF e ÖQUIST, 1993).

Uma outra variável importante de ser analisada é o índice fotossintético (IF), pois é um bom indicador atividade do processo fotossintético. Segundo STRASSER et al., 2000, a variável IF, quando comparada com a relação  $F_v/F_m$ , é mais completa e mais precisa em avaliar a atividade fotoquímica da fotossíntese. A variável IF é uma avaliação que engloba três variáveis, sendo a densidade dos centros de reações ativos em relação a capacidade de absorção dos fótons (RC/ABS), a eficiência no transporte de elétrons após a  $Q_a$  ter sido reduzida (ET/TR-ET), e a probabilidade de que um fóton absorvido seja capaz de reduzir a  $Q_a$  ( $F_v/F_0$ ) (STRASSER et al., 2000). Uma das principais vantagens de usar a variável IF é o fato de que esta variável pode indicar um estresse na planta antes mesmo os sintomas do estresse se tornar visível (CHRISTEN et al., 2007).

#### 2.4 Aclimatização *ex vitro* de plantas

A aclimatização consiste na última etapa da micropropagação, em que as plantas provenientes do cultivo *in vitro* são adaptadas às condições *ex vitro* em uma casa de vegetação (GIRARDI e PESCADOR, 2010). Esta fase é tão importante quanto as demais da micropropagação, e pode ser limitante para produção comercial de mudas, pois dependendo do estado fisiológico das plantas provenientes da fase *in vitro*, muitas plantas não sobrevivem nesta etapa *ex vitro* (PELIZZA et al., 2011; ROZALI e RASHID, 2015).

O sucesso da excelente aclimatização está ligado à capacidade da planta de passar da condição mixotrófica para a autotrófica, sendo muitas vezes dependente de fatores abióticos como a umidade relativa, a temperatura, a radiação fotossinteticamente ativa, a qualidade do substrato, e de fatores bióticos como pragas e doenças; e da presença das raízes, bem como a capacidade das mudas de produzirem novas raízes (HAZARIKA, 2006). Torna-se importante que esta fase de aclimatização seja gradual, pois as plantas passam de um ambiente onde não possuíam gasto energético, para outro ambiente em que necessitam aumentar as taxas fotossintéticas/respiratórias e escapar do estresse hídrico (XAVIER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Nesta fase, é o período de mudança de ambiente e substrato, e é considerada a etapa mais difícil, uma vez que ocorre uma perda excessiva de água por transpiração. Contudo, algumas plantas mesmo possuindo raízes na etapa *in vitro*, a absorção de água e

nutrientes pode ser prejudicada pela falta de eficiência das raízes (como exemplo o aumento na resistência hidráulica) (SILVA et al., 2011).

Durante a fase de aclimatização, o manejo de irrigação é de fundamental importância, pois a água é um dos fatores que mais limitam a sobrevivência e crescimento das plantas. A frequência com que se deve irrigar, é de fundamental importância para o estabelecimento das plantas, pois irrigações em excesso ou deficientes podem afetar negativamente o crescimento e desenvolvimento da planta (FARIAS e SAAD, 2005; BOMFIM et al., 2011; FARIA et al., 2012). Durante esta fase, um outro fator importante a ser considerado é o controle de RFA. As modificações nos níveis da RFA podem provocar diferentes respostas fisiológicas nas plantas, podendo ser estas bioquímicas, anatômicas e/ou relacionadas ao crescimento vegetal. Diante disto, no início da aclimatização, deve-se minimizar a diferenças da RFA entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* (BRAGA et al., 2011).

O tempo de aclimatização depende de uma série de fatores, mas principalmente da cultivar que está sendo aclimatizada. Para o abacaxizeiro, este tempo pode ser de cinco meses. Geralmente, na casa de vegetação, quando as condições estão controladas, observam-se três meses de cultivo, desde que as condições ambientais de RFA, temperatura e umidade relativa sejam favoráveis (SOUZA et al., 2009). Ainda, segundo estes autores o crescimento tende a ser lento, mas a sobrevivência das plantas na maioria das vezes pode atingir a 100%.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Esta pesquisa teve como objetivo verificar se o ambiente fotoautotrófico/fotomixotrófico *in vitro* por meio da redução na concentração da sacarose no meio de cultivo, otimização das trocas gasosas por meio do uso de membranas permeáveis a gases, e a elevação da RFA. Pode propiciar a explantes de abacaxizeiro, uma otimização da capacidade fotossintética e crescimento das plantas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Verificar se a redução de sacarose proporcionou ambiente fotoautotrófico/fotomixotrófico.
- Avaliar se a utilização de membranas porosas a gases afetou a morfologia das plantas micropropagadas de abacaxizeiro.
- Estabelecer um protocolo fotoautotrófico/fotomixotrófico para a micropropagação de mudas de abacaxi cv. Pérola.
- Verificar se durante a aclimatização *ex vitro* as plantas apresentaram metabolismo fotossintético mais desenvolvido.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Experimento I – Impacto das concentrações de sacarose e intensidade de luz nos parâmetros de crescimento e fisiológicos de abacaxizeiro cv. Pérola *in vitro*

#### 4.1.1 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), localizado em São Luís, MA (*Latitude*: 2° 31' 51" Sul, *Longitude*: 44° 18' 24" Oeste) nos anos de 2020 e 2021. Para tanto, utilizaram-se brotações previamente estabelecidas *in vitro* de *Ananas comosus* cv. Pérola. As brotações foram subcultivadas cinco vezes em meio MS (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2,5 µM de benzilaminopurina (BAP) (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Agargel<sup>®</sup>, João Pessoa, Brasil).

Para a realização do experimento, as folhas das brotações foram cortadas próximo à base, de modo que os talos apresentassem comprimento aproximado de 1 cm. Este fato permitiu que o crescimento da planta fosse avaliado somente por meio de folhas formadas nas condições do cultivo *in vitro* estabelecido.

Após os cortes em câmara de fluxo laminar, os explantes foram transferidos para frascos de vidro transparentes com capacidade de 350 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Nesse meio, foram adicionados 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 2,7 µM de ácido naftalenoacético (ANA), e sacarose nas concentrações de 10, 20 ou 30 g L<sup>-1</sup>, e um meio de cultura sem sacarose foi vertido em frascos com membranas e sem membranas. O meio foi solidificado com 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), o pH ajustado em 5,7 ± 0,1, e autoclavado a 121 °C a uma pressão de 1,5 atm, por 15 minutos.

Os frascos de cultivo foram vedados com tampas de polipropileno, com orifícios cobertos ou não por membranas permeáveis à gases nas tampas, de acordo com os tratamentos. Nas tampas de polipropileno, foram feitos dois orifícios de 10 mm de diâmetro cada, os quais foram cobertos por uma membrana composta por duas camadas de fita microporosa Missner<sup>®</sup> e um PTFE (Politetrafluoroetileno) Poly<sup>®</sup> de 0,05 ± 0,01 mm de espessura, seguindo metodologia proposta por Saldanha et al. (2012).

Os frascos de cultivo permaneceram em sala de crescimento com condições controladas, temperatura média de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com intensidade luminosa de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , provenientes de quatro lâmpadas tubulares do tipo LED branco (Diodos Emissores de Luz, T8, 9 W, Avant, São Paulo - SP, Brasil).

#### 4.1.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas

As plantas cultivadas nos tratamentos que não continham sacarose, independentemente do tipo de vedação senesceram, por esta razão, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial  $2 \times 3$ , sendo dois tipos de vedação (tampas de polipropileno com orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases e tampas sem orifícios) e três concentrações de sacarose (10, 20 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ), totalizando seis tratamentos, com cinco repetições cada. A unidade experimental foi composta por um frasco contendo três plantas.

Aos 90 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA, cm), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR, cm), área foliar (AF,  $\text{cm}^2$ ), massa foliar específica (MFE,  $\text{g m}^{-2}$ ), massa fresca e seca da parte aérea e radicular (MFPA, MSPA, MFR, MSR, g, respectivamente), massa seca total (MST, g), partição de fotoassimilados para raiz (PFR, %), partição de fotoassimilados para a parte aérea (PFPA, %), relação massa seca parte aérea por massa seca da radicular (MSPA/MSR), rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), o índice fotossintético (IF), , densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS), assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  (A,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), índice SPAD, pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total, carotenoides, clorofila *a/b*, clorofila  $(a+b)$ /carotenoides ( $\mu\text{g mm}^{-2}$ ) e índice estomático (IE, %).

#### Área foliar e variáveis de massas fresca e seca

Para área foliar (AF,  $\text{cm}^2$ ) foi determinada utilizando o software Image J<sup>®</sup>. Para a obtenção da massa foliar específica (MFE,  $\text{g m}^{-2}$ ), esta variável foi obtida a partir da razão entre a massa seca da parte aérea e a área foliar (MSPA/AF).

Para realização das análises das massas fresca da parte aérea (MFPA, g) e radicular (MFR, g), as plantas foram cortadas na altura do colo e logo em seguida, pesadas em balança analítica de precisão, sendo então acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas a

estufa de circulação forçada de ar à 70 °C por 48 horas. Posteriormente, este material foi pesado para obtenção dos valores das massas secas da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR) (COUTO et al., 2014). A partir destes dados, foram calculados a massa seca total (massa seca da parte aérea + massa seca da parte radicular) (MST, g), a partição de fotoassimilados para raiz (PFR, %) e partição de fotoassimilados para a parte aérea (PFPA, %), bem como a relação MSPA/MSR.

#### Eficiência fotoquímica, trocas gasosas e índice SPAD

Foram avaliados o rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), índice fotossintético (IF) e a densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS). Estas variáveis foram determinadas na folha mais desenvolvida fisiologicamente e a de maior área. Para tanto, foi utilizado o fluorímetro não-modulado modelo Pocket PEA (*Plant Efficiency Analyser, Hansatech, UK*). Antes das avaliações da emissão da fluorescência da clorofila *a*, foi posicionada uma pinça nas folhas para a adaptação ao escuro por 30 minutos. Esta adaptação foi realizada para que os centros de reações estivessem completamente abertos com uma perda mínima de calor. Procedido a adaptação, um pulso de luz saturante de 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi aplicado por meio de três diodos emissores de luz de comprimento de onda de 650 nm (GONÇALVES, et al., 2010).

Para a avaliação assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  (A), nas plantas recém retiradas da condição *in vitro*, foi utilizado o analisador de gás no infravermelho (IRGA, *Infrared Gas Analyser, LI-6400 XT, Licor Ltda, USA*). Com uma intensidade luminosa de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi determinada a assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  (A) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Como as folhas das plantas eram reduzidas para ocupar todo espaço da câmara do IRGA, com 6  $\text{cm}^2$ , foi feita uma adaptação reduzindo a área de leitura do equipamento para 2  $\text{cm}^2$ . As avaliações foram feitas 2 horas após os LEDs da sala de crescimento serem ligados. Tanto para as medições da eficiência fotoquímica como para as trocas gasosas foram utilizadas uma folha por planta.

No mesmo período, foi analisado o índice SPAD, que mede a intensidade de verde das folhas, foi avaliado por meio do medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 (*Soil Plant Analysis and Development*) (Minolta, Japão), para isto, nas mesmas plantas utilizadas para a avaliação da emissão da fluorescência e trocas gasosas, foram realizadas três leituras pinçando a folha próximo a base, no meio e no ápice. A folha escolhida para realizar a avaliação foi a quinta a partir do ápice e assim obtendo o valor de índice SPAD.

