

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ABACAXIZEIRO CULTIVADOS *IN VITRO* E *EX VITRO*: EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA, CRESCIMENTO E RELAÇÕES HÍDRICAS

TARCISIO RANGEL DO COUTO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2012

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ABACAXIZEIRO CULTIVADOS *IN VITRO* E *EX VITRO*: EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA, CRESCIMENTO E RELAÇÕES HÍDRICAS

TARCISIO RANGEL DO COUTO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientador: Prof. Eliemar Campostrini
Coorientadora: Prof.^a Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2012

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ABACAXIZEIRO CULTIVADOS *IN VITRO* E *EX VITRO*: EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA, CRESCIMENTO E RELAÇÕES HÍDRICAS

TARCISIO RANGEL DO COUTO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 18 de abril de 2012

Comissão examinadora:

Prof. Edilson R. Schmidt (D.Sc., Genética e Melhoramento) – CEUNES/UFES

Dr.^a Alena Torres Netto (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UENF

Prof.^a Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Cultura de Tecidos Vegetais) – UENF

Prof. Eliemar Campostrini (D.Sc., Fisiologia Vegetal) – UENF
(Orientador)

DEDICO E OFEREÇO

Aos meus pais Dalva e Antonio Tarcisio, por terem me educado, me mostrando sempre que devemos ser honestos, humildes e que nunca devemos desistir de nada na nossa vida. Sem eles, eu não seria nada.

À minha família e a meus amigos, pelo apoio e incentivo e por todos os momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai, Filho e Espírito Santo.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e ao seu corpo docente.

Ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal – LMGV, pela excelente estrutura e equipamentos modernos.

À Faperj, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Eliemar Campostrini, pela orientação, confiança e amizade.

À prof.^a Virginia, pela orientação, confiança, conselhos e amizade.

À Dr.^a Alena, pela ajuda incondicional nesse trabalho, conselhos e amizade.

À Dr.^a Liliam Cândido, pela ajuda nas análises estatísticas e revisão sobre o tópico de melhoramento genético do abacaxizeiro.

Ao prof. Geraldo Gravina, pela ajuda nas análises estatísticas.

À prof.^a Marta Simone, pela ajuda nas interpretações das análises nutricionais.

Ao Laboratório de Biotecnologia - BIOMUDAS, pelo fornecimento das brotações de abacaxi 'Vitória'.

À SBW do Brasil e ao Instituto Biossômática, pelo fornecimento das brotações de abacaxi 'IAC Fantástico'.

Aos irmãos e amigos Cássio, Geraldo, João Batista, Renê e Validoro da "República King Size" pela boa convivência, apoio e incentivo e aos amigos das repúblicas em que morei, pela boa convivência e amizade.

A todos os meus amigos, em especial, àqueles que estiveram comigo durante o mestrado: Cássio, Validoro, Liliam, Weverton, Thiago, Marcelo, Jefferson, Cássia, Cristiano, Ricardinho, Luciano, Aylton Jr., Jean, Daniel, Deyverson, Bruno, Simone, João, Geraldo.

Aos meus amigos de graduação, pelos bons anos de convivência, especialmente Ana Paula, Élide, Juliano, Maria Isabela, Milena, Natália, Priscila, Zelita.

A todos os colegas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Setor de Fisiologia Vegetal e aos colegas do Laboratório de Fitotecnia, Setor de Cultura de Tecidos.

A Alena, Omar, Jefferson, Cássia, Marcelo, Roberta, Tatiana, Bruna, Geórgia, Beth, Léia, Monique, Jackeline e Sérgio, que me ajudaram na montagem e avaliações dos experimentos.

Ao Laboratório de Fitotecnia, Setor de Nutrição Mineral de Plantas, pelo suporte para as análises nutricionais e ao Sr. Acácio, pela ajuda no processo de análise nutricional.

Ao Paulo Cesar, por ter disponibilizado espaço na casa de vegetação para instalação do experimento de aclimatização e também disponibilizado a solução estoque para preparo da solução nutritiva.

Aos colegas da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e Produção Vegetal.

Ao IFF, Campos de Bom Jesus do Itabapoana, antigo Colégio Agrícola Ildefonso Bastos Borges – CTAIBB/UFF, que foi o responsável por eu estar aqui hoje, e ao seu corpo docente e técnico-administrativo.

Ao prof. Edilson Romais Schimdt, por ter aceitado fazer parte desta banca.

A toda a minha família, pela compreensão e incentivo.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse alcançar essa etapa de minha vida.

SUMÁRIO

	PÁG.
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	Xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O abacaxizeiro.....	4
2.1.1. Importância econômica.....	4
2.1.2. Características gerais da cultura.....	5
2.1.3. Propagação e aspectos fitossanitários.....	8
2.1.4. Cultivares.....	9
2.1.5. Melhoramento genético.....	11
2.2. Micropropagação.....	14
2.3. Fatores que afetam o cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	17
2.3.1. Sacarose.....	17
2.3.2. Trocas gasosas.....	20
2.3.3. Fluxo de fótons fotossintéticos.....	22
2.3.4. Relações hídricas.....	24
2.4. Acclimatização de plantas.....	26
3. OBJETIVO.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30

4.1. Experimento de Cultivo <i>in vitro</i>	30
4.2. Experimento de aclimatização.....	34
4.3. Avaliações.....	35
4.3.1. Avaliações de crescimento ou biométricas.....	35
4.3.2. Avaliações da capacidade fotossintética.....	37
4.3.3. Avaliação nutricional.....	38
4.4. Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. Experimento <i>in vitro</i>	40
5.2. Experimento de aclimatização das mudas.....	58
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1 – Resumo da análise de variância dos fatores luz, tipo de frasco e cultivar com as interações em abacaxizeiro, aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	41
Quadro 2 – Resumo da análise de variância dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo com suas interações em abacaxizeiro aos 30 dias de aclimatização.....	59
Quadro 3 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para as variáveis DR, AR e NF com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização.....	63
Quadro 4 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para as variáveis VR, AF, MSF, MSR, MST, MFE, SPAD, F_v/F_m , PI, AREA e RC/ABS com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização.....	65
Quadro 5 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para as variáveis A, gs e E com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização.....	71
Quadro 6 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para A, gs e E realizada no período diurno com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização.....	73
Quadro 7 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para A e E realizada no período noturno com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização.....	74

Quadro 8 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para algumas variáveis com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização.....	81
Quadro 9 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para macronutrientes com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização.....	89
Quadro 10 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para macronutrientes com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização.....	90

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1 – Esquema de funcionamento do sistema de circulação forçada de ar (sistema ventilado) para o cultivo de plantas <i>in vitro</i>	32
Figura 2 - Déficit de pressão de vapor do ar (DPV) máximo, médio e mínimo dentro durante o cultivo <i>in vitro</i> . Os pontos das curvas representam a média diária ao longo do tempo.....	33
Figura 3 – Distribuição do espectro luminoso. (A) Luz branca e (B) luz vermelha.....	33
Figura 4 - Temperatura, umidade relativa, fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) e déficit de pressão de vapor do ar (DPV) máximo, médio e mínimo dentro da casa de vegetação. Os pontos das curvas representam a média diária ao longo do tempo.....	35
Figura 5 – Diâmetro da roseta em mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	42
Figura 6 – Altura da roseta em mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	43
Figura 7 – Massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	44
Figura 8 – Teor relativo de água em abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	46

Figura 9 - Taxa de perda de água de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' cultivados <i>in vitro</i> em diferentes tipos de luz e frasco de cultivo na fase de enraizamento.....	47
Figura 10 – Intensidade de verde em mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	49
Figura 11 – Eficiência fotoquímica (F_v/F_m) de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	50
Figura 12 – Índice fotossintético de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	52
Figura 13 – Área sob a curva da fluorescência que estima o tamanho do 'pool' de plastoquinona do fotossistema II de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	53
Figura 14 – RC/ABS em mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	54
Figura 15 – Taxa fotossintética e transpiração de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	55
Figura 16 – Diâmetro e altura da roseta de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 30 dias de aclimatização.....	60
Figura 17 – Intensidade do verde (SPAD) em mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 30 dias de aclimatização.....	60
Figura 18 – Diâmetro e altura da roseta de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	64
Figura 19 – Volume de raiz de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	66
Figura 20 – Área foliar de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	66
Figura 21 – Massa seca das folhas, raiz e total de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	67
Figura 22 – Intensidade do verde (SPAD) de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	68
Figura 23 – Eficiência fotoquímica (F_v/F_m) de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	68
Figura 24 – Taxa fotossintética de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.....	71

Figura 25 – Condutância estomática de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.....	72
Figura 26 – Transpiração de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.....	72
Figura 27 – Valores da assimilação fotossintética do carbono em folhas de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’, na avaliação diurna, aos 75 dias de aclimatização.....	75
Figura 28 – Valores da assimilação fotossintética do carbono em folhas de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’, na avaliação noturna, aos 75 dias de aclimatização.....	75
Figura 29 – Transpiração de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ no período noturno aos 75 dias de aclimatização.....	76
Figura 30 – Diâmetro da roseta de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	82
Figura 31 – Altura da roseta e número de folhas de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	82
Figura 32 – Volume de raiz e área foliar de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	83
Figura 33 – Área foliar de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	84
Figura 34 – Massa da matéria seca foliar, radicular e total de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	85
Figura 35 – Intensidade do verde (SPAD) de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	86
Figura 36 – Eficiência fotoquímica de mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.....	87
Figura 37 – Teores de fósforo (g kg^{-1}) em mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’. (A) 60 dias de aclimatização e (B) 75 dias de aclimatização.....	91
Figura 38 – Teores de potássio (g kg^{-1}) em mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’. (A) 60 dias de aclimatização e (B) 75 dias de aclimatização.....	92
Figura 39 – Teores de cálcio (g kg^{-1}) em mudas de abacaxizeiro ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.....	93

Figura 40 – Teores de magnésio (g kg^{-1}) em mudas de abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico'. (A) 60 dias de aclimatização e (B) 75 dias de aclimatização.....

94

RESUMO

COUTO, Tarcisio Rangel do; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2012; Avaliação de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* e *ex vitro*: eficiência fotossintética, crescimento e relações hídricas; Orientador: Professor Eliemar Campostrini; Co-orientadora: Professora Virginia Silva Carvalho.

Neste trabalho, objetivou-se estudar sob cultivo *in vitro* e *ex vitro*, fase de aclimatização, as possíveis variações entre genótipos relacionadas à capacidade fotossintética, às relações hídricas, ao estado nutricional e ao crescimento dos abacaxizeiros cv. 'Vitória' e cv. 'IAC Fantástico', em resposta à alteração do ambiente *in vitro* por meio da utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. Tal estudo foi uma tentativa de otimizar a micropropagação destas cultivares, bem como tentar compreender as respostas fotossintéticas e de crescimento destes genótipos nas condições de estudo relatadas. Na fase de cultivo *in vitro*, para as duas cultivares, os tratamentos foram dispostos em DIC, com seis repetições, cinco plantas por repetição, em um esquema de parcelas sub subdivididas, constituídas de qualidades de luz (branca e vermelha, com FFF de $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente), tipos de frasco de cultivo (fechado e ventilado) e concentrações de sacarose no meio de cultivo (15 e 30 g L^{-1}). A avaliação foi feita após 40 dias de cultivo *in vitro*, em três repetições, pois com as outras foi montado o experimento *ex vitro* (fase de aclimatização). O experimento de aclimatização manteve o mesmo esquema experimental utilizado no cultivo *in*

vitro, de modo que fossem verificados os efeitos dos tratamentos *in vitro* durante a fase *ex vitro*. Foi utilizado o DIC com três repetições e cinco mudas por parcela, correspondendo às cinco mudas de cada frasco “baby food”. As avaliações foram feitas aos 30, 60 e 75 dias de aclimatização. Nas condições *in vitro*, verificou-se que na presença de luz vermelha a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico para algumas características relacionadas à capacidade fotossintética, como SPAD, eficiência fotoquímica do fotossistema II, AREA sobre a curva e, RC/ABS. Observou-se que não houve assimilação fotossintética *in vitro*, com a adição da sacarose ao meio de cultura como fonte de carbono (15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹). Neste experimento, a tentativa de ventilar os frascos de cultivo, ou seja, melhorar as trocas gasosas, não foi suficiente para otimizar a assimilação fotossintética *in vitro* das duas cultivares em estudo. Foram observadas diferentes respostas das duas cultivares para as avaliações da capacidade fotossintética aos 30, 60 e 75 dias, sendo que para a maioria delas a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico. Nas avaliações de crescimento, a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico em todo o período, e tal fato foi constatado aos 75 dias, não sendo verificado que a cv. Vitória apresentou o metabolismo tipo C₃ e a cv. IAC Fantástico, o metabolismo tipo CAM. Nessa condição *ex vitro*, o metabolismo C₃ das plantas da cv. Vitória pode ter contribuído para o maior crescimento desta cultivar. Nessa fase, os teores de macronutrientes foram variáveis entre as cultivares, demonstrando a necessidade de pesquisas relacionadas à nutrição de plantas em fase de aclimatização. Neste experimento, não houve uma relação entre os tratamentos aplicados na condição *in vitro* com a resposta dos genótipos na condição *ex vitro*, o que mostra que alterações deverão ser feitas no ambiente *in vitro*, como maior redução na concentração de sacarose, incremento na intensidade de luz vermelha e elevação na concentração de CO₂ nos frascos de cultivo, para que estas cultivares possam apresentar o metabolismo fotoautotrófico já na condição *in vitro*. Tal alteração neste ambiente *in vitro* será fundamental para a otimização do crescimento na fase de aclimatização.

Palavras-chave: ‘Vitória’, ‘IAC Fantástico’, micropropagação, fluxo de fótons fotossintéticos, frasco de cultivo, sacarose, aclimatização, nutrição mineral.

ABSTRACT

COUTO, Tarcisio Rangel do, M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April, 2012; Evaluation of pineapple genotypes grown *in vitro* and *ex vitro*: photosynthetic efficiency, growing and water relations. Adviser: Eliemar Campostrini; Co-adviser: Virginia Silva Carvalho.

In this work, aimed to study *in vitro* culture and *ex vitro* (acclimatization), the possible variation between pineapple genotypes ('Vitória' e 'IAC Fantástico') related to photosynthetic capacity, water relations, nutritional status and growing, in response to environmental change *in vitro* through use of different qualities light, vessels and sucrose. Such a study was an attempt to optimize the micropropagation these cultivars, as well trying to understand the growth and photosynthetic responses of genotypes in accordance with the conditions of the study reported. *In vitro* culture, for the two cultivars, the treatments were carried out in randomized fully design, with six repetitions, and five plants repetition, in a plots sub sub-divided, incorporated qualities of light (white and red, with FFF 105 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively), vessels (closed and ventilated) and sucrose (15 and 30 g L⁻¹). The evaluation was made after 40 days *in vitro* culture, in three repetitions, as with the other was the acclimatization experiment. In the acclimatization at two cultivars, remained the same experimental used *in vitro*, so that if check the answers *in vitro* treatments during acclimatization. Acclimatization experiment kept the same experimental schema used in *in vitro* culture. We used randomized fully design with three repetitions and five plantlets per plot

(corresponding to the five plantlets of vessel "baby food"). The reviews were made to 30, 60 and 75 days of acclimatization. *In vitro* conditions, it was found that in the red light cv. Vitória was higher than cv. IAC Fantástico for some related features to photosynthetic capacity, such as, photochemical efficiency photosystem II, SPAD, area on the curve and RC/ABS. It was observed that there was no photosynthetic assimilation *in vitro*, with the addition of sucrose as carbon source to the culture medium (15 g L⁻¹ or 30 g L⁻¹) In this experiment, attempting to ventilate the vessels, to improve gas exchange, was not enough to optimize the assimilation photosynthetic *in vitro* for two cultivars. Were different answers of two cultivars for photosynthetic capacity to 30, 60 and 75 days, and for most of them cv. Vitória was higher cv. IAC Fantástico. On assessments growing, cv. Vitória was exceeding cv. IAC Fantástico throughout the period, and this fact was noted to 75 days, it has become apparent that the cv. Vitória presented C₃ metabolism and cv. IAC Fantástico CAM metabolism. In *ex vitro* conditions, C₃ metabolism of cv. Vitória plants may have contributed to the increased growth of this cultivar. During this phase the macronutrient levels were variables between cultivars, demonstrating the need for research related to nutrition of plants in acclimatization. In this experiment, there was a relationship between the treatments applied *in vitro* culture with the response of genotypes in *ex vitro*, which shows that changes should be made *in vitro* environment, such as greater decrease in sucrose, increased intensity red light, and increase CO₂ concentration at the vessels, so that these cultivars may present already provided *in vitro* photoautotrophic metabolism. Such a change in this environment *in vitro* will be critical to optimizing growing in acclimatization.

Key words: 'Vitória', 'IAC Fantástico', micropropagation, flow photosynthetic photons, vessels, sucrose, acclimatization, mineral nutrition.

1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merr) é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, família Bromeliaceae. Esta espécie é tipicamente tropical, sendo considerada uma planta rústica, com características morfológicas, anatômicas e fisiológicas que lhe permitem sobreviver em condições adversas. O ciclo apresenta uma variação de 12 a 30 meses, e, pela adaptabilidade, é uma planta promissora da fruticultura brasileira (Reinhardt et al., 2000). As cultivares mais plantadas no mundo e no Brasil são 'Smooth Cayenne' e 'Pérola', respectivamente (Cabral et al., 2000).

No Brasil, o abacaxizeiro encontra condições climáticas ideais para o crescimento e produção, sendo cultivado em vários estados. No ano de 2011, o país produziu 1.504.988 toneladas de frutos em uma área de 57.000 hectares, o que confere uma produtividade média de 26.401 kg ha⁻¹. Em 2011, a distribuição percentual da produção nacional por região fisiográfica foi Nordeste (40,30%), Sudeste (31,80%), Norte (20,90%), Centro-Oeste (6,70%) e Sul (0,30%) (IBGE, 2011). O Rio de Janeiro apresenta condições climáticas ideais para o cultivo dessa frutífera, além de potencial centro consumidor.

A propagação comercial do abacaxizeiro é vegetativa. O método convencional de propagação é feito por meio de mudas formadas a partir de brotações laterais da planta, denominadas filhote, filhote-rebentão ou rebentão. Outro método que vem sendo utilizado é a micropropagação. Essa técnica vem sendo aplicada em biofábricas, não só pela possibilidade de se obterem plantas

mais resistentes a fatores de estresses bióticos, como a fusariose, e abióticos, como a salinidade, mas também pela rápida propagação clonal *in vitro* de novas cultivares. No caso do abacaxizeiro, a micropropagação está sendo utilizada comercialmente visando a uma rápida multiplicação de novas cultivares e a um aumento na quantidade de mudas (Macêdo et al., 2003).