## Pigmentos fotossintéticos

Os teores de pigmentos fotossintéticos foram determinados aos 90 dias do cultivo *in vitro* (final do experimento) por meio do método espectrofotométrico de extração com o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com 5 g L<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) (SANTOS et al., 2008). Para isso, foram retirados cinco discos de 5 mm de diâmetro cada da folha D, sendo acondicionados em tubos de ensaio contendo 5,0 mL da solução de DMSO saturado com CaCO<sub>3</sub>, e mantidos no escuro por 48 horas, em temperatura ambiente (±25°C). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (BEL Engineering, UV-M51 UV/Vis Spectrophotometer) nas absorvâncias de 480, 645 e 665 nm (WELLBURN, 1994). Os teores de clorofila e carotenoides foram calculados de acordo com as equações de Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 12,19A_{665} - 3,45A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 21,99A_{645} - 5,32A_{665}$$

$$\text{Carotenoides (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (1000A_{480} - 2,14 \text{ Clorofila } a - 70,16 \text{ Clorofila } b)/220$$

## Índice estomático

Para avaliar o índice estomático foi usado adesivo instantâneo (SuperBonder®), as lâminas foram montadas utilizando-se a impressão epidérmica adaxial e abaxial da folha mais desenvolvida. O material foi analisado em microscópio Leica DME e fotografado com auxílio do aplicativo LAS EZ (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). As imagens foram processadas pelo *software* Anati quanti (AGUIAR et al., 2007) e o índice foi calculado de acordo com Cutter (1978):

$$\text{Índice Estomático (\%)} = C_2 * 100 / (C_1 + C_2)$$

Em que: C<sub>1</sub> = células epidérmicas e C<sub>2</sub> = estômatos

### 4.1.3 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-wilk. Para as variáveis massa seca radicular, massa seca total, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, clorofila *b*, relação de

clorofila  $a/b$ , clorofila  $(a+b)/\text{carotenoides}$  e assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$ , os dados foram transformados em raiz quadrada de  $Y=\sqrt{x+0,5}$ . Os parâmetros número de folhas, comprimento da maior raiz, partição de fotoassimilados para raiz e partição de fotoassimilados para a parte aérea foram transformados em raiz quadrada de  $Y=\sqrt{x+1}$ . Após estas transformações, os dados foram submetidos a análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

## **4.2 Experimento II – Potencial fisiológico de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola em condições de aclimatização *ex vitro***

### 4.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Ao final dos 90 dias de cultivo *in vitro*, cinco plantas de cada tratamento foram aclimatizadas em casa de vegetação, localizada na Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), São Luís, MA (*Latitude*: 2° 31' 51" Sul, *Longitude*: 44° 18' 24" Oeste). Para isso, as plantas, provenientes dos diferentes tratamentos do Experimento I, foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para remover os resíduos de meio de cultura aderido às raízes. As plantas foram transferidas para bandeja de polipropileno de 98 células, com capacidade total de 2,9 L e volume das células 0,030 L. Estes recipientes foram preenchidos com substrato comercial Basaplant Hortaliças® (Artur Nogueira, Brasil), contendo turfa, casca de pinus, carvão, vermiculita, adubação inicial com NPK e micronutrientes.

Em condições de casa de vegetação, as plantas foram mantidas sob irrigação por sistema de microaspersão, e esse sistema de irrigação era acionado a cada 30 minutos com duração de 1 minuto, das 6:00 às 18:00 horas, sendo monitoradas a temperatura e umidade relativa, com dados salvos a cada 30 minutos durante todo experimento, utilizando-se o Data Logger HOBO®, USA.

### 4.2.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas

As plantas provenientes do cultivo *in vitro* oriundas do primeiro experimento foram aclimatizadas conforme os tratamentos utilizados anteriormente. Por tanto, conduziu-se o

experimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 2x3, onde as plantas foram cultivadas com dois tipos de vedação (tampas de polipropileno com orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases e tampas sem orifícios) e três concentrações de sacarose (10, 20 e 30 g L<sup>-1</sup>), totalizando seis tratamentos, com cinco repetições cada. A unidade experimental foi composta por uma planta.

Aos 5, 10 e 15 dias durante aclimatização *ex vitro*, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência, o rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), o índice fotossintético (IF), densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS), assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), índice SPAD.

Para  $F_v/F_m$ , IF, RC/ABS utilizou-se o fluorímetro não-modulado modelo Pocket PEA (*Plant Efficiency Analyser, Hansatech, UK*), seguindo a mesma metodologia realizada para avaliar as plantas recém retiradas do cultivo *in vitro* (Experimento I). Para assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>, utilizou-se o analisador de gás no infravermelho (IRGA, *Infrared Gas Analyser*, modelo LI-6400XT, LI-COR Ltda, USA). A radiação fotossinteticamente ativa utilizada foi de 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As medições foram realizadas no período das 8:00 às 10:00 horas. O índice SPAD foi avaliado por meio do medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 (*Soil Plant Analysis and Development*, Minolta, Japão), e foram realizadas três leituras pinçando a folha próximo a base, no meio e no ápice, e obtendo o valor de SPAD. Para realizar todas as análises escolheu-se a quinta folha a partir do ápice, para proceder com as avaliações.

#### 4.2.3 Análises estatísticas

Para os dados relacionados a aclimatização, estes foram analisados de acordo com o período (5, 10 e 15 dias), no qual em cada período, os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi realizada a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento I – Impacto das concentrações de sacarose e intensidade de luz nos parâmetros de crescimento e fisiológicos de abacaxizeiro cv. Pérola *in vitro*

A partir da análise de variância, foi possível observar que o número de folhas, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, área foliar, massa fresca da parte aérea e radicular, massa seca da parte aérea, massa seca total, partição de fotoassimilados para raiz, partição de fotoassimilados para parte aérea, relação massa seca da parte/massa seca radicular, índice estomático, índice SPAD, índice fotossintético, densidade de centros de reação ativos do fotossistema II, clorofila *a*, clorofila *a/b*, clorofila total, carotenoide e assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Para comprimento da maior raiz, massa seca total, não houve interação significativa entre tipo de vedação e as concentrações de sacarose, ocorrendo significância apenas para concentrações de sacarose. Para clorofila *a/b*, houve significância apenas para tipos de vedações. A assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>, não apresentou interação significativa entre os fatores. Contudo, esta variável apresentou diferença para os fatores separados ( $p < 0,05$ ). As variáveis massa seca radicular, massa foliar específica, rendimento quântico máximo do fotossistema II, clorofila *b* e clorofila *a+b*/carotenoides não apresentaram diferenças significativa ( $p \geq 0,05$ ).

Plantas mantidas em condições de meio de cultura sem adição de carboidrato (0% de sacarose) e em ambos os tipos de vedação (frascos sem ou com membranas permeáveis a gases) não sobreviveram.

As plantas mantidas em frascos com as membranas permeáveis a gases apresentaram maior comprimento da parte aérea, e plantas mantidas em frascos sem as membranas permeáveis a gases incrementaram maior sistema radicular (Figura 1A-F).

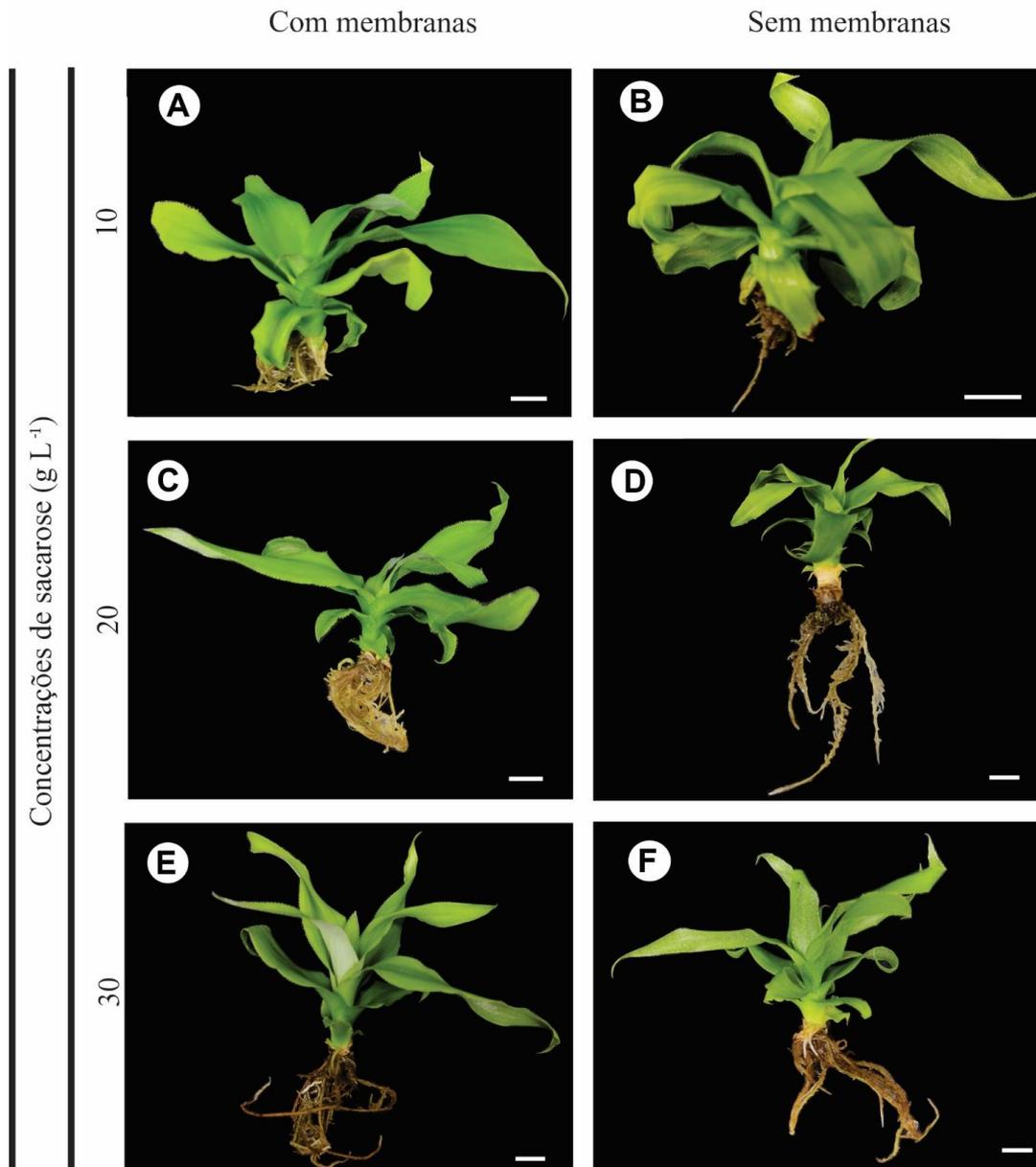
---

---

Tipos de vedações

---

---



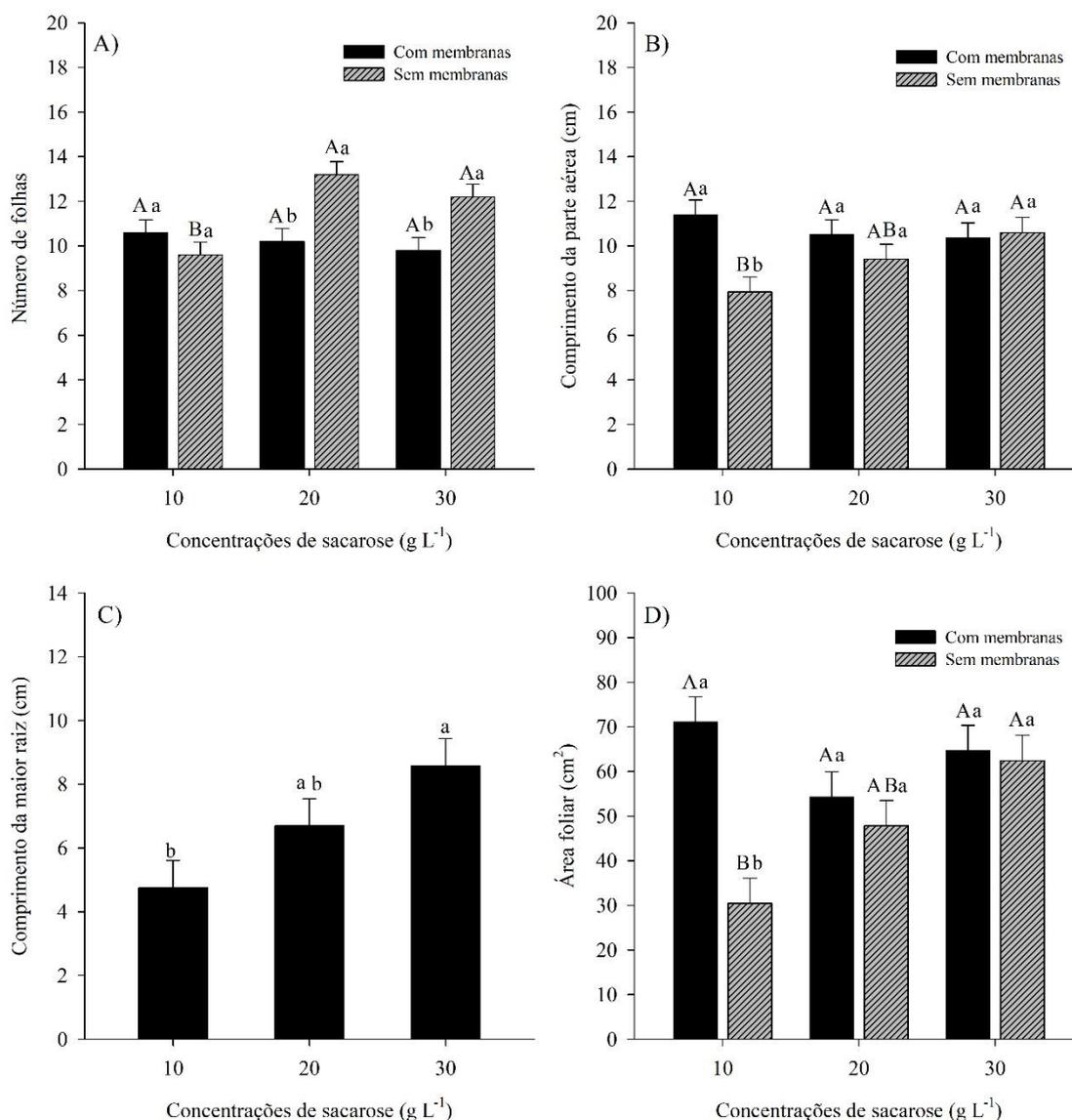
**Figura 1.** Plantas de *Ananas comusus* cv. Pérola aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas aos diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. (A) com membranas e 10 g L<sup>-1</sup>; (B) sem membranas e 10 g L<sup>-1</sup>; (C) com membranas e 20 g L<sup>-1</sup>; (D) sem membranas e 20 g L<sup>-1</sup>; (E) com membranas e 30 g L<sup>-1</sup>; (F) sem membranas e 30 g L<sup>-1</sup>. Barras = 1cm.

O número de folhas foi influenciado pelo tipo de vedação e pela concentração de sacarose, e houve uma interação significativa entre estes fatores. Nas plantas de abacaxi *in vitro*, os meios de culturas com 20 e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose nos frascos sem membranas proporcionaram maiores números de folhas (13,2 e 12,2 respectivamente) (Figura 2A). As plantas cultivadas com sacarose com concentração de 20g L<sup>-1</sup> obtiveram maior número de

folhas, e houve redução no valor desta variável nas plantas do tratamento com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose ao meio de cultura.

Para comprimento da parte aérea, as plantas mantidas em meio de cultura com adição de 10g L<sup>-1</sup> de sacarose e em frascos com membranas permeáveis a gases, mostraram diferenças significativas em relação ao frasco sem membranas, obtendo maior média de CPA com 11,38 cm e as plantas cultivadas em frascos sem membranas permeáveis a gases e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose foram superiores em relação as plantas cultivadas com 10g L<sup>-1</sup> e sem as membranas, diferindo estatisticamente (Figura 2B). Para o comprimento da maior raiz apenas a sacarose apresentou significância, no qual houve aumento à medida que houve incremento na concentração de sacarose, ou seja, com adição de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose (8,58 cm) (Figura 2C).

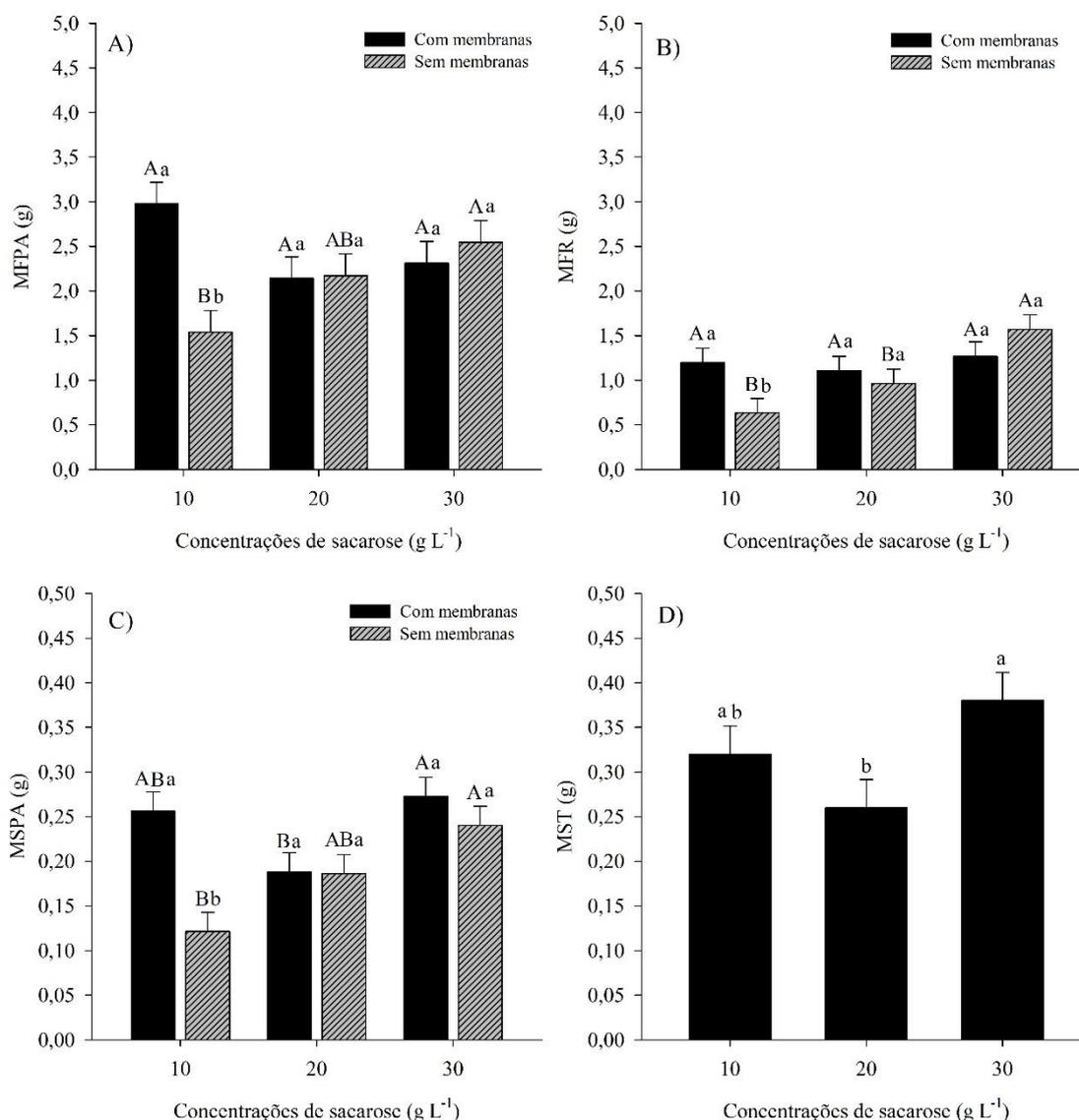
Para área foliar, houve diferença significativa para a concentração de 10g L<sup>-1</sup> de sacarose, no qual o uso de membranas permeáveis a gases beneficiou o aumento da área foliar (71,09 cm<sup>2</sup>), e as plantas cultivadas sem as membranas e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose (62,48 cm<sup>2</sup>) foram superiores as plantas cultivadas em 10g L<sup>-1</sup> de sacarose e sem as membranas (30,47 cm<sup>2</sup>) (Figura 2D).



**Figura 2.** Número de folhas (A), comprimento da parte aérea (B), comprimento da maior raiz (C) e área foliar (D) de plantas de *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Para variável comprimento da maior raiz, médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tanto para MFPA e MFR, o tipo de vedação e a concentração de sacarose influenciaram significativamente no acúmulo de biomassa *in vitro* (Figura 3A e B). Apenas as plantas cultivadas nos frascos sem membranas e 10g L<sup>-1</sup> de sacarose diferiram significativamente, com valores inferiores quando comparados aos demais tratamentos. Para massa fresca da parte aérea, o maior incremento desta variável foi obtido em frasco com

membranas e com 10g L<sup>-1</sup> de sacarose (2,98g). Para a MFR o maior incremento desta biomassa foi encontrado em frasco sem membranas e com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose (1,57g). As plantas mantidas no frasco sem membranas foram mais responsivas ao incremento na concentração de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultivo (Figura 3B).

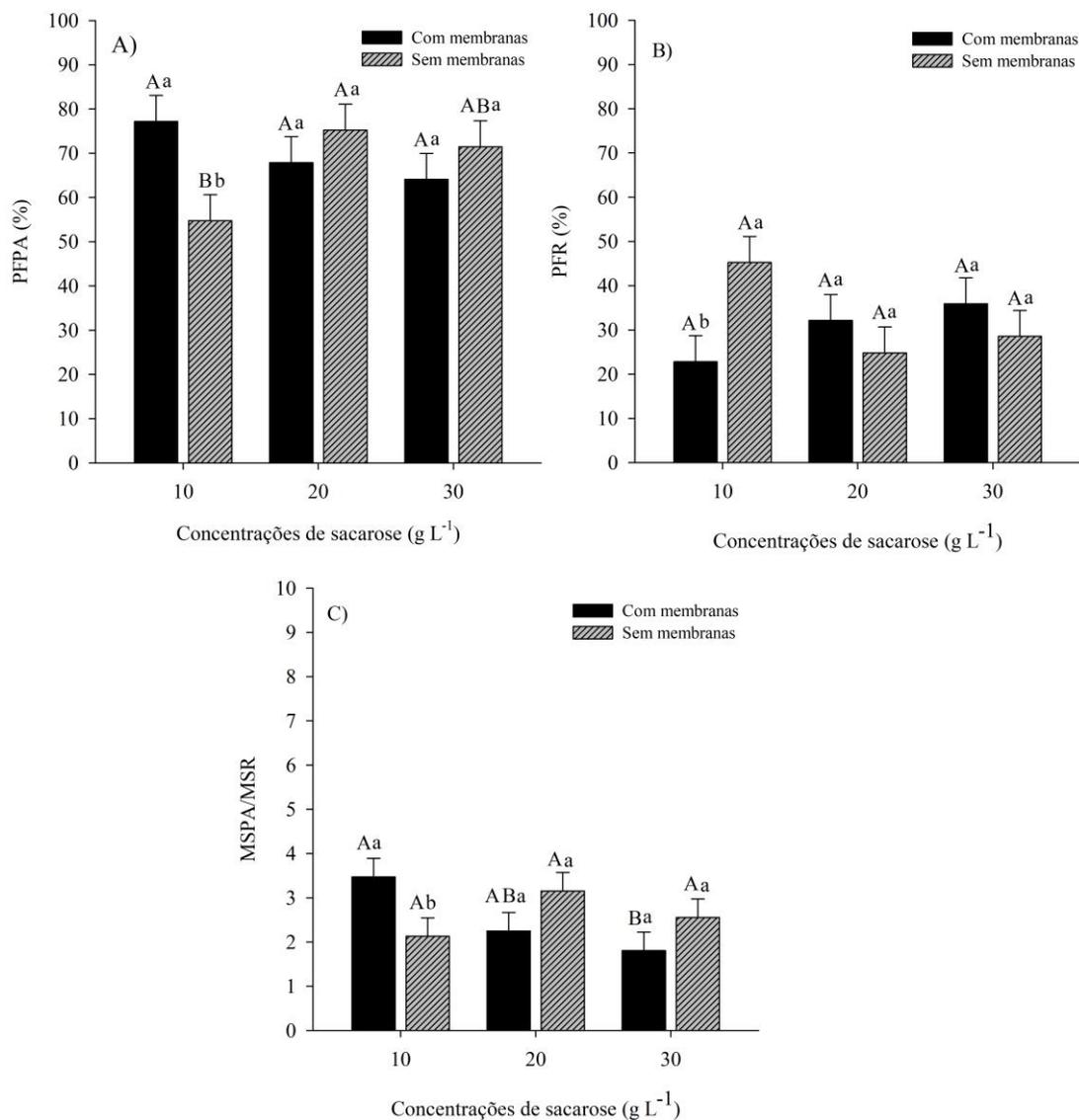


**Figura 3.** (A) Massa fresca da parte aérea (MFPA, g), (B) massa fresca radicular (MFR, g), (C) massa seca da parte aérea (MSPA, g) e (D) massa seca total (MST, g) de plantas de *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para variável MST, médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para o uso de membranas, o uso de  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose ao meio de cultura incrementou em MSPA ao comparar com plantas mantidas sob  $20\text{g L}^{-1}$  ( $0,27\text{g}$  e  $0,19\text{g}$  respectivamente). Nos frascos sem membranas, a concentração  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose foi associada positivamente com o incremento de biomassa seca apresentando diferença significativa das plantas cultivadas com  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose ( $0,23\text{g}$  e  $0,11\text{g}$ ) (Figura 3C).