As cultivares de abacaxizeiro mais plantadas atualmente no Brasil são 'Pérola' e 'Smooth Cayenne'. Ambas são suscetíveis à fusariose, principal problema fitossanitário para a cultura no País. Algumas soluções para evitar essa doença são o plantio de mudas saudáveis e frequentes pulverizações com fungicidas. No entanto, a utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente para o controle dessa doença e pode ser considerado o mais eficiente e econômico (Silva e Tassara, 2001).

Com relação ao melhoramento genético da cultura, há pouca informação disponível. O primeiro trabalho de melhoramento do abacaxizeiro foi desenvolvido na Flórida (EUA), objetivando obter cultivares mais adaptadas às condições locais e melhorar a qualidade do fruto para industrialização. Entre as estratégias de melhoramento adotadas, podem ser citadas a utilização direta dos recursos genéticos, a seleção clonal, explorando a variabilidade intravarietal existente, e a hibridação direta entre genitores superiores (Crestani et al., 2010).

Em sistema convencional de micropropagação, as plantas são cultivadas *in vitro* em condições de ambiente fechado, sem trocas gasosas, com alta umidade do ar, baixa luminosidade e com a utilização de açúcares no meio de cultura como fonte de carbono e energia (Kozai e Kubota, 2001). Devido às condições de cultivo, as plantas apresentam alterações anatômicas e metabólicas que as tornam organismos heterotróficos. Estas alterações impossibilitam que a maquinaria fotossintética opere normalmente (Kozai, 1991). Por isso, alterações no cultivo *in vitro*, como redução da concentração de sacarose do meio de cultura, ventilação dos frascos de cultivo e elevação da qualidade e da intensidade da luz, podem estimular a capacidade fotossintética das plantas ainda nessas condições, produzindo mudas mais rústicas e adaptadas às condições *ex vitro* (Kozai e Nguyen, 2003).

A aclimatização é a etapa em que as plantas são transferidas da condição *in vitro* para *ex vitro*. Atenção especial deve ser dada a essa etapa, pois as mudas *in vitro* apresentam características anatômicas e fisiológicas desfavoráveis, tais

como, cutícula pouco espessada, estômatos poucos funcionais, além de fraca conexão vascular (Carvalho et al., 2002). Essas características desfavoráveis fazem com que seja necessário maior controle de luminosidade, temperatura e umidade durante a aclimatização, pois é nessa fase que ocorrem as maiores taxas de mortalidade.

Diante do exposto, no presente trabalho, objetivou-se avaliar as diferenças entre as cultivares 'Vitória' e 'IAC Fantástico', quanto aos aspectos ecofisiológicos do cultivo *in vitro*, e os seus efeitos durante a fase de aclimatização, relacionados à fotossíntese, fluorescência, relações hídricas, teores de macronutrientes, índice SPAD e quanto ao crescimento, em resposta à utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O abacaxizeiro

2.1.1. Importância econômica

No cenário mundial, o Brasil se apresenta como um dos maiores produtores de frutas, com 34 milhões de toneladas produzidas em 2,2 milhões de hectares, ofertando quatro milhões de empregos diretos e indiretos (Mendonça e Medeiros, 2011).

No mundo, o abacaxizeiro é a sexta classe de fruteira mais cultivada e em 2009 a produção total foi de 18,4 milhões de toneladas (FAO, 2011). Na produção mundial de abacaxi, a Tailândia ocupa o primeiro lugar, com 1,99 milhões de toneladas, e o Brasil ocupa o segundo lugar, com aproximadamente 1.700.000 toneladas (Mendonça e Medeiros, 2011).

No ano de 2011, o Brasil produziu 1.504.988 toneladas de frutos, em uma área de 57.000 hectares, com rendimento médio de 26.401 kg ha⁻¹. Nesse mesmo ano, a distribuição percentual da produção nacional por região fisiográfica foi assim relacionada: Nordeste (40,30%), Sudeste (31,80%), Norte (20,90%), Centro-Oeste (6,70%) e Sul (0,30%). Os maiores produtores nacionais são: Paraíba (18,4%), Pará (17,9%) e Minas Gerais (15,2%) (IBGE/LSPA, 2011).

O Estado do Rio de Janeiro é o segundo maior produtor da região sudeste, com produção média de 109.786 mil frutos, em uma área de 4.453

hectares, com rendimento médio de 24.654 kg ha⁻¹, o que representou 7,3% da produção brasileira (IBGE/LSPA, 2011). Apesar de o Estado do Rio de Janeiro ter pequena participação na produção brasileira de abacaxi, ele apresenta perfil adequado e bastante propício ao cultivo dessa espécie. Embora possua uma pequena extensão territorial, cerca de 0,5% do território nacional, o Rio de Janeiro apresenta condições climáticas altamente propícias ao cultivo dessa fruta (Ponciano et al., 2006).

No Brasil, o abacaxizeiro é explorado há muitas décadas, de forma predominante em pequenas propriedades, com áreas médias inferiores a cinco hectares, onde se emprega na maioria das vezes a mão de obra familiar, com recursos próprios para implantação e manutenção da lavoura. Nos últimos anos, o agronegócio do abacaxi tem crescido muito, transformando-se no principal sustentáculo econômico de várias regiões em que a espécie é cultivada (Cunha, 2007).

A baixa produtividade do abacaxizeiro justifica a necessidade de mais pesquisas e desenvolvimento de tecnologias voltadas para a promoção da cultura no Estado do Rio de Janeiro, considerado um grande centro consumidor e com potencial exportador. Uma das formas mais simples para o aumento da produtividade é a utilização de mudas sadias e micropropagadas, uma vez que essa prática tem pouco impacto sobre os hábitos tradicionais de manejo da cultura. O abacaxizeiro é uma cultura importante para o Norte Fluminense, sendo plantadas anualmente cerca de 30 milhões de mudas, constituindo uma das principais fontes de renda e emprego nos municípios de São Francisco de Itabapoana, São João da Barra e Quissamã (Vieira et al., 2010).

2.1.2. Características gerais da cultura

O abacaxizeiro é uma monocotiledônea herbácea da família Bromeliaceae, cujo gênero mais importante é o *Ananas*, na qual está incluído o abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr) e outras espécies que são utilizadas para a produção de fibras ou ornamentação. No Brasil, há representantes distribuídos em quase todos os ecossistemas, desde o nível do mar até as regiões montanhosas. A família Bromeliaceae se destaca por ser uma das principais componentes da flora brasileira, abrigando aproximadamente 36% das espécies

catalogadas com vários gêneros endêmicos, alguns deles encontrados somente na Mata Atlântica (Souza e Wanderley, 2007).

Sendo o abacaxizeiro uma frutífera tropical, adapta-se melhor sob altitudes de até 100 m, onde apresenta menor ciclo, maior produção e melhor qualidade da fruta (Silva e Tassara, 2001). A temperatura ideal para o cultivo está entre 21 °C a 31 °C. Esta espécie é exigente em luz, desenvolvendo-se bem em locais com insolação ótima de 1.500 a 2.000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e com 6,8 a 8,2 horas de luz solar por dia (Cunha, 1999). A planta cresce em ampla faixa de solos, mas prefere os solos argilo-arenosos, bem drenados, de boa profundidade e com pH entre 4,5 e 5,5 (Barreira Neto e Santos, 1999).

Provavelmente, o abacaxizeiro seja originário da região compreendida entre 15°N e 30°S de latitude e 40°L, e 60°W de longitude, o que inclui as zonas centrais e sul do Brasil, o nordeste da Argentina e o Paraguai. Estudos de distribuição do gênero *Ananas* indicam que o centro de origem é a região Amazônica, compreendida entre 10°N e 10°S de latitude e entre 55°L e 75°W de longitude (Souza et al., 2002)

A planta de abacaxizeiro é composta por um caule (talo) curto e grosso, ao redor do qual crescem as folhas, em forma de calhas estreitas e rígidas, e no qual se inserem as raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, encontrado em geral à profundidade de 0 a 30 cm e, raras vezes, a mais de 60 cm da superfície do solo. A planta adulta das cultivares comerciais mede de 1,00 m a 1,20 m de altura, e de 1,00 m a 1,50 m de diâmetro. De acordo com o formato e a posição na planta, as folhas são classificadas em A, B, C, D, E e F, contando da folha mais velha e externa, para a folha mais nova e interna, respectivamente. Do ponto de vista do manejo da cultura, a folha D é a mais importante, sendo a mais jovem entre as folhas adultas. Em termos metabólicos, esta folha é a mais ativa de todas e, por conseguinte, é usada na análise do crescimento e do estado nutricional da planta (Reinhardt et al., 2002).

O fruto do abacaxizeiro é normalmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos fundidos entre si sobre o eixo central ou coração. A polpa geralmente apresenta cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, o peso médio dos frutos gira em torno de um quilo, sendo 25% representado pela coroa. Essa coroa é formada por um tufo de folhas. Os rebentos ou mudas desenvolvem-se a partir de gemas axilares localizadas no

caule (rebentões) e no pedúnculo (filhotes). Os plantios de abacaxi são feitos com mudas de vários tipos, tais como coroa (brotação do fruto), filhotes, filhotes-rebentão e rebentão. Cada tipo possui características vantajosas ou não, que devem ser consideradas na escolha e manejo do material de plantio (Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003).

O ciclo do abacaxizeiro está dividido em três fases distintas, a fase de crescimento vegetativo, que vai do plantio ao tratamento de indução floral ou da iniciação floral natural. Esta fase tem duração variável, mas corresponde ao período de 8 a 12 meses. A segunda fase, denominada reprodutiva ou de formação do fruto, tem duração entre cinco e seis meses e, independentemente da região, é bastante estável. A terceira fase, denominada propagativa ou de formação de mudas (filhotes e rebentões), se sobrepõe, parcialmente, à segunda fase. Em geral, em regiões tropicais, o primeiro ciclo da cultura varia de 13 a 18 meses. O ciclo pode ser influenciado pelo material propagativo utilizado, pelas condições ambientais e pelo manejo da cultura, podendo variar de 16 a 36 meses aproximadamente (Almeida et al., 2002).

Segundo Reinhardt et al. (2000), o abacaxizeiro é uma bromeliácea que atua como uma planta CAM variável, e que tem sido extensivamente estudado em condições agrícolas devido à sua importância econômica. Dependendo das condições ambientais como radiação, temperatura e disponibilidade de água, essa planta apresenta o metabolismo do tipo C_3 ou do tipo CAM. No metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), o padrão de abertura e fechamento dos estômatos ocorre de maneira invertida em relação às plantas com metabolismo C_3 e C_4 . Nas plantas do tipo CAM, os estômatos ficam fechados durante o dia e se mantêm abertos durante a noite. Uma das consequências desta capacidade de manter os estômatos fechados durante o dia é estas plantas apresentarem alta eficiência no uso da água. O uso eficiente de água (EUA) refere-se à quantidade de CO_2 assimilado para cada unidade de água transpirada (Taiz e Zeiger, 2009). Assim, nas plantas que apresentam esse metabolismo do tipo CAM, pouca quantidade de água e altas temperaturas durante o dia e baixas temperaturas noturnas favorecem a acumulação de ácido. Em condição adequada de água no solo, o metabolismo do tipo C_3 é favorecido. Portanto, sob irrigação, o abacaxi maximiza o metabolismo C_3 e minimiza o metabolismo do tipo CAM. A atividade CAM é

próxima do máximo com temperaturas de 30 °C de dia e entre 22 e 24 °C à noite (Reinhardt et al., 2000).

2.1.3. Propagação e aspectos fitossanitários

O abacaxizeiro é uma planta perene, não propagado comercialmente via sementes, as quais são geralmente vestigiais (abortadas) em razão de as cultivares serem altamente autoincompatíveis e, ou apresentarem baixa fertilidade. Entretanto, as sementes são importantes para exploração da variabilidade genética da cultura, associadas ao melhoramento genético. Essas sementes são obtidas via hibridações artificiais (Cabral et al., 2003). Segundo Coppens d'Eeckenbrugge et al. (1993), a autoincompatibilidade no abacaxizeiro se deve à inibição do crescimento do tubo polínico após a fecundação, que é determinado pelo sistema gametofítico controlado pelo loco S com múltiplos alelos. Segundo esses autores, em algumas variedades, a ocorrência natural de formação de sementes é decorrente da polinização cruzada, sendo realizada, na maioria das vezes, por aracnídeos, insetos ou pássaros.

A propagação do abacaxizeiro é vegetativa, feita comercialmente por diversas partes da planta matriz, tais como as gemas de seções do caule; rebentão - brotação da base do caule; filhote - brotação do pedúnculo; filhote-rebentão - brotação da região de inserção do pedúnculo no caule; e coroa - brotação do ápice do fruto. Outro método de grande importância para a cultura é a micropropagação, feita em laboratórios comerciais denominados biofábricas. Esta técnica produz mudas uniformes, saudáveis, de alto vigor e já enraizadas, o que facilita o planejamento durante o desenvolvimento da cultura e posterior comercialização das mudas (Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003).

Na cultura do abacaxizeiro, a qualidade da muda é bastante importante, pois influencia no estado sanitário, desenvolvimento, produção e rendimento das plantações. A obtenção e a utilização do material de plantio com vigor e sanidade superiores podem ser considerados fatores decisivos para se alcançar o sucesso econômico no cultivo dessa frutífera. A pequena oferta de mudas de boa qualidade é um dos fatores que mais limitam a expansão da abacaxicultura (Reinhardt, 2002; Reinhardt et al., 2002)

Com relação às doenças, no Brasil a fusariose ou gomose (*Fusarium subglutinans*) é a mais importante, estando presente nas principais regiões produtoras de abacaxi. Esta doença causa perdas elevadas na produção de frutos. A fusariose constitui séria ameaça à abacaxicultura mundial, sendo a cv. Smooth Cayenne e a cv. Pérola bastante suscetíveis a essa doença (Cunha, 2007). De maneira geral, a fusariose pode infectar 40% das mudas, 20% das quais morrem antes de atingir a fase de floração. Nas frutas, a incidência da fusariose varia com a época de produção, podendo ser superior a 80%, caso o desenvolvimento da fruta ocorra em períodos favoráveis à incidência da doença (umidade relativa e precipitações elevadas e temperaturas entre 15 e 25 °C). Os frutos afetados pela fusariose apresentam diminuições do peso total, dos teores de acidez e de açúcares reductores e totais (Gonçalves e Carvalho, 2000).

2.1.4. Cultivares

Na escolha de uma cultivar de abacaxi para a implantação de plantios comerciais, o agricultor deve considerar, entre outros fatores, a disponibilidade e qualidade das mudas e o destino da produção. Qualquer que seja a cultivar utilizada, o agricultor deve se preocupar com a manutenção das características morfoagronômicas. Embora o abacaxizeiro seja uma planta de propagação predominantemente vegetativa, o uso contínuo do mesmo material de plantio pode proporcionar a degeneração do clone pelo desenvolvimento de pragas e doenças e surgimento de plantas com características diferentes do padrão da cultivar (Cunha, 1999).

As cultivares mais plantadas no mundo são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Spañola Roja, Pérola (Pernambuco) e Perolera. Cerca de 70% do plantio mundial é da cultivar Smooth Cayenne. No Brasil, a mais plantada é a 'Pérola' (Cunha, 2007). Segundo Cabral (2000), a cultivar Smooth Cayenne, conhecida também como abacaxi havaiano, é a mais plantada no mundo, tanto em termos de área, quanto em faixa de latitude. Esse genótipo possui frutos não adequados para o consumo *in natura*, pois a polpa apresenta elevada acidez. Contudo, os frutos são de ótimo tamanho e têm alta produtividade. Atualmente, a cv. Smooth Cayenne é considerada a rainha das cultivares de abacaxi, por possuir características favoráveis à industrialização da polpa. Nos principais

países produtores do mundo, o amplo predomínio de plantios de 'Smooth Cayenne', o uso de poucas cultivares para plantios comerciais e a substituição de variedades locais por 'Smooth Cayenne' vêm provocando o desaparecimento de variedades de interesse local ou regional (Cabral, 2000; Cabral et al, 2004).

Tendo em vista reduzir as perdas provocadas pela fusariose, foram introduzidas no mercado brasileiro de mudas cultivares resistentes como a 'Imperial', híbrido resultante do cruzamento das cultivares Perolera e Smooth Cayenne, a 'Vitória', cruzamento das cultivares Primavera e Smooth Cayenne, e a 'IAC Fantástico', 'Ajubá', 'Primavera', 'Roxo de Tefé' e 'Alto Turi'. Esses genótipos foram indicados para as regiões produtoras onde a fusariose é o fator limitante à produção. Associado à tolerância à fusariose, foram também objetivos o aumento da produtividade e da qualidade dos frutos e a ausência de espinhos nas folhas (Cabral et al., 2009; Meletti et al., 2011).

A cultivar Pérola é a mais plantada no Brasil, particularmente na região Nordeste e no Estado de Minas Gerais, sendo destinada principalmente para o consumo *in natura*, pela alta qualidade organoléptica. Esta cultivar tem frutos menores que a cv. Smooth Cayenne, são levemente cônicos, variando de 1,0 a 1,5 kg, a polpa é branca e são ricos em suco contendo elevados teores de açúcar e reduzida acidez (Cunha, 2007).

Em comparação à cv. Pérola e à cv. Smooth Cayenne, a cv. Vitória apresenta características agronômicas semelhantes ou superiores. Esse genótipo foi desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – Incaper em parceria com a Embrapa, lançado em 2006, originado do cruzamento entre 'Primavera' e 'Smooth Cayenne'. As plantas deste genótipo têm como vantagem a ausência de espinhos nas folhas, o que facilita os tratos culturais. As recomendações técnicas de cultivo da cv. Vitória são as mesmas atualmente em uso pelos produtores para 'Pérola' e 'Smooth Cayenne'. A cv. Vitória possui praticamente o mesmo porte da cv. Pérola, além de plantas vigorosas, apresenta bom perfilhamento, bom desenvolvimento e crescimento, produzindo frutos de excelente qualidade para o mercado. Os frutos têm polpa branca, elevados teores de açúcares (média de 15,8 °Brix) e excelente sabor nas análises químicas e sensoriais, sugerindo que suas características relativas à acidez são superiores às do abacaxi 'Pérola' e 'Smooth Cayenne'. Esta cultivar apresenta ainda maior resistência ao transporte e na pós-colheita. Outras

características favoráveis da cultivar Vitória são o formato cilíndrico dos frutos, casca de cor amarela na maturação, pesando em torno de 1,5 kg. Os frutos obtidos podem ser destinados ao mercado de consumo *in natura* e para a agroindústria (Ventura et al., 2006).

A cultivar IAC Fantástico foi lançada pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC em 2010. Essa cultivar foi obtida por meio do cruzamento entre cv. Tapiracanga – TP (não cultivada para fins comerciais) e cv. Smooth Cayenne – SC. Durante o processo de melhoramento, foi selecionado o híbrido TP x SC nº 2. Posteriormente, foram retiradas sementes desse híbrido e, após a germinação, as plantas foram cultivadas em condição de campo. A polinização foi feita naturalmente, polinização aberta, não sendo possível conhecer o genitor masculino. Finalmente, uma das plantas foi selecionada por meio de características excepcionais de planta e fruto, originando a nova cultivar IAC Fantástico (Spironello et al., 2011).

A planta de abacaxizeiro cv. IAC Fantástico é bastante vigorosa, resistente à doença fusariose, e as folhas apresentam espinhos somente na extremidade da borda foliar. O fruto é de tamanho mediano a grande, formato intermediário entre a cv. Pérola e a cv. Smooth Cayenne. A polpa é saborosa, doce (média > 16ºBrix), pouco ácida e de coloração amarelo intenso, servindo para o consumo *in natura* ou para a agroindústria (Spironello et al., 2010).

2.1.5. Melhoramento genético

Até o presente, as informações científicas relacionadas ao melhoramento genético do abacaxizeiro são escassas. De acordo com Crestani et al. (2010), o relato dos primeiros trabalhos realizados sobre esse assunto foram na Flórida (EUA) a partir da década de 70, objetivando obter cultivares mais adaptadas às condições locais e melhorar a qualidade do fruto para industrialização. Posteriormente, outros trabalhos foram desenvolvidos no Havaí (EUA), Austrália, Taiwan, Filipinas, Malásia, África do Sul, Porto Rico, Brasil, Venezuela, Okinawa, Cuba, Costa do Marfim e Martinica (Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003; Crestani et al., 2010).

O Brasil é um dos principais centros de origem e diversidade do gênero *Ananas* e por essa razão tem a responsabilidade de preservar o germoplasma,

que deverá ser utilizado como importante fonte de variabilidade genética nos programas de melhoramento desta cultura (Cabral et al., 2009b).

O maior programa de melhoramento genético do abacaxizeiro do Brasil é desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa de Cruz das Almas (BA), desde 1978 (Cabral et al., 2009; Crestani et al., 2010). A Embrapa mantém um banco de germoplasma, localizado na cidade de Cruz das Almas, no Estado da Bahia, com mais de 600 acessos, distribuídos em espécies e variedades botânicas do gênero *Ananas*. (Souza, 2009b). Esta coleção tem potencial para identificar e gerar novas cultivares, principalmente considerando a significativa variação genética do gênero. Estudos sobre essa variação podem fornecer suporte para programas de melhoramento com o objetivo de gerar novos híbridos de abacaxis comestíveis e ornamentais (Souza et al., 2011).

Entre as atividades realizadas no banco, as caracterizações morfológicas que têm sido feitas se baseiam no desenvolvimento de descritores morfológicos de abacaxi pelo Conselho Internacional de Recursos Fitogenéticos – CIRF. As técnicas de marcadores moleculares, análises citogenéticas, avaliações agronômicas e ensaios de resistência à *Fusarium* são alguns dos estudos realizados nos últimos 30 anos com os acessos da coleção, a fim de gerar informações úteis que podem ser usadas em programas de melhoramento genético da cultura (Vieira et al., 2010).

De maneira geral, os programas de melhoramento genético do abacaxizeiro visam à obtenção de cultivares produtivas, adaptadas às condições climáticas locais, resistência a pragas e doenças, além de atributos relacionados ao sabor do fruto (Py et al., 1984). Sendo assim, o melhoramento nessa cultura visa a melhorias em características como crescimento rápido, folhas sem espinhos ou com poucos espinhos localizados nas extremidades dos bordos das folhas, rebentão precoce localizado na base da planta, fruto de forma cilíndrica, casca amarela, polpa amarela e pouco fibrosa, elevado teor de sólidos solúveis totais (Brix maior do que 16°), acidez moderada, alto teor de ácido ascórbico e boa produção de mudas do tipo filhote (Py et al., 1984; Cabral et al., 2003; Cabral et al., 2005; Cabral et al., 2009a; Cabral et al., 2009b; Crestani et al., 2010).

Entre as estratégias de melhoramento adotadas, podem ser citadas a utilização direta dos recursos genéticos, a seleção clonal explorando a variabilidade intravarietal existente e a realização de hibridações diretas entre

genitores superiores. A caracterização e a avaliação de germoplasma de abacaxi podem indicar genótipos com potencial para o uso direto pelos produtores, mas esses genótipos devem ser adaptados às condições climáticas locais e satisfazer às exigências do mercado (Cabral et al., 2000; Cabral et al., 2009).

A seleção clonal explora a variabilidade intravarietal. Essa prática consiste em selecionar as melhores plantas em uma população de uma determinada cultivar. O material selecionado é então multiplicado para obtenção de novas plantas. Outro método de seleção consiste em escolher, em uma população, uma planta que apresente características fenotípicas superiores, que será posteriormente multiplicada (Coppens d'Eenckenbrugge et al., 1993; Coppens d'Eenckenbrugge e Duval, 1995).

A hibridação direta é feita após a definição dos parentais. São feitos cruzamentos de uma variedade local e um parental que apresente uma característica desejada que se queira incorporar à cultivar local, para produção de uma progênie F1, na qual é realizada a seleção dos genótipos promissores. No ciclo, os genótipos selecionados são submetidos a três avaliações clonais para se observar a estabilidade das características. Finalmente, os melhores genótipos selecionados nas avaliações preliminares são multiplicados para avaliações posteriores, envolvendo um maior número de plantas e, se possível, em vários ambientes (Cabral et al., 1997; Cabral et al., 2003; Cabral et al., 2009a; Cabral et al., 2009b).

A maioria dos programas de melhoramento fazem cruzamentos entre grupos de abacaxi para gerar híbridos F1 viáveis para o aumento da heterose (vigor híbrido). Entretanto, o melhoramento tradicional consome muito tempo para obtenção de uma nova cultivar. Assim, os melhoristas da cultura do abacaxi têm procurado utilizar ferramentas biotecnológicas em associação ao melhoramento convencional, como, por exemplo, uso da cultura de tecidos combinado com a engenharia genética e os marcadores moleculares, buscando entre outros fatores aumentar a variabilidade genética dentro de um banco de germoplasma. Além disso, o uso de técnicas biotecnológicas permite ao melhorista a possibilidade de identificação de locos gênicos com características favoráveis e, assim, aumentar a eficiência do melhoramento genético para alguns tradicionais problemas agrônômicos da cultura, tais como resistência a herbicidas e à seca, controle da

floração e amadurecimento do fruto e, principalmente, resistência a doenças (Botella e Smith, 2008; Souza et al., 2011).

Na década de 90, marcadores isoenzimáticos foram usados com sucesso em plantas de abacaxi visando, principalmente, à identificação de cultivares resistentes à fusariose e produtivas, em estudos genéticos e taxonômico (Dewald et al., 1992; Aradhya et al., 1994; Usberti Filho et al., 1995). Em outro estudo, as relações genéticas entre diferentes cultivares de abacaxi foram determinadas por meio do marcador genético RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) por Ruas et al. (1995). Os autores observaram uma relação genética bastante similar entre quatro cultivares de abacaxizeiro - 'Pérola', 'Smooth Cayenne', 'Primavera' e 'Perolera' - e ainda verificaram compatibilidade entre os resultados obtidos por meio do marcador RAPD e as análises das características morfológicas e agrônômicas, mostrando que marcadores moleculares podem ser usados de maneira eficiente para caracterização de recursos genéticos no gênero *Ananas*.

Gottardi et al. (2001) avaliaram padrões genotípicos e similaridade dentro da cultivar Smooth Cayenne, empregando marcadores RAPD, e comprovaram a existência de elevada variabilidade genética no material 'Smooth Cayenne' cultivado no Brasil. Já Pereira e Kerr (2001), também utilizando a técnica de RAPD, determinaram a distância genética entre doze cultivares de abacaxizeiro e também verificaram que essa técnica foi eficiente para o cálculo da distância e da estimativa da diversidade genética entre os genótipos avaliados.

Carlier et al. (2010) utilizaram os marcadores RAPD, ISSR, AFLP, SSR e EST-SSR para construção de um mapa genético entre o cruzamento de *Ananas comosus* (cv. Rondon) e *Ananas comosus* var. *bracteaus*, 'Branco do mato', e relataram que esse mapa pode ser utilizado como base para estudos moleculares, genéticos e de programas de melhoramento de abacaxizeiro e outras bromeliáceas.

2.2. Micropropagação

A micropropagação é uma das tecnologias relacionadas à cultura de tecidos vegetais utilizadas para a rápida multiplicação de plantas. A micropropagação baseia-se na totipotencialidade das células e deve ser

entendida como propagação *in vitro*. Essa técnica produz mudas de alta qualidade genética, uniformes, permite o desenvolvimento de espécies que não podem ser propagadas por sementes ou macropropagação e a produção de plantas em larga escala, sendo indicada para multiplicar clones elite. A micropropagação permite a obtenção de uma grande quantidade de plantas utilizando pequena quantidade de material vegetal original, restringindo ou minimizando a limitação que a baixa oferta de mudas constitui para a expansão das culturas. Em comparação com as técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais a possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos e obter plantas livres de doenças (Souza et al., 2009a).

No entanto, o uso generalizado da micropropagação ainda continua sendo limitado nos dias de hoje, devido ao alto custo de produção. Estes custos são atribuídos principalmente a uma baixa taxa de crescimento, a uma perda significativa de mudas *in vitro* devida à contaminação microbiana e a desordens fisiológicas e morfológicas, à baixa sobrevivência na fase de aclimatização e aos altos custos trabalhistas (Xiao e Kozai, 2006; Houllou-Kido et al., 2009). A maioria dos fatores citados são direta ou indiretamente relacionados às características foto-heterotróficas ou fotomixotróficas do crescimento das mudas *in vitro* no sistema de micropropagação convencional, em que o açúcar no meio de cultura é a fonte principal ou exclusiva de carbono e energia para a planta em crescimento (Nguyen e Kozai, 2001; Khan et al., 2003; Zhang et al., 2009).

A micropropagação fotomixotrófica pode ser definida como o cultivo *in vitro* misto, ou seja, as mudas, além de incrementarem a matéria seca por meio de componentes adicionados ao meio de cultivo, também podem incrementar a matéria seca por meio da absorção do CO₂ do ar em torno do explante. Ainda, na condição fotomixotrófica, a luz é fornecida em maior intensidade, bem como a umidade relativa é menor no ambiente *in vitro*, permitindo assim um melhor crescimento e desenvolvimento das mudas (Kozai, 1989; Kozai, 1991a). Grout e Aston (1988) agruparam as plantas cultivadas em meio asséptico em duas classes. Na primeira classe, colocou as plantas cujas folhas formadas não desenvolvem capacidade fotossintética quando crescendo em meio contendo sacarose (heterotróficas) e aquelas com pouca taxa fotossintética *in vitro* (mixotróficas) e, na segunda, encontram-se as plantas adaptadas para condições

autotróficas *in vitro* que, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar uma significativa taxa fotossintética.

Na maior parte, a técnica de micropropagação convencional é realizada utilizando-se recipientes de pequeno porte com meio de cultura com ágar ou outros agentes geleificantes, contendo nutrientes minerais e sacarose como fonte de carbono para o metabolismo das plantas, um baixo fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), o qual é fornecido geralmente por lâmpadas fluorescentes, além de exigir a fase de aclimatização antes de levar as mudas para o campo (Cui et al., 2000; Dary et al., 2001; Fuentes et al., 2007).

Na micropropagação, várias etapas são definidas. O primeiro estágio é o preparo da planta-matriz para introdução do material *in vitro*, que, normalmente, é cultivado em casa de vegetação, com condições controladas. A segunda etapa é a iniciação das culturas, que consiste no estabelecimento do material vegetal *in vitro*. Nessa etapa, deve-se escolher o explante mais adequado para a introdução *in vitro*, proceder à assepsia, determinar o meio de cultura a ser utilizado inicialmente e as melhores condições na sala de crescimento para o processo de cultivo *in vitro*. A etapa seguinte, que é a multiplicação e o alongamento das brotações, consiste em promover a proliferação de brotos, aumentar o número de gemas nos explantes e promover se necessário o alongamento dos brotos. A composição e a concentração de fitorreguladores no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e citocininas são as classes de fitorreguladores mais utilizadas na multiplicação *in vitro*. Em seguida, procede-se à indução e ao desenvolvimento de raízes, que consiste em promover, se necessário, o alongamento dos brotos e o enraizamento *in vitro*. Finalmente, tem-se a fase de aclimatização, que é a transferência para condições de casa de vegetação. Nessa fase, objetiva-se assegurar a sobrevivência das mudas sob condição *ex vitro* (González-Olmedo et al., 2005).

Os primeiros trabalhos com micropropagação do abacaxizeiro foram desenvolvidos na década de 60. Na década de 70, houve uma grande redução na área cultivada de abacaxi, devido ao ataque da fusariose associado à broca do fruto, o que resultou em sérios problemas na abacaxicultura brasileira (Guerra, 1999). Desde então, vários artigos vêm sendo publicados sobre a micropropagação do abacaxizeiro, destacando-se o de Rangan (1984), que

estabeleceu um dos primeiros protocolos para o abacaxizeiro. De acordo com Souza et al. (2009a), a técnica de micropropagação está sendo utilizada para multiplicar o abacaxizeiro em grande quantidade.

A micropropagação é uma alternativa viável para a propagação do abacaxizeiro, pois produz mudas vigorosas, livres de patógenos, em larga escala, em curto período e em espaços reduzidos. As mudas podem ser multiplicadas em qualquer época do ano, proporcionando homogeneidade nos tratos culturais e colheita (González-Olmedo et al., 2005). Além disso, as mudas propagadas pela cultura de tecidos apresentam maior vigor e facilidade no transporte e plantio. Em relação aos propágulos naturais, tais atributos compensam o custo de produção mais alto das mudas micropropagadas (Lemos et al., 2001). Diante disso, muitos protocolos têm sido desenvolvidos para multiplicar as principais cultivares de abacaxizeiro (Feuser et al., 2001; Almeida et al., 2002). Esta resposta pode ser avaliada, normalmente, pela taxa média de multiplicação de brotos ao longo dos subcultivos e pelo número final de mudas micropropagadas com as mesmas características genéticas da planta matriz (Grattapaglia e Machado, 1998).

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

2.3.1. Sacarose

As mudas micropropagadas são normalmente referidas como de crescimento foto-heterotrófico ou fotomixotrófico, devido à baixa capacidade fotossintética proporcionada pelas condições *in vitro*. O fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) fornecido pelos sistemas convencionais de iluminação das câmaras de crescimento em cultivos *in vitro* é considerado muito baixo (30 a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e tal condição pode gerar um balanço negativo de carbono, requerendo, frequentemente, carboidrato como fonte de carbono e de energia, desde as fases de indução até a de enraizamento (Jo, 2009). A presença de carboidrato tem mostrado ser essencial para o enraizamento de muitas espécies *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998; Shim, 2003).

As pesquisas mostram que a fonte de carboidrato adicionado ao meio de cultura pode inibir o metabolismo fotossintético do carbono (Kozai, 1989; Kozai

1991a; Cui et al., 2000; Dary et al., 2001; Kadlecek et al., 2003; Martin, 2004; Erig e Schuch, 2005a; Xiao e Kozai, 2006; Fuentes et al., 2007).

A sacarose, que é a principal fonte utilizada na micropropagação convencional, é usada em células vegetais, tecidos e órgãos com duas principais finalidades: como fonte de carbono e como regulador de osmose celular (Thorpe et al., 2008). Por causa da baixa concentração de CO₂ no interior do frasco de cultivo fechado e do baixo (FFF) na sala de crescimento, as mudas cultivadas *in vitro* não apresentam um metabolismo fotoautotrófico, não sendo capazes de se multiplicar sem o suprimento exógeno de carboidratos (Kozai et al., 1991; Cournac et al., 1991; Debergh et al., 1992; Desjardins, 1995; Kozai e Kubota, 2001). Ao contrário, quando a sacarose está em excesso no meio de cultura, este composto pode causar desidratação celular, aumento do conteúdo de ácido abscísico endógeno e redução da taxa de multiplicação (Pierik, 1990; Hdider e Desjardins, 1994; Leite et al., 2000). Quando adicionada ao meio de cultura, a sacarose pode inibir a fotossíntese potencial *in vitro*, o acúmulo de clorofila, reduzir a atividade da Rubisco e diminuir a fixação do carbono inorgânico por meio da inibição da atividade da carboxilase do fosfoenol-piruvato e do Ciclo de Calvin como um todo (Hdider e Desjardins, 1994; Cui et al., 2000; Dary et al., 2001). Entretanto, com a exclusão total da sacarose do meio de cultivo, algumas espécies podem apresentar baixo desenvolvimento, tendo baixa multiplicação e baixo enraizamento (Vyas e Purohit, 2003). Assim, em várias espécies, a taxa de fotossíntese pode ser reduzida pela utilização de sacarose pelo explante, mesmo com o CO₂ e a luz adequados, o que torna estes cultivos fotomixotróficos (Kozai e Iwanami, 1988; Kozai et al., 1991; Kanechi et al., 1998). Debergh (1988) afirma que a redução ou até mesmo a eliminação da sacarose do meio de enraizamento deve ser utilizada com a finalidade de facilitar a passagem das mudas para o estágio fotoautotrófico na fase de aclimatização.

Estudos realizados por Nicoloso et al. (2003) demonstraram que a presença de sacarose na proporção de 30, 45 e 60 g L⁻¹, entre cinco fontes de carbono utilizadas, proporcionou maior crescimento em número de segmentos nodais, altura dos brotos, biomassa de raiz e parte aérea em *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro*. Entretanto, a necessidade de sacarose vem sendo discutida por alguns autores, pois níveis normalmente usados em cultura de tecidos podem inibir a síntese de clorofila (George e Davies, 2008). De acordo com Kozai et al.