Para a MST, o tipo de vedação não influenciou o acúmulo de biomassa, e apenas os tratamentos com sacarose tiveram diferenças significativas. A maior concentração de sacarose ( $30\text{g L}^{-1}$ ) proporcionou maior acúmulo de biomassa ( $0,38\text{g}$ ), contudo a concentração de  $10\text{g L}^{-1}$  foram significativamente semelhantes e apenas as plantas do tratamento de  $20\text{g L}^{-1}$  de concentração de sacarose apresentaram o menor acúmulo de biomassa ( $0,26\text{g}$ ) (Figura 3D).

O tratamento de  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose e frasco com membranas proporcionou maior alocação de fotoassimilados para a parte aérea, do que o tratamento do frasco sem membranas contendo esta mesma concentração de sacarose ( $77,17\%$  e  $54,75\%$ , respectivamente), e as plantas mantidas em  $20\text{g L}^{-1}$  de sacarose e frasco sem membranas foram superiores as plantas mantidas sob  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose e sem membranas (Figura 4A). A maior quantidade de fotoassimilados na porção radicular, foram observados nas plantas cultivadas na concentração de sacarose de  $10\text{g L}^{-1}$  e em frascos sem membranas ( $45,25\%$ ) (Figura 4B).



**Figura 4.** (A) Partição de fotoassimilados para parte aérea (PFPA, %), e (B) raiz (PFR, %), (C) relação massa seca da parte aérea/ massa seca radicular (MSPA/MSR) de plantas *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

O valor da relação MSPA/MSR das plantas cultivadas na concentração de sacarose 10g L<sup>-1</sup> e frascos com membranas (3,5) foi maior em comparação às plantas cultivadas nos frascos sem membranas (2,1) (Figura 4C). Ainda foi possível observar que, com o incremento

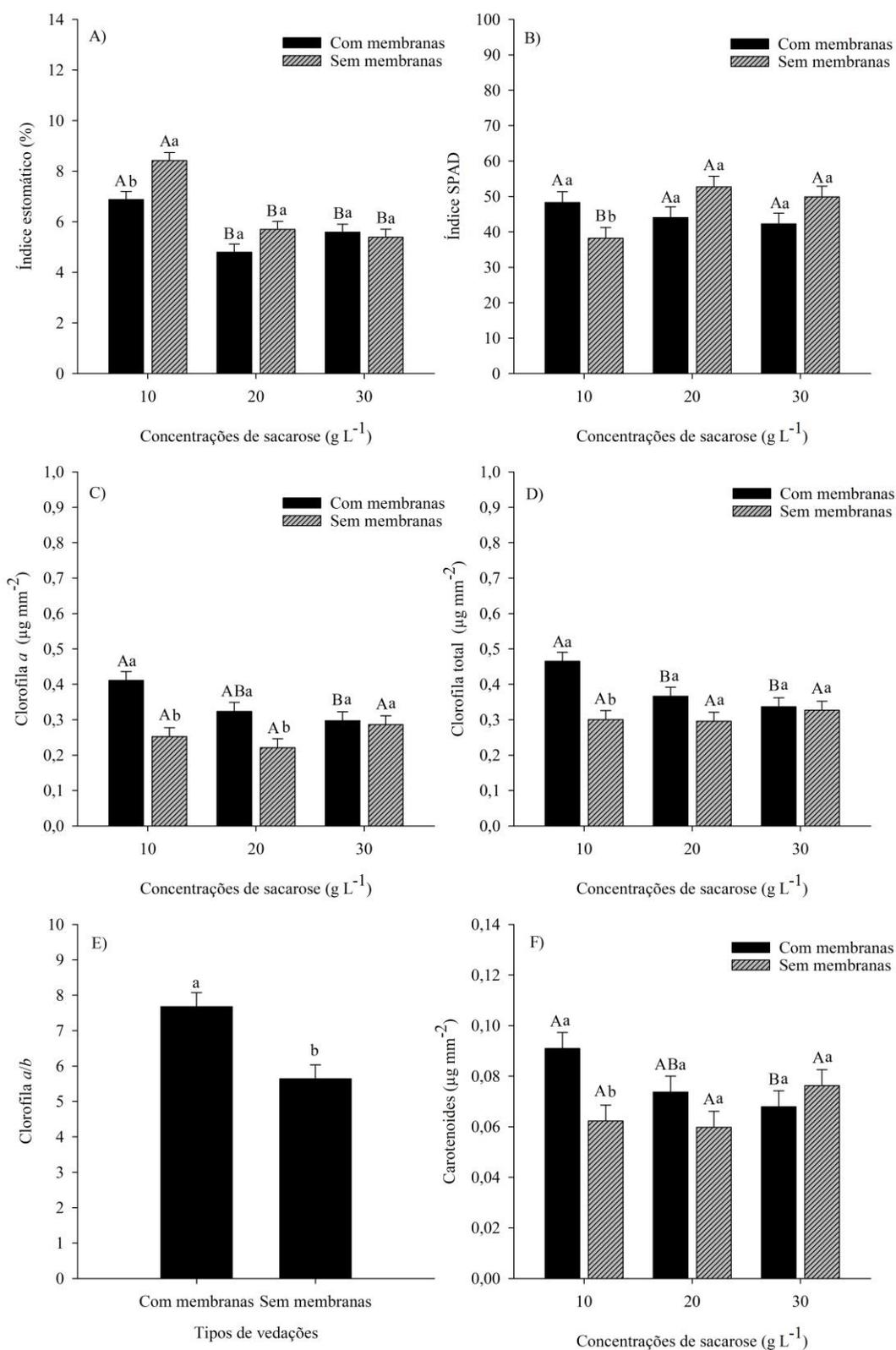
da concentração de sacarose no meio de cultivo, nos frascos com membranas, houve um decréscimo no valor desta relação MSPA/MSR.

Independente do ambiente de cultivo, as folhas do abacaxizeiro são consideradas hipoestomáticas, ou seja, neste tipo de folha, os estômatos estão localizados na face abaxial da folha, e estas estruturas se localizam em faixas paralelas por toda extensão abaxial (BARBOZA et al., 2006). Este fato foi observado neste estudo, por isso o índice estomático (IE) foi calculado apenas na face abaxial das folhas do abacaxizeiro cv. Pérola. Assim, foi possível observar que o IE, apresentou diferença significativa apenas nas plantas do tratamento com concentração  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose, no frasco sem membranas. As médias de IE nas plantas do tratamento com frasco sem membranas foi de 8,4% e o valor de IE nas plantas do tratamento com frasco com membranas foi de 6,9% (Figura 5A).

O Índice SPAD reflete a intensidade de verde das folhas, que podem ser relacionados com a quantidade de clorofila presente nestes órgãos (TORRES-NETTO et al., 2002; BARBOSA, 2016). Apenas nas plantas do tratamento com concentração de  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose foi observada diferença significativa. As plantas cultivadas no frasco com membranas tiveram maior valor do índice SPAD, quando comparadas às plantas mantidas em frascos sem membranas (48,3 e 38,2, respectivamente) (Figura 5B).

Para a variável clorofila *a* plantas mantidas em frascos com membranas, apresentaram diferenças significativas nas concentrações de 10 e  $20\text{g L}^{-1}$  ( $0,4$  e  $0,3\ \mu\text{g mm}^{-2}$ , respectivamente) (Figura 5C). Apenas o tratamento de concentração de  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose apresentou diferença significativa na clorofila total (Figura 5D). As plantas cultivadas com membranas e  $10\text{g L}^{-1}$  de sacarose apresentaram diferenças significativas em relação as plantas cultivadas sem as membranas ( $0,46$  e  $0,25\ \mu\text{g mm}^{-2}$ , respectivamente). Com a redução na concentração de sacarose no meio de cultivo, em frasco com membranas, as plantas incrementaram a concentração de clorofila total e clorofila *a*.

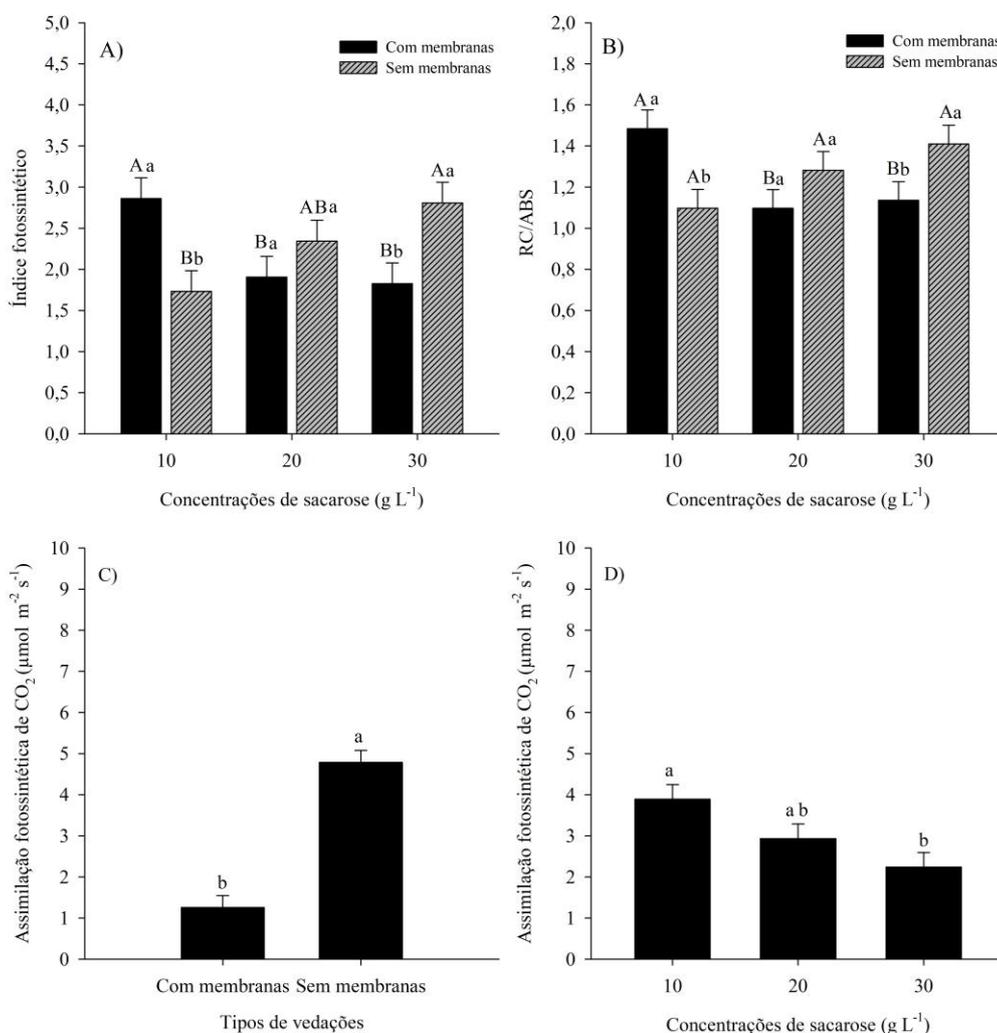
Para relação clorofila *a/b*, as plantas cultivadas nos frascos com membranas apresentaram valores superiores ao se comparar com plantas mantidas em frascos sem membranas (7,7 e 5,6, respectivamente) (Figura 5E). O teor de carotenoides teve diferença significativa apenas nos tratamentos com concentração de sacarose de  $10\text{g L}^{-1}$ , em que as plantas nos frascos com membranas obtiveram maiores teores deste pigmento fotossintético ( $0,09\ \mu\text{g mm}^{-2}$ ) (Figura 5F).