(1991), na presença de açúcares as mudas não desenvolvem a capacidade fotoautotrófica, podendo causar crescimento reduzido e morte de mudas durante a fase de aclimatização, uma vez que tais plantas necessitam de um metabolismo fotoautotrófico quando forem postas no ambiente *ex vitro*.

Visando a facilitar a aclimatização das mudas, Gribaudo e Fronda (1993) sugerem adotar na última fase da cultura *in vitro* a diminuição da concentração de sacarose, com o intuito de promover a fotossíntese e capacitar a planta à nutrição fotoautotrófica. Segundo Langford e Wainwright (1987), a absorção de CO₂ pode ser incrementada por meio da redução gradativa da concentração de sacarose nos sucessivos subcultivos. Em vista disso, Campos e Pais (1990) utilizaram baixa concentração de sacarose (2%) no meio de enraizamento de roseiras cv. Rosamin, com o objetivo de condicionar as brotações ao estado fotoautotrófico antes do transplante. Srisankarajah e Mullins (1981) e Simmonds (1983) obtiveram melhores resultados no enraizamento de porta-enxerto de macieira, cv. Granny Smith, ao reduzir a concentração de sacarose no meio para apenas 1%. Para Wainwright e Scrase (1989), o mecanismo pelo qual a fonte e a concentração de carboidratos influenciam o processo de aclimatização das plantas ainda não está muito definido. Esses autores sugerem manter a sacarose no nível normalmente utilizado (3%), ou até mesmo aumentá-lo numa fase anterior à aclimatização, visando a melhorar a qualidade da planta. Esse condicionamento em altas concentrações de sacarose aumentaria as reservas de carboidratos armazenadas pelas folhas, aumentando, assim, a energia disponível para as plantas durante o processo de aclimatização.

A multiplicação *in vitro* de *P. glomerata* sob condições de redução em 50% da concentração de nitrogênio do meio MS e o aumento da dose usual de sacarose para 45 g L⁻¹, apenas por um subcultivo, favoreceram o crescimento em altura de brotações, o número de segmentos nodais e de brotações, bem como a produção de biomassa das plantas, pelo estímulo ao uso de carbono (Maldaner et al., 2006). Estudos preliminares realizados com *Miltonia flavescens* Lindl., uma orquídea epífita nativa da região sul do Brasil, evidenciaram o crescimento e desenvolvimento de plantas na presença de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose (Stefanello et al. 2009). Foi observado aumento na taxa de fotossíntese, em subcultivos sucessivos, quando a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g L⁻¹ para 10 g L⁻¹ (Pasqual, 2001). Embora o açúcar não seja o componente de maior

custo no preparo do meio de cultura, a redução da concentração desse composto pode ser economicamente favorável, especialmente para produção comercial de mudas (Hoffmann, 1999). Dignart (2006) obteve resultados similares para número de folhas, número de brotações e comprimento de parte aérea, em *Cattleya walkeriana* Lndl., testando as concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose.

2.3.2. Trocas gasosas

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas na verdade é o responsável pela variabilidade nas respostas das culturas. A forma de vedação empregada interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, ocasionando aumento da concentração de CO₂ e etileno dentro dos frascos se for utilizada vedação hermética e se o recipiente for de menor tamanho (Filho et al., 2002). O etileno é um gás produzido pelos tecidos vegetais e pode influenciar no desenvolvimento das culturas *in vitro*. Os efeitos desse fito-hormônio são deletérios e podem ser controlados pelo tipo de vedação dos frascos, sendo este fator mais relevante do que a composição do meio de cultura (Torres et al., 1998).

Embora um pequeno fluxo gasoso para dentro e fora do frasco de cultura de tecidos vegetais seja causado pelas variações na temperatura e pressão atmosférica na sala de cultura, a maior parte das trocas gasosas se dá por meio de difusão. A quantidade de oxigênio bem como de outras fontes gasosas disponíveis aos tecidos vegetais cultivados *in vitro* podem ser influenciadas principalmente pela concentração do gás no ambiente atmosférico, pela taxa de difusão no frasco de cultura e pela taxa de difusão para as células ou tecidos (George, 2008). Os materiais utilizados no isolamento dos frascos permeáveis aos gases, como, por exemplo, membrana microporo e filme de polipropileno, podem permitir a entrada de CO₂ no interior dos frascos pelo aumento da difusão gasosa, o que pode favorecer a fotossíntese e geralmente facilitar o processo de aclimatização (Zobayed, 2000; Gonçalves, 2008).

O déficit de CO₂ no interior dos frascos pode ser superado por métodos de ventilação forçada, sendo que a concentração de CO₂ e a circulação de ar dentro do frasco podem ser aumentadas pela injeção de uma mistura de gases. A taxa de ventilação pode ser facilmente controlada usando um controlador de fluxo

de ar (Kubota e Tadokoro, 1999; Nguyen et al., 2001). Em *Brassica oleracea*, o sistema de ventilação forçado favoreceu o crescimento de mudas mantidas *in vitro*, possibilitando maiores taxas fotossintéticas, provavelmente pela oferta adicional de CO₂ (Zobayed, 1999).

As pesquisas têm revelado que a forma do frasco também pode influenciar a difusão gasosa. Bateson et al. (1987) demonstraram que, quando comparados a frascos com maiores comprimentos e diâmetros, em frascos de igual volume em que a distância de difusão é pequena, ocorre maior crescimento da cultura.

Aparentemente, uma elevada concentração de CO₂ deveria estimular o crescimento de plantas fotoautotróficas. Contudo, nem sempre este fato é uma realidade, tendo em vista que elevados níveis de açúcares no meio podem suprimir a fixação de CO₂. Muitas plantas apresentam estômatos sensíveis a elevados níveis de açúcar, culminando em baixas concentrações de CO₂ na folha, mesmo que este gás esteja em altas concentrações no frasco. Tal fato pode comprometer a taxa fotossintética da planta mantida *in vitro* (Van Huylenbroeck et al., 2000).

Xiao e Kozai (2004) desenvolveram um sistema de micropropagação fotoautotrófico, permitindo o enriquecimento de CO₂ no ambiente *in vitro*. Os autores compararam a multiplicação *in vitro* de lírio de calla, *Zantedeschia elliptiana*, na condição de cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico e constataram que o cultivo fotoautotrófico reduziu em 50% o tempo da fase de multiplicação. Em relação ao fotomixotrófico (60%), a porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização foi maior (95%). Nesta condição fotoautotrófica, o custo de produção caiu 40%.

Bandeira et al. (2007) concluíram que, para multiplicação de *Thymus vulgaris*, tanto para o desenvolvimento da parte aérea quanto do sistema radicular, o sistema mais eficiente foi em frascos vedados com algodão, contendo meio MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose. Em contrapartida, Cuzzuol et al. (1995) observaram que a taxa de propagação foi 40% menor e o comprimento das brotações decaiu 30% nos frascos vedados com algodão, em comparação com os frascos vedados com alumínio e zap (isolante térmico).

Gonçalves et al. (2008) constataram que mudas de *Herreria salsaparilha* cultivadas em recipientes fechados com membrana de polipropileno microporoso

foram significativamente menores do que as mudas cultivadas em frasco ventilado, com menor quantidade de nós, menor peso fresco e maior peso seco. Essa condição facilitou a perda de água e aumentou a concentração de CO₂, o que possibilitou uma maior atividade fotossintética das mudas. Portanto, a concentração de sacarose ideal pode ser menor nos frascos ventilado, sendo indicados para uma cultura fotomixotrófica, resultando em mudas mais saudáveis.

2.3.3. Fluxo de fótons fotossintéticos

A intensidade luminosa necessária para a cultura de vários órgãos e tecidos difere entre os estádios da micropropagação, o tipo de explante e as diferentes espécies vegetais. Geralmente, nos estádios iniciais da micropropagação, as brotações são mantidas em uma intensidade luminosa de 5 a 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e o aumento na fase de enraizamento de 30 a 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pode beneficiar a sobrevivência das mudas transplantadas (George e Sherrington, 1984).

A distribuição do espectro de luz a partir de diferentes fontes luminosas pode variar significativamente. As lâmpadas fluorescentes brancas têm sido a principal fonte de luz utilizada em micropropagação, pois produzem uma pequena quantidade de calor e permitem uma distribuição relativamente uniforme de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos sobre os frascos de culturas mantidos nas prateleiras das salas de crescimento. Diferentes tipos de fontes luminosas, como, por exemplo, LED'S, lâmpadas Growlux, podem ser utilizadas com o objetivo de assegurar o fornecimento do comprimento de onda adequado (Erig e Schuch, 2005). Uma mistura de lâmpadas Growlux e fluorescente branca fria forneceu índices satisfatórios de proliferação de ramos em cultura de árvores frutíferas, tendo as folhas dos brotos se apresentado mais verdes (Rugini et al., 1987).

Há uma grande diferença na distribuição do fluxo de fótons entre o interior e o exterior do frasco de cultura. A distribuição do fluxo de fótons no interior dos frascos é altamente dependente do tipo de frasco e da vedação do recipiente (Aitken-Christie et al., 1995). A fonte de luz normalmente é instalada acima dos frascos de cultura e as plantas recebem iluminação descendente. Com o crescimento da cultura, grande parte de energia luminosa é interceptada pela

parte superior do frasco e apenas uma pequena quantidade de energia chega à parte inferior. A iluminação lateral permite que maior quantidade de luz seja distribuída de forma mais uniforme em todas as partes da planta, mesmo que o fornecimento da fonte de luz seja quantitativamente menor que o fornecimento acima dos frascos (Aitken-Christie et al., 1995; Kozai et al., 1997).

As plantas mantidas *in vitro*, expostas às baixas intensidades luminosas, normalmente adquirem características de plantas de sombra. Ao serem transferidas para condições *ex vitro* com maiores irradiâncias luminosas, podem sofrer estresses causados pela luz, incluindo fotoinibição ou foto-oxidação da clorofila, resultando em folhas cloróticas. Os estresses oxidativos sob condição de excesso da energia luminosa são causados pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que incluem radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), resultando em danos aos tecidos vegetais (Faisal e Anis, 2009). Entretanto, algumas espécies são mais tolerantes a maiores energias luminosas. O controle e a otimização da luz são essenciais para aumentar a taxa de sobrevivência e o desenvolvimento de novas estruturas, e diminuir o período da aclimatização (Amâncio, 1999).

Segundo Gribaudo e Fronda (1993), uma das formas que facilitariam a aclimatização seria o aumento da intensidade luminosa em condições *in vitro*, que promoveria a fotossíntese e melhoraria as relações hídricas, além de aumentar a quantidade de cera epicuticular. A intensidade de luz pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e modificar certas características, como a espessura da folha, a diferenciação do mesófilo, o desenvolvimento vascular, a divisão celular e o desenvolvimento dos estômatos. O efeito da luz no desenvolvimento do mesófilo, principalmente no parênquima paliçádico, é certamente um fator anatômico determinante.

A fluorescência da clorofila *a* tem sido usada como um indicador da eficiência fotoquímica e fotoinibição. Os níveis de fluorescência da clorofila *a* são afetados pela organização do complexo antena e pelo transporte de elétrons no aparato fotossintético. A fluorescência emitida pela molécula de clorofila permite uma avaliação não destrutiva da fotossíntese *in vivo*, fornecendo informações sobre o rendimento fotoquímico e a capacidade fotossintética, por meio da quantificação da eficiência do fotossistema II (Carvalho et al., 2001).

Em cultivo fotomixotrófico de *Actinidea deliciosa* sob alta irradiância ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Dimassi-Theriou e Bosabalidis (1996) observaram que, de maneira geral, as células do parênquima paliçádico e da epiderme adaxial foram maiores. O aumento da espessura das folhas e as células paliçádicas mais alongadas constitui um padrão clássico de resposta e adaptação das plantas à alta irradiância (Lee et al., 2000).

2.3.4. Relações hídricas

A umidade relativa do ar (UR) é uma medida da quantidade de vapor de água contido na atmosfera. A umidade relativa dentro do frasco de cultura depende da temperatura e do tipo de meio utilizado e desempenha uma função importante no crescimento e desenvolvimento de mudas micropropagadas. Quando a temperatura do ar em um frasco efetivamente fechado for igual à do meio de cultura, teoricamente pode-se considerar que a umidade relativa esteja em torno de 98-99,5%. Geralmente, a UR recomendada para salas de crescimento está em torno de 70% (George, 2008).

Normalmente, uma fase bastante crítica em cultura de tecidos é a transição das mudas que foram cultivadas em ambiente fechado e com alta umidade relativa para o ambiente externo, seja por hiperhidricidade causada pelas condições de alta umidade relativa *in vitro* ou pela pouca adaptação ao ambiente seco. Diversos fatores externos influenciam a transpiração na medida em que alteram a diferença de pressão de vapor entre a superfície da folha e o ar que a envolve. Portanto, a transpiração intensifica-se com a diminuição da umidade relativa e com o aumento da temperatura do ar (Larcher, 2000). Essa baixa adaptação ao ambiente pode ocorrer devido ao pobre controle estomático das plantas cultivadas *in vitro*, e esse pobre controle promove a perda de água em grande intensidade e causa assim redução da capacidade fotossintética pela desidratação do tecido vegetal. O grau de adaptação pode ser aumentado quando plantas são mantidas em condições de umidade reduzida antes da transferência para o ambiente *ex vitro*. Contudo, em ambientes de cultivo *in vitro*, o crescimento da parte aérea e a capacidade de enraizamento podem diminuir progressivamente à medida que se reduz a umidade relativa em grande intensidade (Short et al., 1987).

A umidade relativa do ar na sala de cultura também pode afetar o desenvolvimento vegetal *in vitro* e influenciar a escolha do tipo de tampa a ser utilizada nos frascos. As tampas porosas permitem trocas gasosas e são ideais para culturas fotoautotróficas, quando o meio é isento de carboidratos (George e Davies, 2008). Entretanto, quando a umidade relativa do ar é muito baixa, tornam-se necessárias subculturas muito frequentes, inviabilizando a produção do ponto de vista econômico. Por outro lado, umidade relativa do ar elevada aumenta as chances de contaminação por fungos nas culturas e, nesses casos são utilizadas tampas bem vedadas que, apesar de garantirem maior segurança contra contaminações, prejudicam o desenvolvimento na medida em que impedem a saída de gases do frasco, inclusive vapor d'água originado da evapotranspiração. Ao se acumular dentro do frasco de cultivo, o vapor de água torna a atmosfera dentro do vidro extremamente úmida (George, 2008). Em regiões tropicais úmidas, utilizam-se desumificadores para minimizar contaminações fúngicas nas culturas (Seabrook, 1980).

Aragón et al. (2010), trabalhando com a cultura do abacaxi sob condições fotomixotróficas em biorreatores de imersão temporária (BIT) (teor de sacarose 30 g L^{-1} , $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade de luz e $1200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de concentração de CO_2), em comparação ao método de micropropagação tradicional (baixo FFF e sem incremento de CO_2), obtiveram mudas com melhor qualidade, melhor assimilação fotossintética do carbono e maior porcentagem de sobrevivência durante a aclimatização (99,80%). Em outro trabalho, estes autores relataram que o cultivo de bananeira sob condições fotomixotróficas (FFF $30 - 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 30 g L^{-1} de sacarose) melhorou a capacidade de multiplicação dos explantes, além de ter superado o estresse durante a transição para as condições *ex vitro* (Aragón et al. 2005).

2.4. Aclimatização de plantas

O sistema convencional de aclimatização consiste em transplantar as mudas cultivadas *in vitro* para recipientes em ambiente controlado, mantendo a umidade relativa do ar elevada e a luminosidade reduzida por um curto período de tempo, para que as mudas se adaptem progressivamente às novas condições de

crescimento. Após esse período, ocorre uma gradual redução da umidade e um aumento da densidade de fluxo de fótons (Kozai, 1991b; Amâncio et al., 1999).

A perda de vigor e a subsequente morte devidas ao dessecamento são dois sérios problemas que ocorrem com mudas transferidas das condições *in vitro* para casa de vegetação, não sendo, no entanto, os principais fatores da baixa sobrevivência de determinadas espécies. A mudança do metabolismo heterotrófico para o autotrófico é outro fator envolvido que deve ser considerado. As mudas provenientes do cultivo *in vitro* são de pequeno tamanho (menos de 5 cm) quando transplantadas, de modo que necessitam aumentar entre 10 a 20 vezes o seu tamanho durante a aclimatização, antes de serem transferidas ao viveiro. Além disso, as raízes formadas *in vitro* podem não ser funcionais quando transplantadas e, sendo assim, novas raízes têm que se desenvolver e se tornar aptas para absorver água do substrato (Amâncio et al., 1999; Aragón et al., 2005).

Zhang et al. (2009) relatam a necessidade da aclimatização das mudas provenientes da cultura de tecidos, pois mudas obtidas *in vitro* são sensíveis e tenras, uma vez que não desenvolvem a cutícula, resultando em alta transpiração, além de a parede celular não apresentar rigidez suficiente para a sustentação, as folhas são delgadas, fotossinteticamente inativas, os estômatos não operam eficientemente, causando, assim, estresse hídrico nos primeiros dias após a retirada das mudas dos frascos. Por essas razões, a etapa de transplante é de extrema importância para evitar a desidratação a que as mudas estão submetidas nesse processo. Em condições *in vitro*, os estômatos não são totalmente funcionais, permanecendo abertos a maior parte do tempo devido à elevada umidade dentro dos recipientes. Além disso, a camada de cera que recobre a epiderme é mínima ou inexistente, não constituindo uma proteção eficiente contra a desidratação. Para agravar o quadro, mudas micropropagadas podem ter conexões vasculares deficientes, o que contribui para reduzir o transporte de água no seu interior (Carvalho et al, 2001; Valero-Aracama et al., 2007).

A aclimatização é limitante para a maior parte das espécies micropropagadas pela alta taxa de mortalidade. O sucesso da aclimatização depende, em grande parte, da capacidade da planta de passar da condição heterotrófica ou mixotrófica para a autotrófica; dos fatores abióticos umidade relativa, temperatura, luminosidade, substratos, entre outros; dos fatores bióticos pragas e doenças; e da presença ou capacidade das mudas de produzir novas

raízes (Hazarika, 2006). O processo de aclimatização auxilia as mudas provenientes do cultivo *in vitro* a atingir a taxa fotossintética adequada da espécie. A eficiência no processo de aclimatização poderia ser aumentada com a estimulação da formação de maior quantidade de raízes em plantas crescidas *in vitro*, o que possibilitaria o aumento da absorção de água, compensando a perda de água devida à pequena espessura da cutícula no início do processo (Carvalho et al., 2002).

Os resultados apresentados por Hoffmann et al. (2001) para macieira demonstram que a sobrevivência das mudas entre 7 e 21 dias da aclimatização caiu de 100 para 85%, em virtude do estresse na transferência das plantas do laboratório para a casa de vegetação. Porém, esses autores também observaram que, nos últimos dias do período de aclimatização, a sobrevivência manteve-se inalterada, indicando uma tendência à estabilização a partir dos 28 dias. Há autores que sugerem que ocorre uma queda drástica na sobrevivência das mudas em torno de duas semanas após o início da aclimatização, mencionando que este fato é causado pela baixa eficiência na troca do metabolismo heterotrófico para o autotrófico (Hoffmann et al., 2001).

Antes de a muda ser levada para a aclimatização, deve ser feita a lavagem da parte aérea e das raízes, eliminando qualquer possível resíduo de meio de cultura. A sacarose e outros nutrientes presentes no meio de cultura podem favorecer o desenvolvimento de alguns fitopatógenos, bem como são extremamente atrativos para pragas (Taveira, 2010).

A irrigação é uma prática de suma importância no processo de aclimatização, já que a água é um dos fatores que mais limitam a produção das mudas, além de controlar a umidade relativa do ambiente. O manejo de irrigação, mais especificamente a frequência de aplicação da água, é de fundamental importância para o estabelecimento e para o adequado crescimento de mudas micropropagadas em condições de aclimatização, pois irrigações excessivas ou deficientes costumam afetar negativamente o desenvolvimento vegetal. As irrigações muito frequentes com lâminas reduzidas costumam molhar somente alguns centímetros da camada superficial do substrato, facilitando maior perda de água pelo processo de evaporação e prejudicando o sistema radicular das mudas, haja vista que o crescimento das raízes pode ser limitado à porção superficial do substrato (Farias e Saad, 2005; Bomfim et al., 2011; Faria et al., 2012).

Entre os diversos componentes do ambiente, o controle da luminosidade é primordial para o crescimento das mudas, fornecendo sinais que regulam o desenvolvimento. Dessa forma, as modificações nos níveis de irradiância podem condicionar diferentes respostas fisiológicas das plantas relacionadas às características bioquímicas, anatômicas e de crescimento. Diante do exposto, devem ser minimizadas as diferenças entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* no início da aclimatização para favorecer às mudas *in vitro* uma transição favorável para o mecanismo fotoautotrófico durante a aclimatização (Braga et al., 2011). A redução da intensidade luminosa utilizando telas de sombreamento pode ser feita de diversas maneiras, por meio do uso de plástico, sombrite, mantas aluminizadas etc., e o importante é que a luz não cause estresse às plantas (Taveira, 2010).

O tempo de aclimatização e o desenvolvimento da muda até o ponto de ir a campo vão depender de uma série de fatores, dos quais o de maior importância é o tipo de cultivar, podendo se estender por até cinco meses para o abacaxizeiro. A fase de aclimatização em casa de vegetação sob condições controladas leva aproximadamente três meses, desde que as condições ambientais de luz, temperatura e umidade sejam favoráveis, caso contrário, esse fatores podem prejudicar o crescimento das mudas, retardando o tempo para disponibilizá-las ao produtor. O desenvolvimento inicial costuma ser lento, mas o pegamento das mudas pode não apresentar problemas e, na maioria das vezes, as taxas de sobrevivência podem chegar a 100% (Souza et al., 2009a).

A etapa de aclimatização, da mesma forma que quaisquer outras etapas da produção das mudas *in vitro*, apresenta características que lhe são peculiares e que podem influenciar ou não os resultados da utilização de uma nova técnica. Para o abacaxizeiro, a utilização da micropropagação em larga escala depende do desenvolvimento e, ou da adequação de técnicas que visem a uma multiplicação e aclimatização mais adequadas, eficientes e de baixo custo.

3. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi otimizar a micropropagação do abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico', avaliando as variações entre esses genótipos relacionadas à capacidade fotossintética, às relações hídricas, ao estado nutricional e ao crescimento, nas condições de cultivo *in vitro* e durante a aclimatização (*ex vitro*), em resposta à utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em Campos dos Goytacazes – RJ, latitude 21° 44'47"S, longitude de 41° 18'24" O. O experimento de cultivo *in vitro* foi desenvolvido na Unidade de Pesquisa em Ecofisiologia/Fotossíntese de Plantas *in vitro*, situada no Setor de Fisiologia Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal – LMGV/CCTA/UENF, e o experimento de aclimatização, em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa – UAP/CCTA/UENF.

4.1. Experimento de cultivo *in vitro*

Foram utilizados duas cultivares de abacaxizeiro (*Ananas comosus L.*), a cv. Vitória e a cv. IAC Fantástico.

As brotações de abacaxizeiro cultivar Vitória foram provenientes do Laboratório BIOMUDAS, de Venda Nova do Imigrante – ES, no estágio de 3º subcultivo, sendo o 4º subcultivo realizado no Laboratório de Fitotecnia – LFIT. As brotações da cultivar IAC Fantástico foram provenientes da SBW do Brasil Agrifloricultura, em Holambra – SP, em último estágio de subcultivo.

O meio de multiplicação utilizado para a cv. Vitória nessa etapa foi o MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 4,4 µmol L⁻¹ de BAP (benzilaminopurina), solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec[®], pH ajustado para 5,7 e autoclavado por 20 minutos a 1,0 atm e 121 °C. A sala de cultivo foi mantida a 27

± 2 °C, com fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro), com fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecido por lâmpadas fluorescentes (OSRAM®), luz do dia).

Para a montagem do experimento, as brotações das duas cultivares foram retiradas dos frascos e, sob condições de câmara de fluxo laminar, separadas e selecionadas, sendo mantidas as mais vigorosas. Posteriormente, foram retiradas as folhas com um corte transversal próximo à base das brotações, e em seguida foram colocadas cinco brotações em cada frasco do tipo 'baby food' contendo 40 mL de meio de cultura. Estes 40 mL foram preparados utilizando o meio para o enraizamento das brotações, composto pelos sais de MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ANA (ácido naftaleno acético), solidificado com 8 g L^{-1} de ágar bacteriológico Vetec®, pH ajustado para 5,7 e autoclavado por 20 minutos a 1,0 atm e 121 °C. Neste meio MS, foi adicionada sacarose nas concentrações de 15 e 30 g L^{-1} .

Para as duas cultivares, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições, com cinco plantas por repetição, em um esquema de parcelas sub subdivididas, tendo nas parcelas dois tipos de luz (lâmpadas fluorescentes brancas, OSRAM® luz do dia especial e lâmpadas vermelhas SCT® T8-GL), nas sub-parcelas, dois tipos de frascos de cultivo *in vitro* (fechado e ventilado) e nas sub sub-parcelas, duas concentrações de sacarose (15 e 30 g L^{-1}). A unidade experimental foi constituída de um frasco de vidro grande (2,2 L), e, neste frasco, foram colocados quatro frascos menores do tipo "baby food" sem tampa. A unidade experimental foi constituída de um frasco grande com quatro menores - dois frascos 'Vitória' e dois frascos 'IAC - Fantástico', um com 15 g L^{-1} e outro com 30 g L^{-1} , respectivamente.

O sistema ventilado adotado foi proposto por Campostrini et al. (1999), conforme a Figura 1. O fluxo de ar injetado no frasco de cultura ventilado foi de aproximadamente 15 mL min.^{-1} , com uma concentração de CO_2 em torno de 380 ppm. O ar foi proveniente do meio externo ao laboratório. O ar foi borbulhado para um frasco com água desionizada para ser umidificado antes de entrar no frasco distribuidor, onde foi colocado um sensor automático de umidade relativa e temperatura (Spectrum Technologies, Illinois, USA) que foram registradas a cada 30 minutos. Na vazão de 15 mL min.^{-1} , o ar do frasco de cultivo de 2,2 L era

renovado a cada 2,45 horas. No sistema fechado, os frascos maiores (2,2 L) foram hermeticamente fechados com tampa e filtro de PVC, sem nenhuma troca gasosa com o ambiente externo.

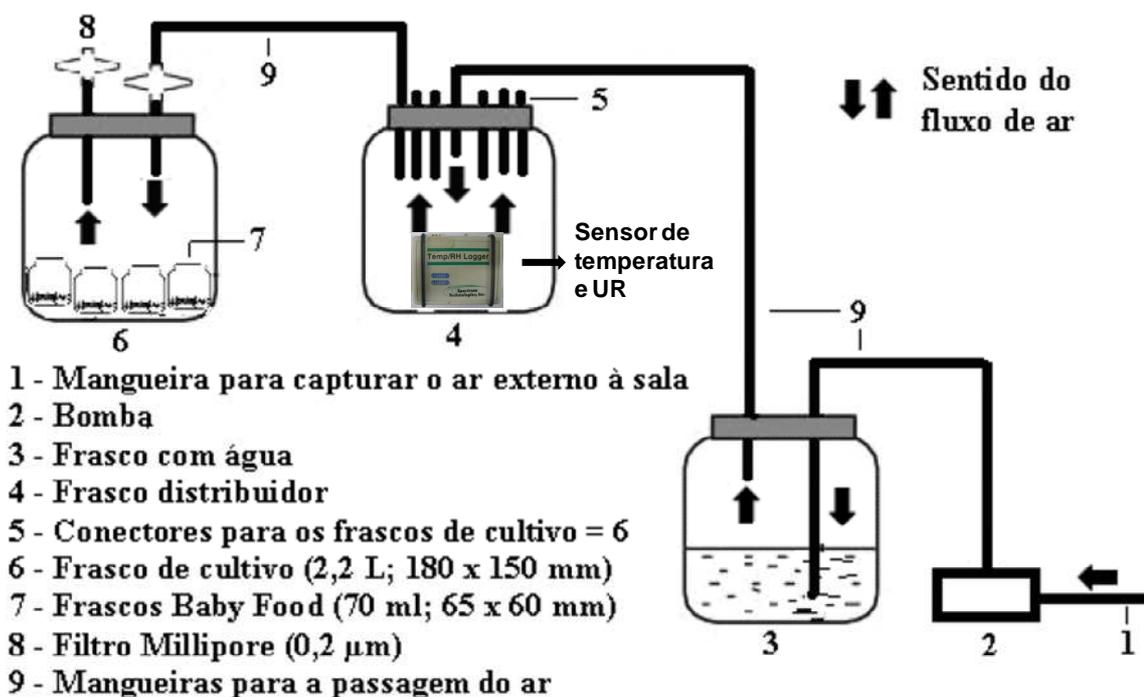


Figura 1 – Esquema de funcionamento do sistema de circulação forçada de ar (sistema ventilado) para o cultivo de plantas *in vitro*.

A partir da imposição dos tratamentos, a sala de cultivo foi mantida a 27 ± 2 °C, com temperatura média de 25,6 °C, e umidade relativa média de 76,6%, fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro), com fluxo de fótons fotossintéticos das lâmpadas brancas de $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e das lâmpadas vermelhas de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O déficit de pressão de vapor do ar (DPV) foi calculado segundo equação proposta por Jones (1992), e a média foi de 1,17 KPa (Figura 2). A avaliação da distribuição do espectro da radiação luminosa emitida pelas lâmpadas foi feita com auxílio do aparelho Ocean Optics® (USB 2000+RAD, USA) (Figura 3).

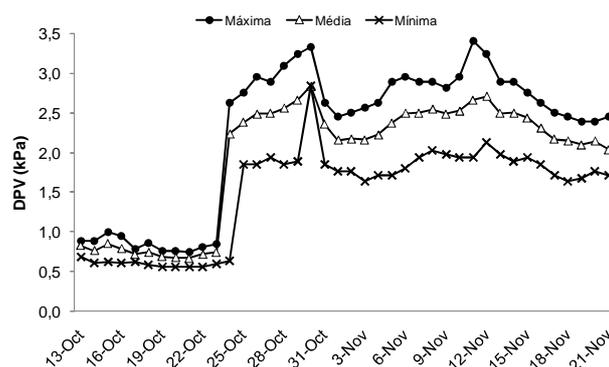


Figura 2 - Déficit de pressão de vapor do ar (DPV) máximo, médio e mínimo dentro durante o cultivo *in vitro*. Os pontos das curvas representam a média diária ao longo do tempo.

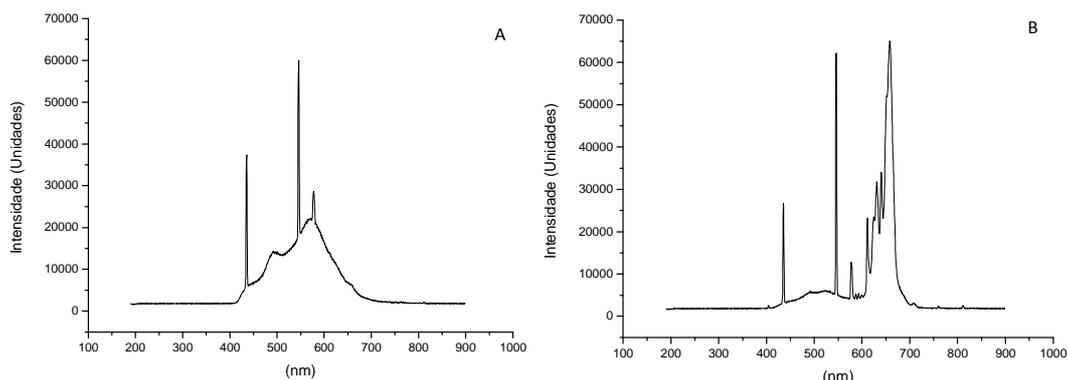


Figura 3 – Distribuição do espectro luminoso. (A) Luz branca e (B) luz vermelha.

A Figura 2 mostra variação do DPV causada pelo problema de funcionamento do ar condicionado da sala de cultivo.

Aos 40 dias após a imposição dos tratamentos (DAT) *in vitro*, em 50% das mudas dos tratamentos utilizados no experimento foi feita avaliação com três unidades experimentais para cada cultivar. A outra metade das mudas foi levada para a aclimatização em casa de vegetação (condição *ex vitro*) e neste local foram avaliadas as trocas gasosas, a eficiência fotoquímica e as medidas biométricas, exceto para a taxa de perda de água e o teor relativo de água.

4.2. Experimento de aclimatização

Aos 42 DAT, a metade das mudas provenientes do experimento *in vitro* foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido de 200 células com aproximadamente 15 cm³ por célula, e o substrato utilizado foi o Vivatto[®] para a aclimatização.

Nesse processo, as mudas das cultivares Vitória e IAC Fantástico foram retiradas dos frascos e as raízes, lavadas para remoção do meio de cultura.

O experimento manteve o mesmo esquema experimental utilizado no cultivo *in vitro*, de modo que se verificassem os efeitos dos tratamentos *in vitro* durante a fase de aclimatização das mudas. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três repetições e cinco mudas por parcela, correspondendo às cinco mudas de cada frasco “baby food”.

No primeiro mês, as mudas foram irrigadas de duas a três vezes ao dia, dependendo da umidade do substrato. A irrigação foi feita até a saturação do substrato, observada pelo início do escoamento de água das células, momento em que era cessada a irrigação. A partir do segundo mês, a irrigação passou a ser feita duas vezes ao dia, seguindo os mesmos critérios. Quinze dias após o transplante, todos os tratamentos passaram a ser adubados semanalmente com 5 mL da solução nutritiva proposta por Ramos et al. (2011), com a seguinte composição (mg L⁻¹): N(NO₃⁻)=112; N(NH₄⁺)=3,5; P=7,74; K=156,4; Ca=80; Mg=24,3; S=32,0; Cl=1,77; Mn=0,55; Zn=0,13; Cu=0,03; Mo=0,05; B=0,27; Fe-EDTA=2,23, pH=5,5.

As condições ambientais da casa de vegetação - temperatura, fluxo de fótons fotossintético e umidade relativa - foram monitoradas, e as coletas dos dados foram feitas em intervalos de 30 minutos durante todo o experimento. Para temperatura e umidade relativa, foi utilizado o Data Logger HOBO[®], e para o fluxo de fótons fotossintéticos, o Data Logger WatchDog[®]. A intensidade luminosa média foi de 380,28 μmol m⁻² s⁻¹, a temperatura média, de 26,60 °C, o déficit de pressão de vapor do ar médio, de 1,53 Kpa, e a umidade relativa média, de 75,80% (Figura 3).

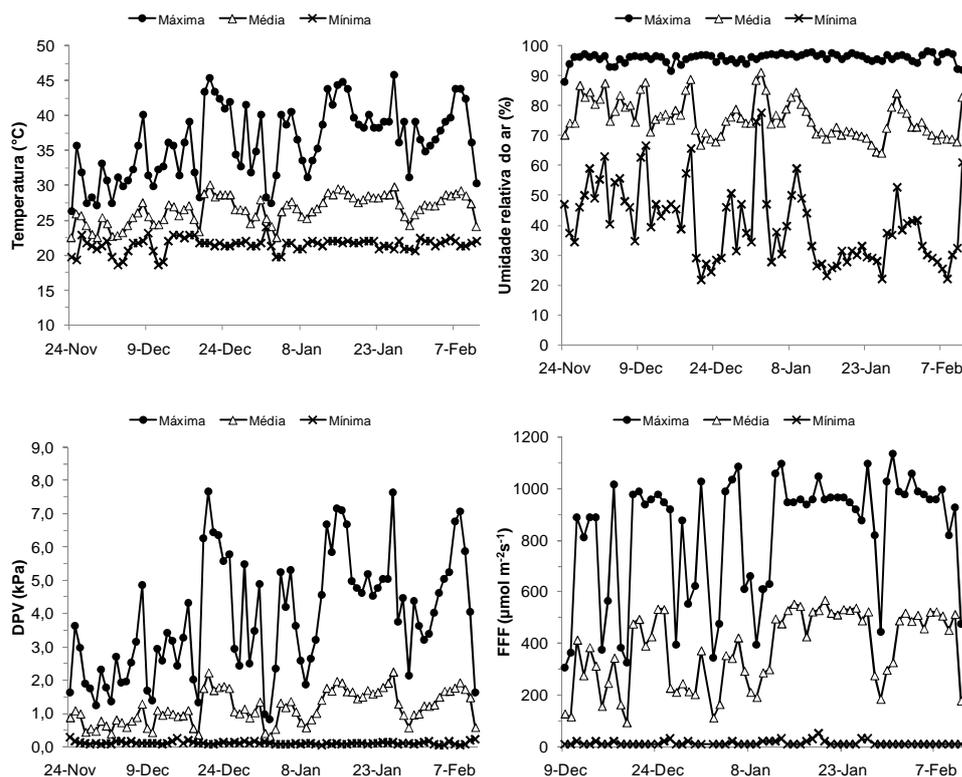


Figura 4 - Temperatura, umidade relativa, fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) e déficit de pressão de vapor do ar (DPV) máximo, médio e mínimo dentro da casa de vegetação. Os pontos das curvas representam a média diária ao longo do tempo.