**Figura 5.** Índice estomático (A), índice SPAD (B), clorofila *a* (C), clorofila total (D), clorofila *a/b* e carotenóides (E) de plantas de *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo

teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Neste trabalho, o índice fotossintético (IF) foi diferente significativamente entre os tratamentos com concentrações de 10 e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose em frasco com membranas e frasco sem membranas, com maiores valores ( $\cong 3$ ) para estas duas concentrações, respectivamente (Figura 6A). Nos frascos com membranas a medida que aumentou a concentração de sacarose o IF diminuiu-o, e para as plantas mantidas nos frascos sem membranas o IF aumentou a medida que a concentração de sacarose se elevou.



**Figura 6.** (A) Índice fotossintético (IF), (B) densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS), (C, D) assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) de plantas de *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 90 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de vedações e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada

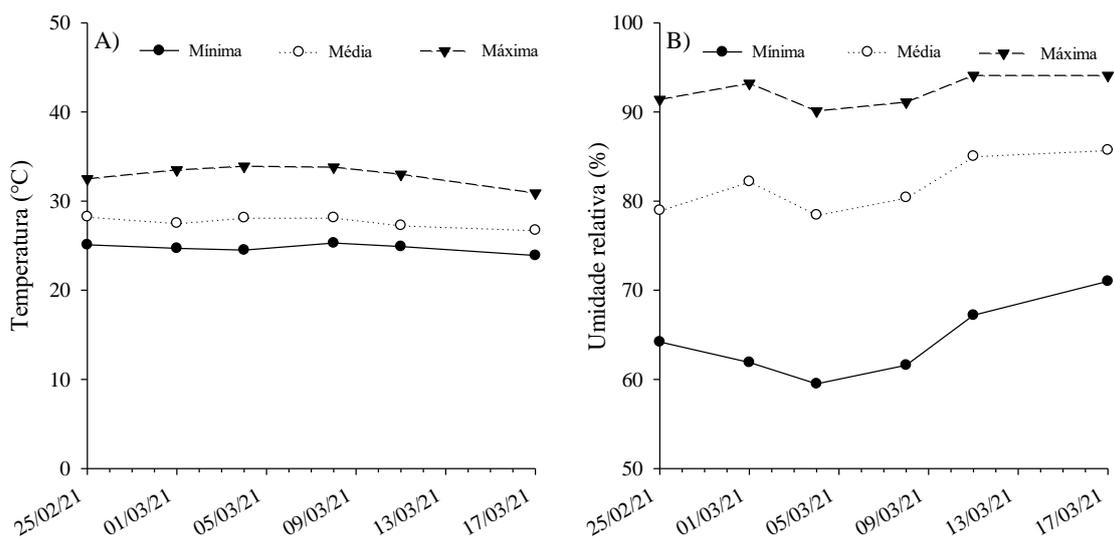
concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Assim como IF, a densidade dos centros de reação ativos por unidade de absorção de fótons (RC/ABS) apresentou diferenças significativas nos tratamentos das concentrações de 10 e 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, para os frascos com membranas e frascos sem membranas, respectivamente (Figura 6B).

Não houve interação significativa entre o tipo de vedação e as concentrações de sacarose para o parâmetro assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>. Entretanto, as concentrações de sacarose e o tipo de vedação afetaram de forma independente esse parâmetro. As plantas cultivadas nos frascos sem membranas apresentaram maiores valores de assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (4,9 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) diferindo significativamente das plantas cultivadas nos frascos com membranas (1,3 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (Figura 6C). Quando se observa a concentração de sacarose, ocorre um decréscimo da assimilação fotossintética à medida que a concentração de sacarose é aumentada no meio de cultivo e se observa uma diferença significativa entre os tratamentos 10 e 30g L<sup>-1</sup> (3,9 e 2,2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 6D). Esse incremento que ocorreu na assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> na concentração de 10g L<sup>-1</sup> é 1,77 vezes superior ao observado na concentração de 30g L<sup>-1</sup> de sacarose.

## **5.2 Experimento II – Potencial fisiológico de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola em condições de aclimatização *ex vitro***

Durante a condução do experimento *ex vitro*, a casa de vegetação apresentou temperatura máxima de 33,9°C, média de 27,6°C e mínima de 24,0°C e umidade relativa máxima de 94,1%, média 81,8 % e mínima de 59,9% (Figura 7A, B).

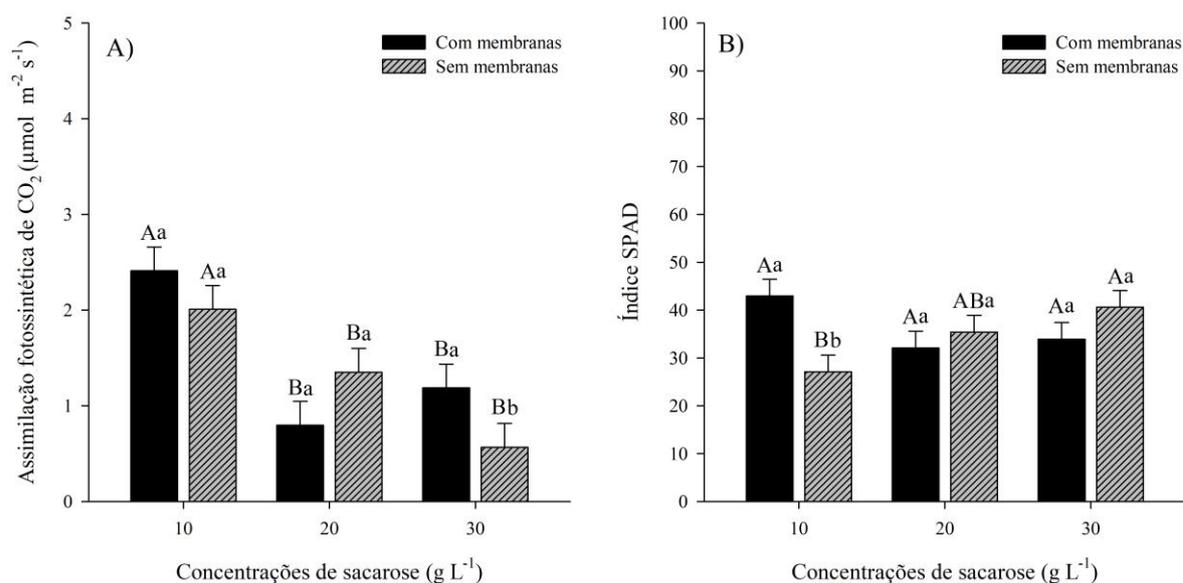


**Figura 7.** Temperatura e umidade relativa máxima, média e mínima dentro da casa de vegetação, durante o processo de aclimatização, 25/02/2021 a 17/03/2021.

Durante a aclimatização em casa de vegetação, foram realizadas avaliações aos 5, 10, 15 de cultivo *ex vitro* e para cada período foi realizada uma análise de variância. Verificou-se que houve interação da assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> com a concentração de sacarose, e em que, apenas para assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> e o índice SPAD houve diferenças significativas aos cinco dias após o início da aclimatização. Aos dez dias após a fase de aclimatização, houve efeito significativo apenas para o fator concentração de sacarose para o parâmetro SPAD ( $p \leq 0,05$ ). Aos 15 dias de aclimatização nenhuma das variáveis avaliadas apresentaram diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) (dados não mostrados).

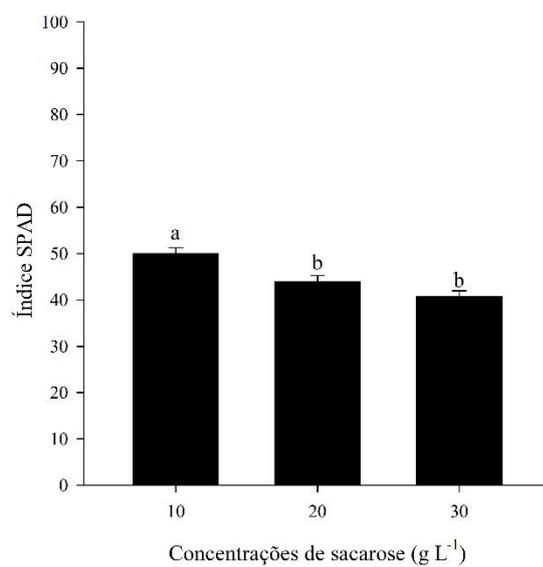
Com relação a porcentagem de sobrevivência das plantas na condição *ex vitro*, todas as plantas de todos os tratamentos retiradas do ambiente *in vitro*, quando levadas para aclimatização, apresentaram taxa de 100% de sobrevivência (dados não mostrados).

Observou-se que as plantas provenientes do cultivo *in vitro* em ambos os frascos de cultivo e com 10g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio tiveram maiores valores de assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> e não diferiram entre frascos com e sem membranas (2,4 e 2,0 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 8A). Com relação aos tipos de frascos, apenas no tratamento de 30g L<sup>-1</sup> de concentração de sacarose houve diferença significativa. Quanto ao Índice SPAD, a adição de 10g L<sup>-1</sup> e com o uso de frascos com membranas permeáveis a gases, produziram plantas apresentando maior valor (42,9) (Figura 8B). O menor Índice SPAD foi encontrado nas plantas submetidas na menor concentração de sacarose e frasco sem membranas (27,4).



**Figura 8.** Assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (A) e Índice SPAD (B) de plantas de *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 05 dias de aclimatização. \*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. Médias dos tipos de vedações (coluna preta ou cinza), seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Aos dez dias de aclimatização *ex vitro*, apenas o fator concentração de sacarose influenciou negativamente no valor da variável Índice SPAD, o que pode mostrar que a menor concentração de sacarose utilizada *in vitro* teve maior índice SPAD (49,9) (Figura 9). Em comparação aos valores de índice SPAD observados aos cinco dias de aclimatização, aos dez dias após o início da aclimatização, os valores deste índice já apresentaram uma elevação. Aos 15 dias nenhuma das variáveis analisadas apresentaram significância (dados não mostrados).



**Figura 9.** Índice SPAD de plantas de *Ananas comosus* cv. Pérola, aos 10 dias de aclimatização. \*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Experimento I – Impacto das concentrações de sacarose e intensidade de luz nos parâmetros de crescimento e fisiológicos de abacaxizeiro cv. Pérola *in vitro*

As plantas de abacaxi responderam positivamente quando ocorreu adição da fonte de carbono (sacarose). Este fato mostra que para o genótipo de abacaxizeiro utilizado neste trabalho, torna-se importante a adição de uma fonte exógena de carbono ao meio de cultura, mesmo quando se permite as trocas gasosas no frasco de cultivo, por meio de membranas. Ainda observou-se que mesmo no ambiente fotoautotrófico, frascos com as membranas permeáveis a gases (na ausência de sacarose, trocas de CO<sub>2</sub> no frasco e com RFA de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a remoção das folhas do explante, no início do estabelecimento das plantas *in vitro*, não permitiu que o explante pudesse construir uma maquinaria fotossintética inicial para o sucesso do crescimento no estabelecimento das plantas no ambiente fotoautotrófico.

Na condição de frasco com as membranas, e com 0% de sacarose, o explante inicial *in vitro* não se mostrou ter reserva para o lançamento de novas folhas com capacidade fotossintética para fornecer fotoassimilados para as folhas iniciais (KRISANTINI, 2018). No ambiente dos frascos sem as membranas permeáveis a gases, o efeito negativo sobre a fotossíntese pode ter sido muito mais intenso, uma vez que os frascos sem trocas gasosas podem limitar em maior intensidade o crescimento do material vegetal, devido à elevação na umidade relativa, e redução da assimilação de CO<sub>2</sub> por limitação do CO<sub>2</sub> nos sítios de carboxilação da Rubisco (KOZAI, 1991, KOZAI et al., 1997, KOZAI, 2010).

Para as variáveis número de folhas e comprimento da parte aérea, com o aumento da concentração de sacarose, o incremento nos valores desta variável somente foi observado nos frascos sem membranas, o que mostra a importância da presença da sacarose no meio de cultivo nos frascos em que não se otimiza as trocas gasosas (DESJARDINS et al., 1995).