Aos 30, 60 e 75 dias de aclimatização, foram feitas avaliações biométricas e as relacionadas com a capacidade fotossintética e, aos 60 e 75 dias, foi feita também a avaliação nutricional das mudas.

Aos 30 dias, não foi possível utilizar o aparelho IRGA 6200, pois as mudas ainda não tinham o tamanho ideal para fazer a medida. Aos 60 e 75, foram feitas análises destrutivas das mudas, em uma e duas bandejas, respectivamente.

4.3. Avaliações

4.3.1. Avaliações de crescimento ou biométricas

No experimento *in vitro* e *ex vitro* foram feitas medidas da altura da roseta - determinada medindo-se a partir da base da planta até a ponta da folha mais

ereta e central, com auxílio de uma régua milimetrada; do diâmetro da roseta - determinado medindo-se as folhas mais opostas das mudas com auxílio de um paquímetro modelo X, São Paulo; do número de folhas - determinado mediante a contagem total de folhas por muda; e da massa da matéria fresca - determinada por meio de pesagem individual da muda em balança analítica. Para a massa da matéria seca, efetuou-se a secagem das mudas em estufa a 70 °C por 48 horas e, após, procedeu-se à pesagem individual em balança analítica.

Na fase *in vitro*, a taxa de perda de água foi determinada segundo a metodologia proposta por Eliasson et al. (1994), em que é retirado um pedaço de tamanho conhecido e medida a massa da matéria fresca (MF) em uma balança analítica, em intervalos de 30 minutos, até que a massa se estabilize. As medidas foram efetuadas em bancada do laboratório com médias de temperatura de 25,03 °C e 79,43% UR e DPV médio de 0,65 KPa. Finalizadas as determinações da massa da matéria fresca das folhas, elas foram colocadas em estufa a 70 °C por 48 h para determinação da massa seca (MS). A taxa de perda de água foi calculada segundo a equação $TPA = \left[\frac{(MF - MX) (MF - MS) - 1}{100} \right]$, em que MF corresponde à massa da matéria fresca inicial, MX corresponde à massa da matéria fresca a cada trinta minutos entre as medições e MS corresponde à massa seca. A massa foliar específica foi obtida pela razão entre a massa da matéria seca de uma folha e a respectiva área desta mesma folha, em $g\ m^{-2}$. No laboratório, o teor relativo de água foi obtido pela equação $TRA = \left[\frac{(MF - MS)}{(Msat - MS)} \right] \times 100$, em porcentagem, em que MF é a massa da matéria fresca e Msat é a massa da matéria fresca saturada. A obtenção da Msat foi feita pela imersão em água de discos foliares de áreas conhecidas, por um período de 24 horas, no escuro. A MS é a massa da matéria seca dos discos foliares obtida por pesagem do material a 70 °C por 48 h, até peso constante.

Na casa de vegetação, na análise destrutiva, as mudas foram separadas em parte aérea e raiz. A área foliar foi estimada utilizando o aparelho LI-3100 (LICOR, Lincoln, NE, USA). O volume de raiz foi medido pelo deslocamento de água com auxílio de uma proveta de 20 mL. Para a massa da matéria seca das folhas e raízes, efetuou-se a secagem em estufa a 70 °C e depois foram pesadas em balança analítica.

4.3.2. Avaliações da capacidade fotossintética

Tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, para a determinação da capacidade fotossintética das mudas foram feitas avaliações relacionadas à eficiência fotoquímica e às trocas gasosas. Na avaliação da eficiência fotoquímica, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m), o *photosynthetic index* (PI) ($PI = RC/ABS \times F_v/F_0 \times ET/(TR-ET)$), foi determinado na folha mais desenvolvida por meio do fluorímetro não-modulado, modelo *Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter* (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk). Durante as medidas, foi utilizada uma pinça para adaptação dos cloroplastos ao escuro, para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos” e a perda de calor fosse mínima (Strasser et al, 2000; Strauss et al., 2006). As medidas foram realizadas entre 08:00 e 12:00 horas.

Nas mudas recém-retiradas da condição *in vitro*, a taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram determinadas colocando-se uma planta inteira na câmara de 250 mL do medidor portátil de trocas gasosas LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Antes de colocar as mudas na câmara, elas foram rapidamente pesadas para que a unidade de CO_2 assimilada ou liberada fosse expressa em unidades de massa da matéria fresca. As medições foram feitas em condições de laboratório, utilizando luz artificial por meio de LEDs vermelhos a uma intensidade de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Em casa de vegetação, as medições das trocas gasosas - taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV) - foram feitas com o mesmo equipamento utilizado nas avaliações das mudas recém-retiradas da condição *in vitro*. Nas mudas cultivadas em casa de vegetação, as medições da taxa fotossintética líquida foram feitas em uma parte central da folha mais desenvolvida da muda. Durante as medições das trocas gasosas, as mudas cultivadas em casa de vegetação estavam com 60 e 75 dias após o transplante (DAT). Aos 60 e 75 DAT, as medições da taxa fotossintéticas nestas mudas foram feitas entre 7 e 10 horas, a uma intensidade de luz de $1173,50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (60 dias) e $1443 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (75 dias). Aos 75 DAT, foram feitas medições noturnas entre 20:30 e 23:30 horas para verificar se as mudas apresentavam um metabolismo do tipo CAM, uma vez que na condição ambiental de alta

temperatura e alta demanda transpiratória em que as mudas estavam, elas não haviam apresentado fotossíntese até as 10 horas.

Tanto no laboratório quanto na casa de vegetação, a estimativa de intensidade de cor verde foi avaliada por meio do medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter (Minolta, Japão). Foram feitas três leituras em cada folha amostra. Foi escolhida a folha mais desenvolvida para a realização das medições.

4.3.3. Avaliação nutricional

Após a determinação da massa da matéria seca, toda a parte aérea das mudas de abacaxizeiro foi triturada em almofariz. Foram feitas amostras constituídas de três mudas (repetições) por tratamento para as duas épocas de análise. Foram pesados 100 mg de cada amostra.

O material triturado foi submetido à oxidação por meio da digestão sulfúrica (H_2SO_4 e H_2O_2), obtendo-se um extrato onde foram determinados os teores de macronutrientes. O N foi determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). O P foi determinado colorimetricamente pelo método azul de molibdato (Malavolta et al., 1997) por espectrofotometria, e o K, por meio da espectrofotometria de emissão de chama. Os nutrientes Ca e Mg foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (aparelho Zeiss AAS4).

4.4. Análise estatística

Para o experimento de cultivo *in vitro*, os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias referentes às interações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo de taxa de perda de água, foi efetuada análise de regressão.

Para o experimento de aclimatização, os dados foram analisados de acordo com o período (30, 60 ou 75 dias), tendo em cada período os dados sido submetidos à análise de variância, e as médias referentes às interações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 30 dias de aclimatização, as avaliações fisiológicas e de crescimento foram feitas considerando três repetições, cada repetição representada por cinco plantas, ou seja, uma repetição por bandeja.

Aos 60 dias, as avaliações de crescimento e as fisiológicas medidas pelo *POCKET PEA* foram feitas considerando as três repetições (três bandejas). Para as medidas estimadas pelo *IRGA 6200*, como era preciso retirar as mudas da bandeja, foi feita uma análise destrutiva das mudas de uma bandeja toda. Para a essa bandeja, as cinco mudas foram consideradas cinco repetições.

Aos 75 dias, como existiam duas bandejas, as avaliações de crescimento e as estimadas pelo *POCKET PEA* foram feitas considerando as cinco mudas de cada bandeja como cinco repetições, totalizando 10 repetições. As medidas do *IRGA 6200* foram feitas em dois períodos, diurno e noturno, cada período representado por uma bandeja. Para essa análise, foram consideradas as cinco mudas de cada bandeja, ou seja, cinco repetições.

A análise nutricional foi feita aos 60 e 75 dias de aclimatização. Essa análise foi feita em três mudas (três repetições) de cada tratamento das duas cultivares, e nos dois períodos, 60 e 75 dias.

Estas análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software *SAS*[®] (*SAS INSTITUTE*, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento *in vitro*

Para cada cultivar de abacaxizeiro, foi feita análise de variância (ANOVA), objetivando verificar quais fatores foram significativos. A partir desta análise, constatou-se que, independentemente do tipo de cultivar, o fator sacarose foi o que não apresentou significância para nenhuma das variáveis analisadas (dados não mostrados). Posteriormente, esse fator foi desconsiderado, e realizou-se uma ANOVA considerando a parcela como luz, tipo de frasco de cultivo como subparcela e a cultivar como sub subparcela (Quadro 1). O Quadro 1 mostra diferenças significativas somente para algumas interações.

Quadro 1 – Resumo da análise de variância dos fatores luz, tipo de frasco e cultivar com as interações em abacaxizeiro, aos 40 dias de cultivo *in vitro*

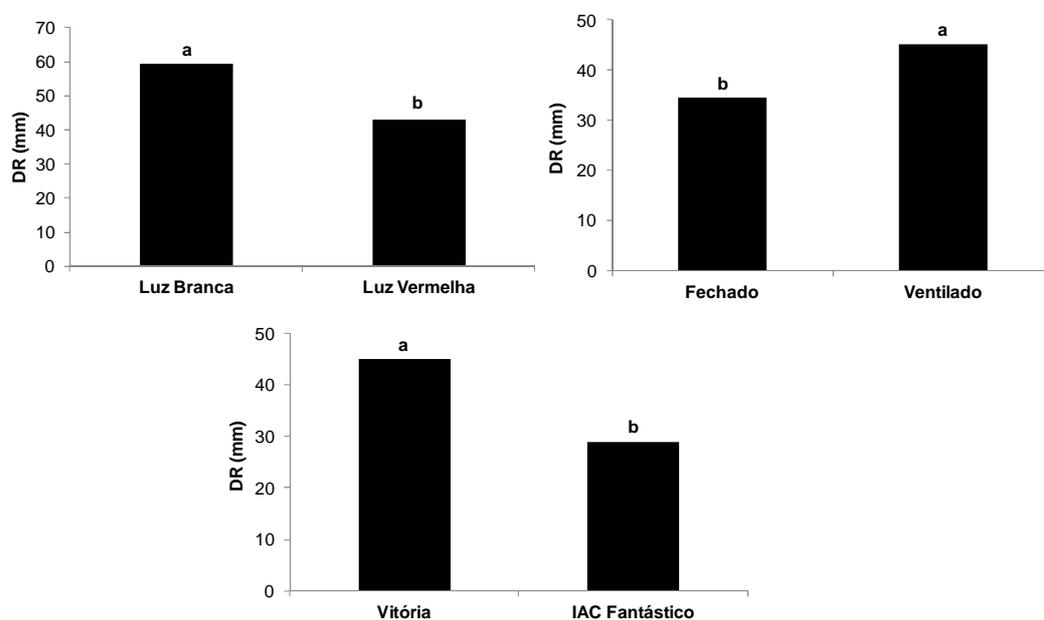
Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio						
		DR	AR	NF	MFT	MST	MFE	TRA
Luz	1	44347,52**	12870,75**	5,40 ^{ns}	0,18**	0,40**	2,09 ^{ns}	950,12**
Resíduo a	4	8031,67	613,80	0,91	0,18	0,45	1,27	70,39
Frasco	1	139644,2**	72852,08**	0,35 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,24 ^{ns}	3,02 ^{ns}	699,05**
Luz x Frasco	1	6840,18 ^{ns}	80,08 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,21 ^{ns}	384,59 ^{ns}
Resíduo b	4	2329,63	1483,98	1,36	0,17	0,75	1,05	106,58
Gen	1	375063,50**	263440,30**	2,34 ^{ns}	2,69**	0,27**	0,19 ^{ns}	86,55 ^{ns}
Luz x Gen	1	2992,52 ^{ns}	2700,00 ^{ns}	2,61 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,39**	0,60 ^{ns}	0,30 ^{ns}
Frasco x Gen	1	16613,52 ^{ns}	16428,00 ^{ns}	0,85 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,25**	0,77 ^{ns}	0,51 ^{ns}
Luz x Frasco x Gen	1	93,52 ^{ns}	2883,00 ^{ns}	2,34 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,26 ^{ns}	0,38 ^{ns}	100,01 ^{ns}
Resíduo c	8	6508,92	4869,36	1,60	0,29	0,72	0,74	133,34
Total	23							
CV Luz		20,12	31,74	10,12	27,27	72,25	65,12	10,25
CV Frasco		20,14	29,74	15,12	25,75	52,66	53,84	15,52
CV Gen		20,21	36,08	14,07	27,05	40,42	44,07	16,81
MÉDIA		399,06	193,38	8,99	0,66	0,62	1,95	68,66

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio						
		SPAD	F _v /F _m	PI	AREA	RC/ABS	A	E
Luz	1	617,91**	0,13**	0,12**	0,31**	0,57 ^{ns}	58,84**	0,13 ^{ns}
Resíduo a	4	11,40	0,26	0,47	0,85	0,39	1,12	0,40
Frasco	1	4,06 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,86 ^{ns}	6,34 ^{ns}	0,43 ^{ns}
Luz x Frasco	1	0,90 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,69 ^{ns}
Resíduo b	4	17,00	0,17	0,10	0,19	0,16	3,86	0,64
Gen	1	2442,73**	0,15**	8,13**	0,39**	0,51**	410,61**	2,08**
Luz x Gen	1	142,89**	0,24**	1,54**	0,23**	0,17**	11,14 ^{ns}	0,24 ^{ns}
Frasco x Gen	1	128,83**	0,31 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,75 ^{ns}	2,72 ^{ns}	0,50 ^{ns}
Luz x Frasco x Gen	1	1,52 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,11 ^{ns}	6,91 ^{ns}	0,17 ^{ns}
Resíduo c	8	25,88	0,27	0,18	0,24	0,18	9,09	0,93
Total	23							
CV Luz		28,18	33,33	28,48	28,70	39,00	22,81	58,82
CV Frasco		42,02	21,79	6,06	64,16	16,00	78,61	94,11
CV Gen		12,57	2,12	25,91	16,70	13,65	61,35	44,55
MÉDIA		40,45	0,78	1,65	296090	1,00	- 4,91	0,68

ns - Não significativo. ** ; * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) – Coeficiente de Variação, Gen – Genótipo, Diâmetro da roseta - DR (mm), Altura da roseta - AR (mm), Número de folhas - NF, Massa da matéria fresca total - MFT (g), Massa da matéria seca total - MST (g), Massa foliar específica - MFE, Teor relativo de água - TRA (%), Intensidade do verde - SPAD, Rendimento quântico máximo do fotossistema II - F_v/F_m, Índice Fotossintético - PI, Área sob a curva da fluorescência que estima o tamanho do 'pool' de plastoquinona do fotossistema II - AREA, Eficiência na absorção de luz pelo PSII - RC/ABS, Fotossíntese - A (μmol CO₂ kg⁻¹ s⁻¹), e Transpiração - E (mmol kg⁻¹ s⁻¹).

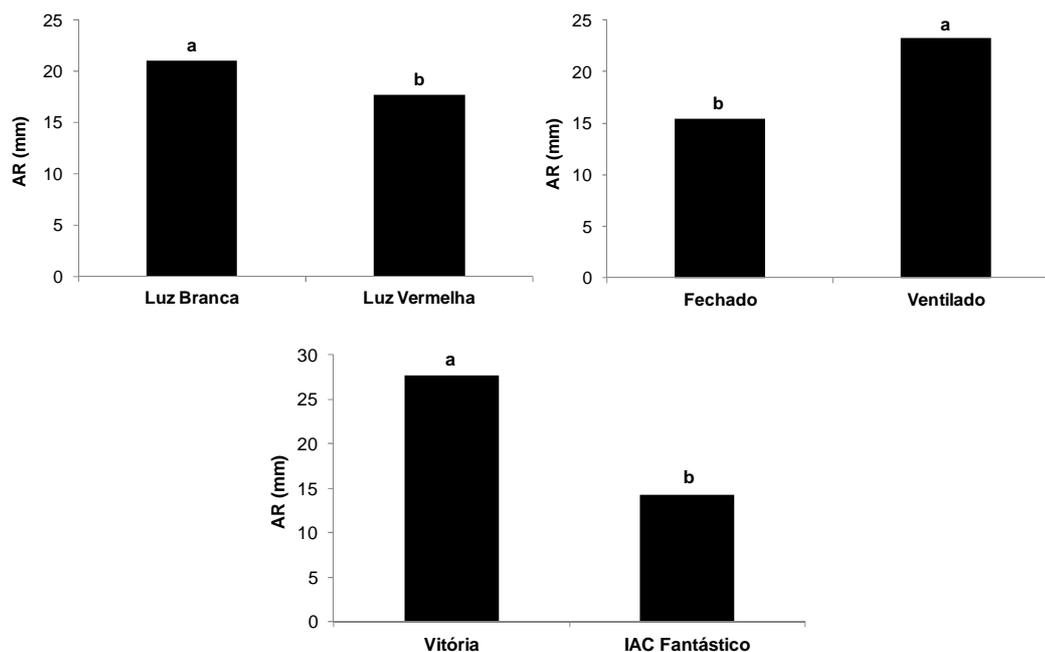
A análise de variância mostra que houve interações significativas para as variáveis MST, SPAD, F_v/F_m , PI, AREA e RC/ABS, indicando diferenças significativas. Para as demais variáveis, foram constatadas diferenças significativas relacionadas à luz, ao tipo de frasco de cultivo e ao genótipo. As variáveis NF e MFE não apresentaram diferença significativa.

Quanto às variáveis DR e AR, observa-se que a cv. Vitória apresentou maior valor do que a cv. IAC Fantástico, diferenciando-se quanto ao tipo de luz e frasco. Observa-se que luz branca e frasco ventilado foram superiores (Figuras 5 e 6).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 5 – Diâmetro da roseta em mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo *in vitro*.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 6 – Altura da roseta em mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo *in vitro*.