Para comprimento da maior raiz, quanto maior a quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultura, independentemente do tipo de vedação, maior comprimento (Figura 2C), demonstrando que a sacarose é crucial para o crescimento radicular (Figura 1A, B, C, D, E e F). Em plantas de *Ficus carica* L, 5% de sacarose no meio de cultivo permitiu maior crescimento radicular (PREMKUMAR et al., 2003; ELAZAB e SHAABAN, 2015).

O uso de membranas permeáveis a gases beneficiou o aumento da área foliar (Figura 2D). Neste sistema, com intensidade de luz de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, com membranas permeáveis a

gases nos frascos de cultivo e com concentração de sacarose de  $10\text{g L}^{-1}$ , houve elevação na área foliar em comparação ao frasco sem membrana (Figura 2D). Saldanha et al. (2012) e Iarema et al. (2012) também trabalharam com frascos com membranas permeáveis a gases em plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*, e em comparação as plantas em frascos sem as membranas, observaram que as plantas cultivadas nos frascos sem membranas tiveram maior área foliar. Contudo, neste presente trabalho com abacaxizeiro ‘Pérola’, mesmo com área foliar maior, nos frascos com membranas, a assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  foi menor do que os valores observados nos frascos sem membranas (Figura 6C e D). Quando uma planta investe mais em área foliar, a espessura do mesofilo, bem como o número de células fotossintéticas por unidade de área podem ser reduzidos (GOBBI et al., 2011), o que poderia justificar a menor assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  por unidade de área e de tempo no nosso trabalho. Esse maior investimento em área foliar nas plantas no frasco com membranas pode estar associado na tentativa da planta em maximizar as trocas associadas a água e  $\text{CO}_2$ . Contudo, tal ação em tentar maximizar a área foliar foi penalizada por meio da redução na densidade estomática neste frasco com membranas, isto é, um número menor poros para a passagem do  $\text{CO}_2$  até o mesofilo foliar (Figura 5A) (SAKODA et al., 2020).

O aumento da MFR em função do aumento da concentração de sacarose foi associado à redução na assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  (Figura 6C e D). A presença da sacarose no meio de cultivo pode inibir o processo fotossintético, devido à redução na atividade da Rubisco (fase bioquímica) (LANGFORD e WAINWRIGHT, 1987; FUENTES et al., 2005) e/ou na concentração de clorofilas (fase fotoquímica) (HAZARIKA, 2006). As plantas cultivadas em frascos com membranas não necessitam de altas concentrações de sacarose para que ocorra um aumento da matéria fresca. No entanto, quando as plantas são cultivadas em frascos sem membranas, a ausência ou baixas concentrações de sacarose diminuem o crescimento da planta. Portanto, na condição *in vitro*, torna-se necessário a adição de sacarose para que ocorra incremento da matéria fresca em abacaxi (MENDES et al., 2015).

O acúmulo de biomassa seca e fresca na parte aérea está mais relacionado ao aumento da assimilação fotossintéticas de  $\text{CO}_2$ , quando esse parâmetro é medido na planta inteira (ZELITCH, 1982) e não apenas em uma área da folha como foi a medição feita no presente trabalho. Este fato pode explicar uma relação inversa, principalmente nos frascos sem membranas, entre a produção de biomassa das plantas de abacaxizeiro e a assimilação fotossintéticas de  $\text{CO}_2$  avaliada em uma folha individual (Figuras 3A - D e 6C - D). Nas plantas do tratamento de sacarose na concentração de  $10\text{g L}^{-1}$ , a área foliar no frasco com

membranas foi praticamente o dobro, quando comparada às plantas mantidas nos frascos sem membranas (Figura 2D). Neste tratamento, a maior área foliar pode ter compensado o menor valor da assimilação por unidade de área (Figura 6C e D).

O maior acúmulo de biomassa vegetal no cultivo *in vitro* está ligado a incorporação de sacarose ao meio de cultura (SCHIMILDT et al., 2014). De fato, a sacarose é uma fonte de carbono que tem como finalidade fornecer energia para o metabolismo vegetal na condição de cultivo convencional *in vitro* (HAZARIKA, 2003). A redução da sacarose em frascos com membranas proporcionou maior alocação de fotoassimilados para a parte aérea (Figura 4A). Tal resultado foi corroborado com a maior área foliar das plantas no tratamento 10g L<sup>-1</sup> de sacarose em frasco com membranas (Figuras 2D).

Respostas semelhantes a estas foram obtidas por Saldanha et al. (2012), o que pode evidenciar que ao facilitar as trocas gasosas nos frascos de cultivo, a alocação de fotoassimilados é direcionada para a parte aérea das plantas crescidas *in vitro*. Estas informações relacionadas sobre a partição de fotoassimilados podem ser caracterizadas também pela variável MSPA/MSR (Figura 4C). O menor valor desta relação nas plantas crescidas em frascos sem membranas foi devido ao elevado incremento na biomassa de raízes com o incremento na concentração de sacarose no meio de cultivo (Figura 4B). Nos frascos com membranas, o efeito do incremento da sacarose sobre a biomassa das raízes foi menos pronunciado (Figura 4B).

Nos tecidos vegetais das plantas no cultivo *in vitro*, a funcionalidade dos estômatos é um processo fisiológico chave, e, segundo Hazarika (2006), em geral, os estômatos são parcialmente funcionais durante o cultivo *in vitro*. Devido à alta umidade relativa dentro dos frascos de cultivo fechados, bem como em reduzida RFA, pode ocorrer alterações na anatomia e na abertura e fechamento dos estômatos. Nesta condição de reduzidas trocas gasosas, o processo de transpiração também pode ser comprometido, devido a reduzida diferença de concentração de vapor de água entre o mesófilo e o ambiente externo a folha (ar saturado de água dentro do frasco de cultivo fechado) (SILVA et al., 2014; ALINIAEIFARD e VAN MEETEREN 2016; ASAYESH et al., 2017). Contudo, num frasco em que se permite as trocas gasosas, a umidade relativa pode ser mais baixa, e essa gradiente de concentração de vapor de água entre a folha e o ambiente do frasco pode ser maior, o que pode ocasionar maior transpiração e maior chegada de nutrientes até a parte aérea da planta (JEONG et al., 1995). No presente trabalho com abacaxizeiro, mesmo com menor índice estomático, a transpiração pode ter sido maior nas plantas cultivadas nos frascos com membranas e com

10g L<sup>-1</sup> de sacarose, como relatado por Jeong et al. (1995), o que poderia explicar a maior área foliar, e maior produção de biomassa na parte aérea neste tratamento (Figuras 2D e 3A, B, C e D).

Decchetti (2004) relata que a presença de sacarose no meio de cultura tem sido considerada a principal causa da redução dos teores de clorofila, e, conseqüentemente, pode reduzir a assimilação fotossintética do CO<sub>2</sub>, conforme foi observado neste presente trabalho com abacaxizeiro (Figura 6C, D). Contudo, nas plantas mantidas em frascos sem membranas, a concentração de sacarose no meio parece não ter sido a causa da redução na assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (Figuras 6A - D).

As plantas crescidas na concentração de 10g L<sup>-1</sup> de sacarose e com as membranas permeáveis a gases apresentaram maior concentração de carotenoides. Os carotenoides são de extrema importância para as plantas, pois são responsáveis pela captura da RFA na região do azul (fótons mais energéticos) e auxiliam no processo de fotoproteção das moléculas de clorofila. Desta maneira, estes pigmentos impedem o dano fotoinibitório do aparato fotossintético (MERZLYAK e SOLOVCHENKO, 2002). Estes pigmentos possuem a função de proteger as moléculas de clorofilas contra a ação do excesso de radiação luminosa. Este pigmento apresentou maior incremento na concentração de 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose e com membranas, os efeitos foram semelhantes aos efeitos sobre as moléculas de clorofila. As maiores concentrações de clorofila necessitam de maiores concentrações de carotenoides para protegê-las (TORRES-NETTO, 2005).

O incremento na concentração de sacarose no meio de cultivo foi mais benéfico nas plantas mantidas em frascos sem membranas do que nos frascos com membranas, o que mostra que o cultivo fotomixotrófico foi mais sensível ao incremento da sacarose no meio de cultivo. De fato, neste ambiente fotomixotrófico (presença de sacarose no meio de cultivo, RFA de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e trocas de CO<sub>2</sub> no frasco de cultivo por meio da membrana), a sacarose no meio pode reduzir a capacidade fotoautotrófica (Figura 6C e D) (JEONG et al., 1995).

O índice fotossintético (IF) é uma variável multi paramétrica e é formada por três componentes relacionados a eficiência fotoquímica do fotossistema II e do fotossistema I. Um componente é relacionado com a concentração dos centros de reação ativos, em relação à absorção de fótons (RC/ABS), o outro componente está relacionado a eficiência na captura do fóton pelos centros de reação (F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub>) e terceiro componente está relacionado a eficiência no transporte de elétrons, após quinona A ter sido reduzida (ET/TR-ET) (STRASSER et al.,

2000). De acordo com Ripley et al. (2004), o IF é capaz de identificar alterações precoces no aparato fotossintético das plantas, uma vez que, quando comparada a variável  $F_v/F_m$ , o IF tem sido utilizado como uma variável mais precisa e sensível. Ainda, o IF é uma expressão multivariada do FSII, onde combina a absorção de energia luminosa, e a excitação de energia e conversão de energia de excitação para transporte de elétrons (STRAUSS et al., 2006). Segundo estes autores, pode ser considerada uma variável mais sensível para avaliar a atividade do fotossistema II.

A concentração de sacarose no meio de cultivo contribuiu para a elevação nos valores das variáveis IF e RC/ABS nas plantas mantidas nos frascos sem membranas (ambiente mixotrófico) (Figura 6A -B). Ao se fazer uma análise entre o índice fotossintético (Figura 6A) e a assimilação fotossintética de  $CO_2$  (Figura 6C e D), principalmente para as plantas crescidas em frascos sem membranas, não se verificou uma associação entre essas duas variáveis, o que pode mostrar um efeito negativo da sacarose na assimilação fotossintética do  $CO_2$  em nível mais bioquímico do que fotoquímico (STRASSER et al., 2000).

O abacaxizeiro pode ter dois tipos de metabolismo, o metabolismo do tipo  $C_3$  e o metabolismo do tipo ácido das crassuláceas (CAM). Quando as plantas desta espécie crescem em um ambiente com menor RFA, temperatura e boa disponibilidade hídrica podem apresentar o metabolismo do tipo  $C_3$ . Entretanto, quando as plantas são mantidas sob condições adversas como em altas temperaturas, reduzida umidade relativa, elevadas intensidades da RFA e limitação hídrica do solo, o que torna a absorção de  $CO_2$  desfavorável durante o dia, estas plantas podem apresentar o metabolismo do tipo CAM (TING, 1985; BORLAND et al., 1998; TAYBI; CUSHMAN e BORLAND, 2002; LÜTTGE, 2004). Assim, neste trabalho, o cultivo durante 90 dias nos frascos de cultivo, o aparato fotossintético das plantas pode ter se desenvolvido em condições dos fatores micrometeorológicos considerados adequados na sala de crescimento, o que levou as plantas a terem o metabolismo do tipo  $C_3$ . Tal metabolismo se caracterizou pela resposta da assimilação fotossintética de  $CO_2$  na RFA utilizada durante as avaliações.

Como foi relatado, em ambos os frascos de cultivo, houve redução da assimilação fotossintética de  $CO_2$  com o incremento na concentração de sacarose, o que pode evidenciar os efeitos negativos da concentração de sacarose no meio de cultivo sobre o metabolismo fotossintético do carbono (DECETTI, 2004). Estes resultados corroboram com os obtidos por Schmildt et al. (2014), que, ao cultivar plantas de *Carica papaya in vitro*, observaram o mesmo efeito negativo da sacarose sobre o metabolismo fotossintético do carbono.