As mudas da cv. Vitória apresentaram maior acúmulo de biomassa *in vitro* do que as mudas da cv. IAC Fantástico, o que pode ser observado pelos maiores valores de MFT e MST (Figura 7). Os maiores valores referentes às variáveis foram encontrados na luz branca para MFT e na luz branca e frasco fechado para MST. A cv. IAC Fantástico não apresentou diferença significativa quanto ao tipo de luz e frasco para MST.

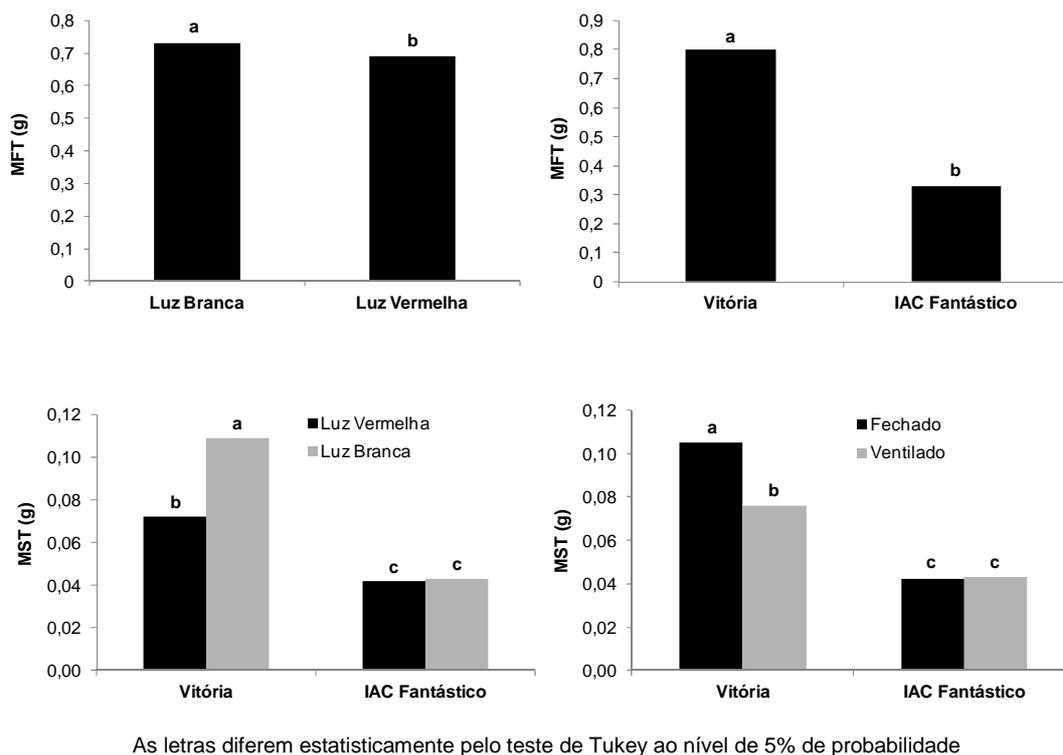


Figura 7 – Massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo *in vitro*.

No que se refere à qualidade de luz, Chang et al. (2003) mostraram que no cultivo *in vitro* de copo-de-leite, em relação à luz branca, a luz vermelha proporcionou maior crescimento para o comprimento dos brotos e massa fresca da parte aérea. Ribeiro et al. (2009), trabalhando com plantas de copo-de-leite em diferentes tipos de luz, não verificaram diferença no crescimento do comprimento dos brotos e massa da matéria fresca da parte aérea nos espectros relacionados ao azul, verde, vermelho e branco. Rocha et al. (2010), avaliando o uso de LEDs como fonte alternativa de luz na multiplicação e enraizamento *in vitro* de framboesiras das cultivares Batum e Dorman Red, constataram que os LEDs vermelhos foram a fonte de luz mais apropriada para a multiplicação e enraizamento de brotações das framboesira. Damiani e Schuch (2006), trabalhando com mirtilo cv. Geogiagem, verificaram que, na sala de crescimento com frascos vedados, foram obtidos melhores resultados para a taxa de multiplicação e número de folhas. Mothé et al. (2008), utilizando luz branca e vermelha durante o cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar em frasco fechado, obtiveram os maiores valores de MFT e MST sob condição de luz vermelha. Este

fato mostra que existe uma variabilidade diferencial entre espécies no que se refere ao crescimento em diferentes tipos de espectro luminoso, utilizado no cultivo *in vitro*.

Neste trabalho com abacaxizeiro, em relação às características de crescimento, não foi observada resposta padrão para os dois tipos de lâmpada utilizada. Ou seja, para a variável DR e MFT, o melhor tipo de lâmpada foi a vermelha, e para AR e MST, a melhor luz foi a branca (Figuras 5 e 6).

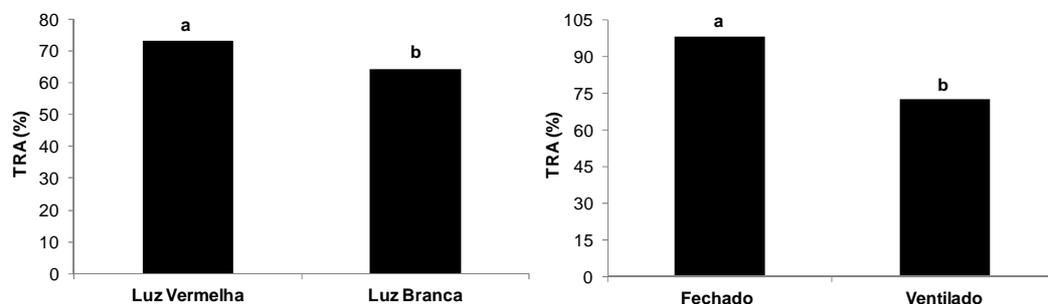
A fase de enraizamento *in vitro* pode ser afetada por alguns fatores. Em alguns casos, a intensidade luminosa aumenta a taxa de enraizamento e o crescimento das mudas, em outros, não afeta. Em algumas espécies, é necessário manter as plantas no escuro para que haja crescimento de raízes. No caso desse experimento, foram constatadas diferenças entre as luzes para MFT e MST. Como as intensidades luminosas foram diferentes para a luz branca e vermelha, 105 e $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, a alta intensidade luminosa da luz branca, se comparada à tradicional (25 a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pode ter influenciado o maior acúmulo de matéria seca.

Magalhães e Peters (1991), fornecendo diferentes intensidades de luz em brotações de amexeira cultivados *in vitro*, não observaram diferenças significativas no enraizamento. Radmann et al. (2001) também afirmam que, para *Gypsophila paniculata*, as intensidades luminosas utilizadas na fase de multiplicação não afetaram o posterior enraizamento das brotações. Leite et al. (2000), contudo, relatam que maior intensidade luminosa pode ter efeitos significativos sobre o número de raízes e crescimento das mudas *in vitro*.

Poucos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de verificar os efeitos da qualidade de luz ou, mesmo, de diferentes níveis de irradiância no crescimento e no desenvolvimento de espécies cultivadas *in vitro*. A maioria das pesquisas é realizada com o objetivo de obter protocolos para meios nutritivos, principalmente com foco direcionado a alterações nas concentrações desses meios, bem como nas concentrações dos reguladores de crescimento adicionados ao meio (Marks e Simpson, 1999).

Com relação à TRA, ela não foi significativa entre os genótipos. Houve diferenças relacionadas ao tipo de luz e frasco. A Figura 8 mostra que, na condição de luz vermelha, e em comparação ao frasco ventilado, as mudas que estavam em frasco fechado perderam água numa taxa maior. Nesta condição de

frasco fechado, normalmente a umidade relativa é bem elevada, o que torna os estômatos completamente abertos (Kao e Forseth, 1992). A ventilação do frasco pode permitir um melhor ajustamento estomático (Kao e Forseth, 1992), uma vez que os estômatos ficam mais sensíveis à variação do déficit de pressão de vapor do ar, causado pela movimentação deste ar em torno das folhas das plantas. Tal fato pode explicar a maior taxa de perda de água nos frascos fechados. Na maioria das vezes, em condição de frasco fechado, a umidade relativa no interior do frasco fica em torno de 100%, o que proporciona a permanência de uma maior quantidade de água nos tecidos das plantas. Na condição de frasco ventilado, neste tipo de frasco, na condição deste experimento, o ar era injetado nos frascos a uma umidade relativa em torno de 75%. Uma vez que este ar apresenta um déficit de pressão de vapor, Figura 2, quando ele circula entre as plantas *in vitro*, ele remove água tanto do meio de cultivo quanto do tecido vegetal, o que explica o menor teor relativo de água das plantas cultivadas no frasco ventilado (Figura 8).



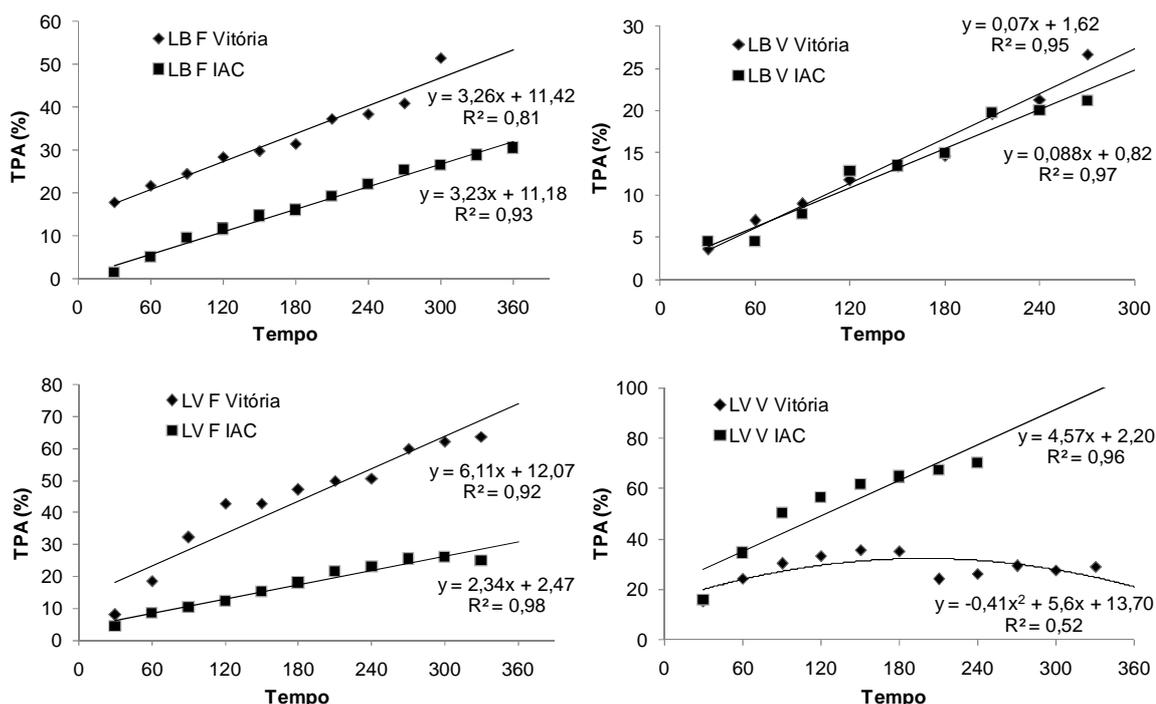
As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 8 – Teor relativo de água em abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 40 dias de cultivo *in vitro*.

A TPA foi analisada pela ANOVA da regressão linear. A TPA não foi significativa para sacarose e apresentou resposta diferente entre as cultivares em relação ao tipo de luz e frasco de cultivo (Figura 9).

Sob condição de luz branca, as mudas que estavam em frasco fechado apresentaram maior perda de água do que em frasco ventilado, e a cv. Vitória perdeu mais água do que a cv. IAC Fantástico. Já entre as mudas que estavam

em frasco ventilado, as cultivares apresentaram comportamento similar quanto à perda de água. Entretanto, sob condição de luz vermelha, as repostas foram diferentes, sendo observado maior perda de água em frasco fechado para a cv. Vitória. Nessa condição, a maior perda de água foi encontrada para cv. IAC Fantástico em frasco ventilado.



LB – Luz Branca, LV – Luz Vermelha, F – Frasco Fechado, V – Frasco Ventilado

Figura 9 - Taxa de perda de água (TPA) dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' cultivados *in vitro* em diferentes tipos de luz e frasco de cultivo na fase de enraizamento.

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* tradicional - frasco fechado, elevada umidade relativa, reduzido fluxo de fótons fotossintéticos - apresentam folhas finas, estômatos poucos funcionais com um deficiente mecanismo de abertura e fechamento, além de apresentarem uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea (Zobayed et al., 2002).

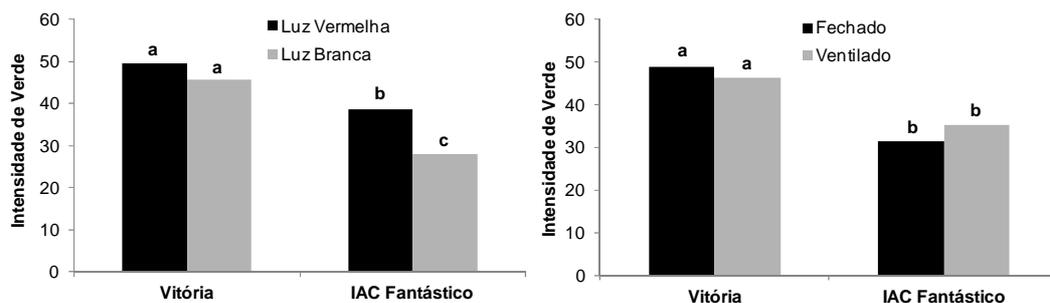
De acordo com as observações de Preece e Sutter (1991), a perda de água é maior em mudas produzidas *in vitro* em frascos fechados do que em mudas já aclimatizadas. Segundo os autores, este fato é devido à pequena

quantidade de cera epicuticular encontrada em plantas sob condições *in vitro*, e tal quantidade ser até 25% inferior ao total encontrado em plantas já rustificadas. Embora a presença de cera epicuticular não seja um indicativo suficiente da sobrevivência das mudas na aclimatização, os autores afirmam que a alta umidade no interior dos frascos é um dos principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das plantas em controlar as perdas de água. Por isso, a redução de umidade em torno da folhas pode aumentar a capacidade de resposta dos estômatos, incrementar a deposição de ceras epicuticulares, além de reduzir o murchamento após a transferência para a aclimatização.

Crespo (2007), trabalhando com cana-de-açúcar, e Schmildt (2010), trabalhando com mamoeiro, utilizando esse mesmo sistema de cultivo *in vitro*, constataram uma redução na taxa de perda de água em frasco de cultivo ventilado e citam que esta redução pode estar relacionada com a menor condutância estomática e a transpiração das folhas. Nota-se que essa resposta foi observada sob luz branca, não respondendo da mesma maneira sob luz vermelha.

Em relação à intensidade de verde, verifica-se que foi significativo para o tipo de luz, genótipo e para as interações luz x genótipo e frasco x genótipo, ou seja, estes resultados mostram que houve um acúmulo de clorofila diferente entre os genótipos (Figura 10).

A Figura 10 mostra que a luz vermelha contribuiu para maior intensidade de verde nas folhas dos dois genótipos, indicando maior acúmulo de clorofila total nas mudas sob esse tipo de luz. Porém, houve uma superioridade da cv. Vitória em relação à cv. IAC Fantástico. Os teores de clorofila são normalmente empregados como fornecedores de uma estimativa do conteúdo de nitrogênio total da planta (Aziz et al., 2011). Segundo Torres Netto et al. (2002, 2005), as variações no conteúdo total de clorofila e carotenoides são bons indicadores do estresse em plantas, bem como podem se relacionar com o teor de nitrogênio.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 10 – Intensidade de verde em mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo *in vitro*.

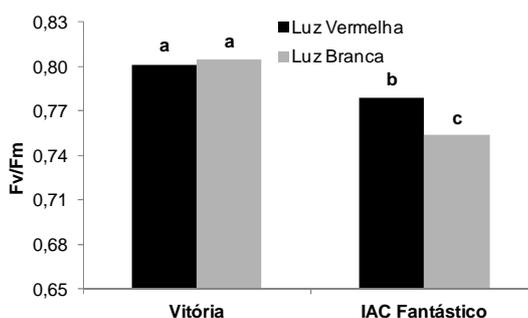
Durante a fase de multiplicação, Schmidt (2010), utilizando luz branca e luz vermelha no cultivo *in vitro* do mamoeiro, não observou diferença significativa da intensidade do verde para os dois tipos de luz e obteve valores inferiores aos encontrados nesse experimento. Rocha et al. (2010) evidenciaram uma maior quantidade de clorofilas *a* (2,70 mg g⁻¹) e *b* (0,87 mg g⁻¹), assim como de carotenoides (1,33 mg L g⁻¹) em morangueiro durante a fase multiplicação *in vitro*, quando utilizaram LEDs vermelhos, em comparação com as outras fontes de luz empregadas (LEDs azuis, LEDs verdes, lâmpadas fluorescentes brancas ou fluorescentes Growlux). Nhut et al. (2003) também observaram efeito positivo da iluminação proporcionada por LEDs vermelhos, sendo obtida maior quantidade de clorofila em brotações de morangueiro da cultivar Akihime cultivadas sob 70% de LEDs vermelhos e 30% de LEDs azuis.

Decetti (2004) afirma que o cultivo *in vitro* inibe, em determinado grau, a síntese de clorofila. Diversos trabalhos têm reportado que, para muitas espécies, a presença de sacarose no meio de cultivo tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese, e baixos níveis de sacarose no meio de cultura foram correlacionados com um potencial elevado de produção de carboidrato (Decetti, 2004). Este autor observou redução no teor de clorofila total, sob maiores intensidades de luz em cultivo *in vitro* de *Annona glabra*.

Por meio do quadro de ANOVA, verifica-se que houve diferença significativa para o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) para luz, genótipo e para a interação luz x genótipo. A relação F_v/F_m é uma variável

importante para avaliar a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II em plantas. Entre as várias variáveis da fluorescência das clorofilas empregadas para detectar os danos ao aparato fotossintético, essa relação F_v/F_m , em que F_m = fluorescência máxima e F_v = fluorescência variável, é a variável mais utilizada. Esta variável apresenta uma elevada relação positiva com o rendimento quântico da fotossíntese (Kao e Forseth, 1992). Este fato mostra a importância do uso desta variável no diagnóstico da eficiência fotoquímica de plantas. Ainda tal razão pode fornecer uma indicação integrada da extensão do estresse devido a fatores como alta intensidade luminosa, baixa ou elevada disponibilidade de água ou de nutrientes (Glynn et al., 2003; Zanandrea et al., 2006).