Neste experimento com o abacaxi ‘Pérola’, tanto no frasco com membranas e no frasco sem membranas, observou-se que não foi possível o cultivo fotoautotrófico, uma vez que o corte realizado na parte aérea não teve reservas para formar uma área fotossintética inicial. Com relação ao cultivo fotomixotrófico, este se mostrou bastante eficiente, quando comparado ao cultivo considerado mixotrófico (convencional). A redução da sacarose, em combinação com o frasco com membranas proporcionou maior comprimento de parte aérea, área foliar, massa fresca e seca da parte aérea, partição de fotoassimilados para parte aérea, índice fotossintético, densidade dos centros de reação do fotossistema II, clorofila *a*, total e carotenoides. Futuros trabalhos poderão ser realizados utilizando o meio de cultivo na ausência de sacarose, no frasco com membranas, mas mantendo o explante com uma quantidade inicial de folhas para permitir uma assimilação fotossintética do carbono e manter o explante em crescimento.

## **6.2 Experimento II – Potencial fisiológico de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola em condições de aclimatização *ex vitro***

Em ambos os frascos de cultivo, o incremento da sacarose no ambiente *in vitro* contribuiu para a redução na assimilação fotossintético de CO<sub>2</sub> na fase inicial do estabelecimento das plantas na condição *ex vitro*.

Aos dez dias após a fase de aclimatização (independente do frasco de cultivo), e aos cinco dias após a de aclimatização (no frasco com membranas), os valores de índice SPAD medidos durante a aclimatização tiveram reduções nas concentrações crescentes de sacarose *in vitro*. Esse fato pode demonstrar que, nestes dois tratamentos, quando as plantas são transferidas para casa de vegetação, pode ocorrer redução na concentração de clorofilas totais, o que pode afetar o crescimento das plantas na fase de aclimatização (TOYODA et al., 2010). ZHANG et al. (2009) relatam a necessidade da aclimatização adequada (ótimo controle das variáveis microclimatológicas), das mudas provenientes do cultivo *in vitro* tradicional (frasco fechado, elevada umidade relativa, alta concentração e sacarose no meio de cultivo, e reduzida RFA neste ambiente *in vitro*), pois estas mudas são sensíveis e tenras, fotossinteticamente inativas, e com estômatos pouco funcionais.

Diferente da redução observada aos cinco dias de aclimatização *ex vitro* na variável Índice SPAD, aos dez dias de ocorreu uma elevação desta variável. Provavelmente, nesta fase *ex vitro*, as plantas de abacaxizeiro iniciaram o processo de adaptação ao novo ambiente.

Ao que se observou neste experimento com abacaxizeiro, as concentrações menores de sacarose no cultivo *in vitro* permitiram as plantas elevar a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> na fase inicial *ex vitro*, com potenciais para elevar o crescimento do abacaxizeiro cv. Pérola. De fato, Kozai et al. (1991) relataram que o incremento de fontes externas de carboidrato ao meio de cultivo, não permitiu que as plantas desenvolvessem o metabolismo do tipo fotoautotrófico, e assim não houve efeito positivo no crescimento, bem como houve mortalidade das plantas durante a aclimatização. Já Desjardins (1995) explana que a remoção total do carboidrato do meio de cultura para algumas espécies pode ser prejudicial ao crescimento, o que pode dificultar na fase de aclimatização. Ainda, estes autores citam que durante o cultivo *in vitro*, as plantas podem perder parcialmente o fotoautotrofismo, o que necessitaria assim de uma fonte externa de carbono.

Neste presente experimento, nos períodos avaliadas (5 e 10 dias após o início da aclimatização *ex vitro*) e no tratamento frasco com membranas, apesar de ter havido redução na concentração das clorofilas totais, tal redução não comprometeu a sobrevivência das mudas. Futuros trabalhos deverão ser feitos nesta fase, acompanhando algumas características de crescimento como altura de plantas, diâmetro da copa, número de folhas, e matéria seca de parte aérea e raízes para caracterizar melhor os tratamentos aplicados na condição *in vitro*.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais deste trabalho, com a total eliminação da sacarose do meio de cultivo *in vitro*, mesmo utilizando as membranas, o abacaxizeiro (*Ananas comosus*) cv. Pérola não produziu biomassa.

Quando comparadas ao ambiente de cultivo convencional (frascos sem membranas e elevada concentração de sacarose), as plantas de abacaxi em estudo cultivadas em frascos com membranas permeáveis a gases, e em baixas concentrações de sacarose apresentaram maior crescimento e maior eficiência fotoquímica.

Para o cultivo fotomixotrófico do abacaxizeiro *in vitro*, é indicado o uso das membranas e concentração de sacarose de 10g L<sup>-1</sup>.

## REFERÊNCIAS

- ADELBERG, J., FUJIWARA, K., KIRDMANEE, C., & KOZAI, T. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, n. 2, p. 95-104, 1999
- AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4. 2007
- ALINIAEIFARD, S.; VAN MEETEREN, U. Stomatal characteristics and desiccation response of leaves of cut chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) flowers grown at high air humidity. **Scientia Horticulturae**, v. 205, p. 84–89. 2016.
- ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K., SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 93-101, 2012.
- ARAÚJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'smooth cayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). **Ceres**, v. 55, n. 5, 2008.
- ARIGITA L.; CANÃL J.; TAMÉS R. S.; GONZÁLEZ A. CO<sub>2</sub>-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cell Dev Biol-Plant** v. 46, p. 312–322, 2010.
- ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, p.166-173. 2002.
- ASAYESH, Z. M.; VAHDATI, K.; ALINIAEIFARD, S.; ASKARI, N. Enhancement of *ex vitro* acclimation of walnut plantlets through modification of stomatal characteristics *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 220, p. 114–121. 2017.
- BADR A.; ANGERS P.; DESJARDINS Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p. 13–24, 2011.
- BAKER, N.R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1607-1621. 2004.
- BARBOSA, R. R. do N. **Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. 2016.

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** [online]. v. 41, n. 2, p. 185-194. 2006.

BATISTA, D. S.; CASTRO, K. M.; SILVA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SALES, T. A.; SOARES, L. I.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, M. O.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cell Dev Biol Plant**. v. 52, p. 276-282. 2016.

BATISTA, D. S.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; SALDANHA, C. W.; OTONI, W. C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**. v. 47, n. 3. 2017.

BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 173-187. 1992.

BOLHÀR-NORDENKAMPF H. R.; ÖQUIST G. O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhàr-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP (eds), Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual, Chapman & Hall, London, England. pp.193-206. 1993.

BOMFIM, G.V., AZEVEDO, B.M., VIANA, T.V.A., FURLAN, R.A., CARVALHO, A.C.P.P. Aclimatização *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes frequências de irrigação. **IRRIGA**, v. 16, n. 1, p. 104–114, 2011.

BORLAND, A.; TÉCSI, L.; LEEGOOD, R.; WALKER, R. P. Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. **Planta**. v. 205, p. 342–351. 1998.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. D.; RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. C.; VALENTE, T. C. T. Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 863-868. 2011.

CABRAL, J.R.S., SOUZA, A.S., MATOS, A.P., Caldas, R.C. Efeito da autofecundação em cultivares de abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1.p. 184-185. 2003.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.A.B.; LEMOS, E.E.P.; SOUZA, F.V.D.; PETER, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture e Micropropagation**. v. 7, n. 1, p. 30-60. 2011.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo* **Australian Journal of Crop Science**, v.4, p.750-756. 2010.

CHRISTEN, D.; SCHÖNMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R. J.; DÉFAGO, G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress 112 responses to esca

disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 504–514. 2007.

CORRÊA, J. P. O., VITAL, C. E., PINHEIRO, M. V. M., BATISTA, D. S., AZEVEDO, J. F. L., SALDANHA, C. W., OTONI, W. C. *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (PCTOC), v. 121, n. 2, p. 289–300. 2015.

COUTO, T. R.; SILVA, J. R.; MORAES, C. R. D. O.; RIBEIRO, M. S.; NETTO, A. T.; CARVALHO, V. S.; CAMPOSTRINI, E. Photosynthetic metabolism and growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) cultivated *ex vitro*. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, n. 3, p. 333-339, 2016.

COUTO, T. R.; SILVA, J. R.; TORRES NETTO, A.; CARVALHO, V. S.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 459-466. 2014.

CRESPO, L. E. C. **Cultivo in vitro de cana-de-açúcar (saccharum spp.) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas: um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas**. 2007. 49 Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Campos dos Goytacazes. 2007.

CRESTANI, M. BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, F. I. F. D.; OLIVEIRA, A. C. D. Das Américas para o mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1473–1483. 2010.

CUNHA, G. A. P. **Equipe técnica de abacaxi comemora 30 anos de atividades e realizações**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007.

CUNHA, G.A.P. Aspectos agroclimáticos. In: Cunha, G.A.P., Cabral, J.R.S., Souza, L.F.S. (eds) O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília, p.53-66. 1999.

CUTTER, E. G. Plant anatomy: cells and tissues. Part I. London: William Clowes and Sons. 1978. 315p.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação Fotoautotrófica de Mirtilo, Cv. Georgiagem. Anais do III Simpósio Nacional do Morango, II Encontro Sobre Pequenas Frutas e frutas nativas do Mercosul, Pelotas. p.71-78. 2008.

DECSETTI, S.F.C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras.

DESJARDINS Y.; HDIDER C.; DE RIEK J. Carbon nutrition *in vitro* — regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L. (eds) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Springer, Dordrecht. 1995.

DESJARDINS, Y. Photosynthesis – On the factors regulating CO<sub>2</sub> assimilation in micropropagation systems. **Acta Horticulturae**, v. 393. p. 45-61. 1995.

ELAZAB, D., & SHAABAN, M. (2016). The Impact of Sucrose Concentration on Root Growth and Development in Fig (*Ficus carica* L.) *In Vitro* \*. **Assiut J. Agric. Sci.**, v. 46, n. 6. p. 67-75.2015

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965. 2005.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 10/06/2021.

FARIA, R.T., ASSIS, A.M., UNEMOTO, L.K., CARVALHO, J.F.R.P. Aclimatização. In: FARIA, R.T., ASSIS, A.M., UNEMOTO, L.K., CARVALHO, J.F.R.P. (orgs.) Produção de Orquídeas em Laboratório, Londrina: Mecenaz, p. 95-102. 2012.

FARIAS, M.F., SAAD, J.C.C. Crescimento e qualidade de crisântemo cultivado em vaso sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 740-742. 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, L. S., GENEROSO, A. L., CARVALHO, V. S., DE ASSIS FIGUEIREDO, F. A. M. M., WALTER, R., FERRAZ, T. M., CAMPOSTRINI, E. Better light spectral quality and thermal amplitude inside the greenhouse stimulate growth and improve acclimatization of *in vitro*-grown *Cattleya warneri* T. Moore. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. 2021.

FERREIRA, L. S; **Cultivo *in vitro* de orquídeas em dois ambientes (sala de crescimento e casa de vegetação): Crescimento e capacidade fotossintética**. 2014. 80. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 2014.

FORTINI, E. A., BATISTA, D. S., MAMEDES-RODRIGUES, T. C., FELIPE, S. H. S., CORREIA, L. N. F., CHAGAS, K., OTONI, W. C. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 3, p. 593–605. 2021.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARÍA, J.M. Low exogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. **Acta Horticulturae**, v. 748. p. 151-156. 2007.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J. M. Exogenous Sucrose Can Decrease *In vitro* Photosynthesis but Improve Field Survival and Growth of Coconut (*Cocos nucifera* L.) *In vitro* Plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**. v. 41, n. 1, p. 69-76. 2005

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture: the components of culture media. 2nd Great Britain: Exegetics, 1993. 574p.

GIRARDI, C. G.; PESCADOR, R. Aclimatização de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 12, p. 62-72, 2010.

GOBBI, K. F.; GARCIA, R.; VENTRELLA, M. C.; NETO, A. F. G.; ROCHA, G. C. Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capim-braquiária e do amendoim-forrageiro submetidos a sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1436-1444, 2011.

GONÇALVES, L. A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, A.T.; VENDRAME, W.A. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 243-250. 2008.

GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, C. E.; GUIMARAES, D. G.; BERNARDES, R. S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amaz.**, v. 40, n. 1, p. 89-98. 2010.

GRIS T.; PINHEIRO, M. V. M.; THIESEN, L. A.; WEBLER, A. R.; JUNGES, D. L.; HOLZ, E.; NAIBO, I.; BATISTA, D. S.; OTONI, W. C.; SCHIMIDT, D. Light quality and sealing type affect *in vitro* growth and development of *Capsicum frutescens* cultivars. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 93, n. 3, p. 15. 2021.

GURGEL, G. B. **Aspectos fisiológicos de plantas de abacaxi (L. Merrill) sob cultivo hidropônico e convencional associado ao estudo molecular do florescimento**. 2017. 92. Dissertação (mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, 2017.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten. Pflanzenzellen. Sitzungsberichte der Kaiserlichen. Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwiss. Kl, Abt I, p. 69-92. 1902.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2. p. 105–120. 2006.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, p. 1704-1712. 2003.

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 110, n. 2, p. 227-238, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal, 2019. Acesso em 12/06/2021.

INOUE, M. T.; GRAÇA, M. E. C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 36, p.71-77, 1998.

- JACKSON, M.B.; ABBOTT, A.J.; BELCHER, A.R.; HALL, K.C.; BUTLER, R.; CAMERON, J. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explants development. **Annals of Botany**, v. 67, p. 229-237. 1991.
- JEONG, B. R.; FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. In: Janick, J. (Ed.), **Horticultural Reviews**, Wiley, New York, 1995.
- KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; KITAYA, Y. Modelling, measurement and control in plant tissue culture. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 63 - 73. 1996.
- KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P. C., Zimmerman, T. H. Micropropagation technology and application. **Kluwer Academic Publishers**, p. 447 – 469. 1991.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**. v. 10, p. 188–204. 2010.
- KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 107-115. 1991.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 51, n. 49. 1997.
- KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of Wood and tropical plants. **Micropropagation of Wood trees and fruits**. p. 757-781. 2003.
- KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED S. M. A. Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. **Dordrecht Springer & Business Media**, 2005. 315p.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 313-349. 1991.
- KRISANTINI, Ni Made Armini Wiendi. Photoautotrophic System: A Review and Potential Applications in Plant Micro Propagation. **Journal of Tropical Crop Science** v. 5 n. 2. 2018.
- KUBOTA, C., KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, v. 27, p. 1312-1314. 1992.
- LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, M. "Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*". **Annals of Botany**, v. 60, n. 6. p. 633–640. 1987.
- LIMA, A. B. **Qualidade e conservação pós-colheita de abacaxis "Pérola" e "MD2" sob manejo orgânico e convencional na agricultura familiar**. 2011. 211. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, 2011.

LUTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of Botany**, Inglaterra, v. 93, n. 6, p. 629-652. 2004.

MAGALHÃES, A.C.N., da SILVA, W.J. Determinantes Genético- Fisiológicos da Produtividade do Milho. In: Peterniani, E. (ed.) **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. 2 ed. Piracicaba/ESALQ: Fundação Cargill, p. 349-375. 1980.

MAXWELL, K., JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **J. Exp. Bot.**, v. 51, p. 659-668. 2000.

MENDES, P., ANTUNES, F., ARAUJO, W., CHAGAS, E., & COUCEIRO. Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@mbiente On-Line**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 202-207, 2015.

MERZLYAK, M. N.; SOLOVCHENKO, A. E. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. **Plant Science**, v. 163, p. 881-888, 2002.

MEYER, S., GENTY, B. Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO<sub>2</sub> diffusion. **Planta**, v. 210, n.1, p. 126-131. 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15. P. 473-47. 1962.

NERY, L. A., BATISTA, D. S., ROCHA, D. I., FELIPE, S. H. S., QUEIROZ, M. DA C., SILVA, P. O., OTONI, W. C. Leaf development and anatomy of *in vitro*-grown *Polygala paniculata* L. are affected by light quality, gelling agents, and sucrose. **Vegetos**, v. 34. n. 1, p. 19–28. 2021.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439- 453. 2013.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y. de; LOPES, V. R., BONA, C. M. de; ALCANTARA, G. B. de; BIASI, L. A. Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 2, p. 53-58, 2016.

PARK, S.Y., MOON, H.K., MURTHY, H.N., KIM, Y.W. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 3, p. 559-562, 2011.

PELIZZA, T. R.; DAMIANI, C. R.; RUFATO, A. R.; AFFONSO, L. B.; HAWERROTH, F. J.; SCHUCH, M. W. Aclimatização e crescimento de plântulas de mirtilheiro 'climax' micropropagadas em função do substrato e da cobertura plástica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 898-905, 2011.

PEREIRA, A. P. A. **Qualidade pós-colheita de frutos de abacaxi “Pérola” e “Turiaçu”:** influências das condições de armazenamento e avaliação sensorial. 2013. 83. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, São Luís. 2013.

- PINHEIRO, M. V. M.; RÍOS-RÍOS, A. M.; DA CRUZ, A. C. F.; ROCHA, D. I.; ORBES M. Y.; SALDANHA, C. W.; BATISTA, D. S.; DE CARVALHO, A. C. P. P.; OTONI, W. C. CO<sub>2</sub> enrichment alters morphophysiology and improves growth and acclimatization in *Etilingera Elatior* (Jack) R.M. Smith micropropagated plants. **Brazilian Journal of Botany Online First**. 2021.
- PREMKUMAR, A. BARCELÓ -MUÑOZ, M.A. QUESADA, J.A. Mercado & F. Pliego-Alfaro. Influence of sucrose concentration on *in vitro* rooting, growth, endogenous sugars and *ex vitro* survival of juvenile avocado. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, n. 1. P. 46-50, 2003.
- RAMALHO, A. R., VIEIRA JUNIOR, J. R., FERNANDES, C. D. F., ROCHA, R. B., MARCOLAN, A. L., & CASSARO, J. D. Características das cultivares de abacaxizeiros cultivadas no estado de Rondônia. *Embrapa Rondônia-Comunicado Técnico* (INFOTECA-25 E). p. 1-6. 2009.
- REINHARDT, D. H. A planta e o seu ciclo. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F.; CABRAL, J. R. S. (Org.). **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa, p. 13-14. 2000.
- REINHARDT, D.H., CABRAL, J.R.S., SOUZA, L.F.S., SANCHES, N.F., MATOS, A.P. Pérola and 'Smooth Cayenne' pineapple cultivars in the state of Bahia, Brazil: growth, flowering, pests and diseases, yield and fruit quality aspects. **Fruits**, v. 57, n. 1, p. 43-53. 2002.
- REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p.105-138.
- RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C., OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62. n.3. p. 167 – 173. 2003.
- RIPLEY, B.S., REDFERN, S.P., DAMES, J. Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient *Sorghum* by means of chlorophyll fluorescence kinetics. **South African Journal of Science**, v. 100. p. 615-618. 2004
- ROZALI, S. E.; RASHID, K. A. Evaluation of efficient method for acclimatization of an important ornamental rhizomatic plant, *Calathea crotalifera*. **Malaysia Applied Biology Journal**, Selangor, v. 44, n. 3, p. 17-24, 2015.
- SAKODA, K., YAMORI W., SHIMADA T., SUGANO S.S., HARA-NISHIMURA I, TANAKA Y. HIGHER Stomatal density improves photosynthetic induction and biomass production in *Arabidopsis* under fluctuating light. **Front Plant Sci**. v. 21, n. 11. P. 589-603. 2020.
- SALDANHA, C. W., OTONI, C. G., ROCHA, D. I., CAVATTE, P. C., DETMANN, K. DA S. C., TANAKA, F. A. O., OTONI, W. C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia*

*glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87–99. 2014.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. de; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. do; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422. 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F. D.; NETO, A. R.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 4, p. 433-444. 2013.

SAMPAIO, A. C., FUMIS, T. D. F., & LEONEL, S. Crescimento vegetativo e características dos frutos de cinco cultivares de abacaxi na região de Bauru- SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3. p. 816-822. 2011.

SANTOS, G. C.; CARDOSO, F. P.; MARTINS, A. D.; PASQUAL, M.; OSSANI, P. C.; MAGNO QUEIROZ, J.; REZENDE, R. A. L. S.; JOYCE, D. Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulata*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 4. 2020.

SANTOS, P. B. D.; BARBOSA, F. D. S.; VIEIRA, C. F.; CARVALHO, A. C. P. P. Número de explantes, meio de cultura e fotoperíodo na micropropagação de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 4, p. 749-754. 2015.

SANTOS, P. R.; DA CRUZ, C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4. p. 356-364. 2008.

SCHMILDT, O., TORRES NETO, A., SCHMILDT, E. R., CARVALHO, V. C., OTONI, W. C., CAMPOSTRINI, E. Photosynthetic capacity, growth and water relations in „Golden“ papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. v. 27, p. 7–18. 2014.

SHIMAZAKI, K.; OMASA, K.; KINOSHITA, T.; NISHIMURA, M. Properties of the signals transduction pathway in the blue light response of stomatal guard cells of *Vicia faba* and *Commelina benghalensis*. **Plant Cell Physiology**, v. 8, n. 34, p. 1321- 1327. 1993.

SILVA, A. B.; CORREA, V. R. S.; TOGORO, A. H.; SILVA, J. A. S. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2. 2014.

SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Symphyomyrtus. **Revista Acadêmica: Ciências Animal**, v. 9, p. 179-184. 2011.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1257-1260. 2007.

SILVA, R. P. A.; SILVA, E. L. G.; SILVA JUNIOR, J. A.; SOARES, J. A.; PAULA, C.; HENRIQUES, A. B.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; VIDAL, M. S.; MENESES, C. H. S. G. Cultura de tecidos em feijão caupi. **BioFarm**. v. 13, n. 4. p. 74-89. 2017.

SILVA, S., TASSARA, H. Abacaxi. In: Silva, S., Tassara, H. Frutas no Brasil. São Paulo: Nobel, p. 25-27. 2001.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

SOUZA, F.V.D., SOUZA, A.S., SANTOS-SEREJO, J.A., SOUZA, E.H., JUNGHANS, T.G., SILVA, M.J. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. (eds.) Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 177- 206. 2009.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pather, U., Mohanly P. (eds.). **Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**. Taylor and Francis, London, p. 445 – 483. 2000.

STRAUSS, A. J.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; HEERDEN, P. D. R. V. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, n. 2, p. 147–157. 2006.

SZOPA, A. EKIERT, H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 115–121. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TAKAHASHI, N.; LING, P.P.; FRANTZ, J.M. Considerations for Accurate Whole Plant Photosynthesis Measurement. **ASABE Annual International Meeting** - Minneapolis, Minnesota, p. 17 - 20. 2007.

TAYBI, T.; CUSHMAN, J. C.; BORLAND, A. M. Environmental, hormonal and circadian regulation of crassulacean acid metabolism expression. **Functional Plant Biology**, Austrália, v. 29, n. 6, p. 669-678. 2002.

TING, I. P. Crassulacean acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Califórnia, v. 36, n. 1, p. 595-622. 1985.

TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIR A, J. BRESSAN – SMITH. R. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.104, n. 199-209. 2005.

TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J.G.; YAMANISHI, O.K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campinas, v.14, p.203-210. 2002.

TOYODA, P.R.M., COUTO, T.R., TORRES NETTO, A., SILVA, J.R., ATHAYDE, M.O., CARVALHO, V.S., LEAL, N.R. Análise biométrica e ecofisiológica da aclimatização de mudas de abacaxizeiro cultivar 'Gold' oriundos de micropropagação. **Anais do XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura – Natal, RN.** 2010.

WALTER, R. **Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento de *Capsicum annuum*: superação de barreiras pós-zigóticas, produção de genótipos em larga escala e protocolo para obtenção de haploides.** 2019. 163. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. 2019.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313. 1994.

WOLF, S.; KALMAN-ROTEM, N.; YAKIR, D.; ZRY, M. Autotrophic and heterotrophic carbon assimilation of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* L) plants. **Journal of Plant Physiology**, v.153, p. 574-580. 1998.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. *Silvicultura Clonal: princípios e técnicas.* ed. v.1. Viçosa: UFV, 2009. 272 p.

XIAO, Y.; KOZAI, T. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plantlet growth and production cost. **Hort science**, 39:1387-1391. 2004.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105. p. 149-158. 2011.

ZAMPERLINI, G. P. **Crescimento e desenvolvimento fotoquímico do processo fotossintético em abacaxizeiro 'Vitória'.** 2010. 60. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

ZELITCH, I. The close relationship between net photosynthesis and crop yield. **BioScience**, v. 32, n. 10, p. 796-802. 1982.

ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **Hort Science**, v. 44, p. 757-763. 2009.

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 530, p. 377-386. 2000