A Figura 11 mostra que os maiores valores obtidos da relação F_v/F_m foram em luz vermelha para a cv. IAC Fantástico, não havendo diferença para cv. Vitória, e que os valores encontrados estão dentro da faixa considerada ótima (F_v/F_m de $0,800 \pm 0,5$) (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989; Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993). Este fato evidencia que nos dois genótipos estudados, houve uma máxima eficiência do aparato fotoquímico do fotossistema II (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989). A cv. Vitória apresentou valor superior a 0,80 e a cv. IAC Fantástico apresentou valor entre 0,75 – 0,76 (Figura 11).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 11 – Eficiência fotoquímica (F_v/F_m) de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo *in vitro*.

O uso das variáveis da emissão da fluorescência da clorofila tem sido difundido principalmente no estudo de fotossíntese por ser um método que, além

de não-destrutivo, permite analisar qualitativa e quantitativamente a absorção e o aproveitamento da energia luminosa através do PSII e as possíveis relações com a capacidade fotossintética (Torres Netto et al., 2005). Além disso, estudos preliminares mostraram que a alta concentração de sacarose em meios de cultura e o elevado fluxo de fótons fotossintéticos das lâmpadas podem alterar a taxa de F_v/F_m das plantas (Cassana et al., 2008).

Van Huylenbroeck et al. (1998), em estudo com plantas de *Calathea louisae* submetidas a 3% de sacarose no cultivo *in vitro*, encontraram valores de F_v/F_m de 0,66 e atribuíram este dado como indicativo de estresse. Já Kadlecek et al. (2003), trabalhando com plantas de tabaco cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de sacarose (0, 3 e 5%) e duas densidades de fluxo de fótons (80 e 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), verificaram que as plantas crescidas fotoautotroficamente e submetidas ao alto fluxo de fótons apresentavam sintomas de fotoinibição. A ausência de sacarose associada ao alto fluxo de fótons levou a um decréscimo de F_v/F_m para 0,49, enquanto os demais tratamentos proporcionaram valores entre 0,70 e 0,75.

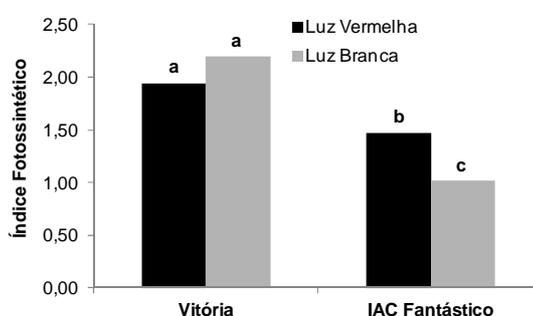
Cassana et al. (2008), avaliando a eficiência quântica fotoquímica máxima de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro*, observaram que ela variou de 0,73 a 0,81 nas plantas cultivadas em densidades de fluxo de fótons de 14 e 21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não sendo verificado efeito significativo da sacarose na menor densidade. Entretanto, esses autores verificaram um decréscimo na relação F_v/F_m nas densidades de fluxo de fótons de 42 e 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando associados ao meio de cultivo contendo 5 g L⁻¹ de sacarose. Nestas condições, os valores de F_v/F_m foram baixos, atingindo médias de 0,66 e 0,62, respectivamente. Mothé et al. (2008), testando diferentes concentrações de sacarose (10, 20, 30, 40 e 50 g L⁻¹) no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar em frasco fechado, constataram menores valores de F_v/F_m na concentração de 20 g L⁻¹, sendo que para as demais concentrações não foram observados diferenças significativas para F_v/F_m dentro da faixa de 0,75 - 0,85.

Seon et al. (2000), ao término do cultivo *in vitro* de *Rehmannia glutinosa*, sob condições fotoheterotróficas, indicaram possíveis processos de danos ao aparato fotossintético quando as plantas foram cultivadas com baixa concentração de sacarose (5 g L⁻¹) e altas densidades de fluxo de fótons. Esses resultados não confirmam aqueles encontrados nesse experimento, em que as

diferentes densidades de fótons $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz vermelha) e $105 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz branca) não causaram redução de F_v/F_m , porém a concentração usada nesse experimento foi maior (15 ou 30 g L^{-1}) para ambos os genótipos.

O índice de vitalidade (PI) de uma planta pode ser caracterizado por meio do índice fotossintético (Strasser et al, 2000). Esta variável proposta por Strasser et al (2000) é um índice que integra três componentes independentes: densidade dos centros de reação ativos (RCs), eficiência no transporte de elétrons após Qa ter sido reduzida e a probabilidade de que um fóton absorvido seja capaz de reduzir Qa. A variável PI mostra a atividade dos fotossistema I e II e pode avaliar o desempenho da planta sob condição de estresse (Strasser et al., 2004). Em condição de estresse hídrico, a variável PI foi considerada melhor índice (maior sensibilidade) do que a relação F_v/F_m , na avaliação da eficiência fotoquímica em genótipos de trigo (Zivcak et al., 2008).

PI se mostrou significativo para a interação genótipo x luz. A Figura 12 mostra que a variável índice fotossintético ou *performance index* (PI) foi afetada pelo tipo de luz utilizada, apresentando respostas diferentes entre os genótipos.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 12 – Índice fotossintético (PI) de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo *in vitro*.

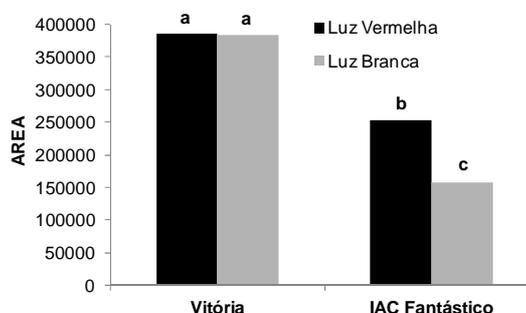
Para a cv. Vitória, não houve diferença quanto ao tipo de luz. Para a cv. IAC Fantástico, o maior valor de PI foi encontrado em luz vermelha.

Como anteriormente citado, o índice fotossintético tem sido considerado uma variável muito sensível para plantas submetidas a estresses, em diferentes

culturas (Strasser et al., 2000; Zivcak et al., 2008). A Figura 11 mostra que o menor valor de PI foi observado para a cv. IAC Fantástico, o que pode demonstrar uma menor eficiência fotoquímica desse genótipo.

De acordo com Strauss et al. (2006), o índice PI é uma expressão multivariada do PSII, que combina absorção de energia luminosa, excitação de energia e conversão de energia de excitação para transporte de elétrons. Esta variável pode ser utilizada para avaliar a eficiência fotoquímica de plantas que estão sob condições de estresse. Segundo Ripley et al. (2004), o PI pode identificar alterações precoces no desempenho fotossintético das plantas, por isso tem sido utilizado como forma mais rápida de avaliação.

Um variável utilizada para avaliar a quantidade de plastoquinona no lado redutor do fotossistema II (FSII) é a AREA sob a curva. Esta área é um importante indicativo de comprometimento do fotossistema II, uma vez que valores reduzidos podem mostrar menor eficiência deste fotossistema (Strasser et al, 2000). Para essa variável, houve significância dos fatores luz, genótipo e a interação luz x genótipo, e foram observados os maiores valores sob condições de luz branca e vermelha para a cv. Vitória (Figura 13).



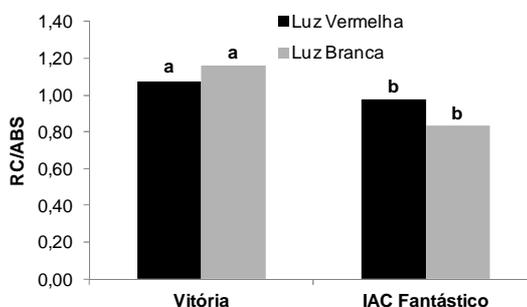
As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 13 – Área sob a curva da fluorescência que estima o tamanho do 'pool' de plastoquinona do fotossistema II de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo *in vitro*.

A área acima da curva da cinética da emissão da fluorescência, que estima o tamanho dos "aceptores" de elétrons no lado redutor do fotossistema II (Strasser et al, 2000), foi maior no genótipo 'Vitória' em relação ao genótipo 'IAC

Fantástico', e para a última cultivar, a luz vermelha apresentou maior valor. Tal resultado mostra novamente que a c. IAC Fantástico apresentou, sob condição *in vitro*, menor eficiência fotoquímica (Figuras 11 e 12).

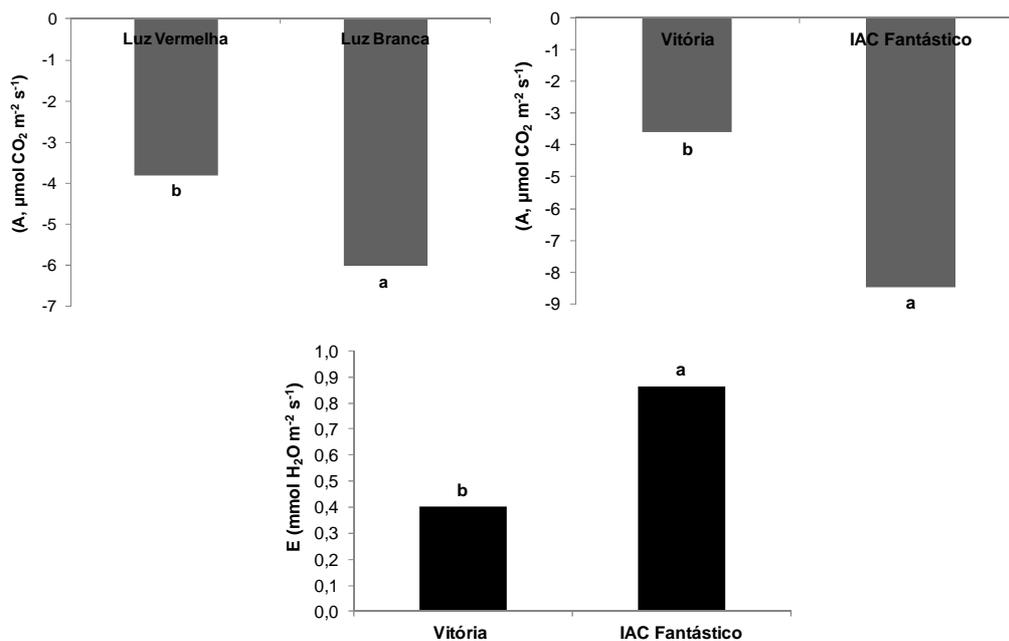
RC/ABS é uma variável que indica a quantidade de centros de reação funcional por área transversal de folha e pode estimar a capacidade de absorção de luz por unidade de centro de reação ativo (Strasser et al, 2000). A Figura 14 mostra que a cv. Vitória apresentou maior quantidade de centros de reação ativos do que a cv. IAC Fantástico, evidenciando novamente a superioridade deste genótipo no que se refere à eficiência fotoquímica, tanto em condição de luz branca, Figura 12, quanto em luz vermelha (Figuras 11, 13 e 14).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 14 – RC/ABS em mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' após 40 dias de cultivo *in vitro*.

Ao se analisar a Figura 15, constata-se que não houve assimilação fotossintética do carbono (A) *in vitro* em ambos os genótipos, independentemente do tipo de luz. A cv. Vitória apresentou menor transpiração (E) do que a cv. IAC Fantástico.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 15 – Taxa fotossintética (A) e transpiração (E) de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ após 40 dias de cultivo *in vitro*.

Um dos principais fatores que causam grande influência na fotossíntese, de plantas cultivadas *in vitro* é a luz (Pyke e Lopez-Juez, 1999).

Com relação às duas variáveis A e E, não houve efeito significativo da sacarose e nem do tipo de frasco de cultivo utilizado. Somente A foi significativo para qualidade de luz e genótipo.

Seko e Nishimura (1996) verificaram, durante a fase de enraizamento das brotações, um crescimento fotoautotrófico *in vitro*, em meio de cultura sem sacarose, enriquecido com CO_2 , com explantes regenerantes de cultura de calus de arroz, sob condições de iluminação contínua e sob alto FFF ($125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Em estudos realizados por Lee et al. (1988), com *Liquidambar styraciflua* L., os resultados mostram que as diferenças no FFF podem modificar o desenvolvimento *in vitro*. A elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessadas *in vitro*, com uma diferenciação do tecido paliçádico no mesófilo das folhas. A anatomia foliar destas plantas ficou mais próxima das folhas de mudas em aclimatização do que o material *in vitro* crescendo sob baixa irradiância.

No crescimento de brotos de explantes de roseiras ‘Samanta’ e ‘Landora’, com o objetivo de verificar as condições ideais de fluxo de fótons fotossintéticos

(FFF), Anna et al. (1999) obtiveram um crescimento superior com o fluxo de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando comparado com o menor valor de FFF ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tanto em condições fotomixotróficas quanto fotoautotróficas. Após 40 dias de cultivo, em condições fotoautotróficas, as plantas de orquídeas apresentaram maior crescimento, maiores taxas de fotossíntese líquida e maior produção de massa da matéria fresca e seca. O valor destas duas últimas variáveis foi 1,5 vez superior ao das plantas cultivadas em condições fotomixotróficas (Hahn et al., 2001).

Uma das formas de facilitar o processo de aclimatização de plantas micropropagadas seria aumentar a intensidade luminosa, promovendo a fotossíntese e melhorando as relações hídricas (Erig e Schuch, 2005). Ibaraki e Nozaki (2005) afirmam ainda que, havendo necessidade de desenvolver capacidade fotossintética nos tecidos, um dos fatores mais importantes a ser considerado é o ambiente de luz, especialmente a intensidade deste fator.

Kodym e Zapata-Arias (1999), trabalhando com explantes de bananeira 'Grande Naine' sob condição de luz natural, observaram formação de raízes mais fortes e vigorosas. A concentração de sacarose de 15 g L^{-1} promoveu maiores comprimentos das raízes do que a concentração de 30 g L^{-1} , normalmente utilizada na fase de multiplicação. A disponibilidade de uma fonte de energia é indispensável para que ocorra a rizogênese. No entanto, em grandes concentrações, ela pode ser prejudicial. Nguyen et al. (2001) relataram que a taxa fotossintética líquida de plantas de cafeeiro cultivados *in vitro* foi maior em ambiente enriquecido com CO_2 ($1400\text{-}1500 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e alto FFF, além de apresentar maior área foliar e massa da matéria seca em comparação com as plantas crescidas em ambiente sem enriquecimento.

Segundo Costa et al. (2009), é provável que a excessiva transpiração das folhas das plantas *in vitro* se deva à alta densidade estomática, principalmente na face abaxial, ao ineficiente controle de perda de água pelos estômatos e à ausência ou baixa quantidade de cera epicuticular. Schmidt (2010), para multiplicação *in vitro* de mamoeiro com sistema de cultivo ventilado, sob luz branca e vermelha e com diferentes concentrações de sacarose, obteve ma taxa transpiratória em luz branca superior à luz vermelha de, aproximadamente, $2,73$ e $1,74 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Este autor relatou ainda que, independentemente da concentração de sacarose utilizada, não houve

assimilação fotossintética do carbono, apresentando uma redução acentuada da liberação de CO₂ com o aumento de sacarose.

Diversas técnicas e metodologias têm sido aplicadas *in vitro* com o objetivo de fornecer condições ambientais que promovam o aumento na capacidade fotossintética do explante micropropagado, principalmente com a utilização de diferentes FFF, filtros de membranas com microporos permeáveis e gases. Tais alternativas de cultivo podem promover aumento na troca de gases entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo.(Kozai e Zobayed, 2005).

Antunes et al. (2010), trabalhando com cultivo *in vitro* de abacaxi cv. Perolera sob condições de estímulo ao fotoautotrofismo (0, 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose) e em condições de ventilação do frasco - frasco sem filtro e sem ventilação, frasco com filtros em prateleiras sem ventiladores e frascos com filtro em prateleiras com ventiladores - obtiveram maior taxa de multiplicação com a redução de 50% de sacarose do meio de cultivo (15 g L⁻¹), relatando que não houve comprometimento na qualidade das plantas, indicando que a fonte de carbono exógena (sacarose) pode ser reduzida ou eliminada do meio de cultura, caso sejam melhoradas as condições do ambiente *in vitro* de modo que a planta consiga maior capacidade fotossintética e cresça dependente somente do CO₂ injetado no ambiente. Dessa forma, nessa condição de cultivo, serão possíveis a promoção do crescimento e a produção de plantas *in vitro* com maior qualidade e menor perda durante o processo.

Nesse experimento, para a cv. Vitória, verificou-se que, para algumas características relacionadas à capacidade fotossintética (SPAD, F_v/F_m, AREA sobre a curva, RC/ABS e A), a luz vermelha apresentou as melhores repostas. Segundo Saebo et al. (1995), a luz vermelha é importante para o desenvolvimento do aparato fotossintético das plantas e pode aumentar o acúmulo de amido em muitas espécies pela inibição da exportação de fotoassimilados das folhas, aumentando a concentração de carboidratos dentro desses órgãos.

Nas condições desse trabalho com abacaxizeiro, não se observou assimilação fotossintética *in vitro* independentemente do tipo de luz utilizada e da adição de sacarose como fonte de carbono (15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹). Entretanto, sob condição de luz vermelha, foi observada ocorrência de maiores valores de intensidade verde das folhas (SPAD), do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), da estimativa da quantidade dos aceptores no lado redutor do PSII (área

sobre a curva) e da capacidade de absorção de luz no PSII (RC/ABS). A cv. IAC Fantástico apresentou menor incremento de biomassa, sendo essa biomassa, assim como para a cv. Vitória, produzida utilizando o carbono exógeno fornecido pela sacarose aplicada ao meio de cultivo. Neste experimento, a tentativa de ventilar os frascos de cultivo, ou seja, melhorar as trocas gasosas, não foi suficiente para melhorar a competência fotossintética das duas cultivares em estudo. Futuros trabalhos necessitarão ser desenvolvidos de modo a incrementar o FFF, principalmente associado à luz vermelha, reduzir ainda mais a sacarose, bem como incrementar a concentração de CO₂ no ambiente *in vitro* para que estas cultivares possam apresentar metabolismo fotoautotrófico já na condição *in vitro*.

5.2. Experimento de aclimatização das mudas

Para esse experimento em condição de casa de vegetação, nos períodos de avaliação de 30, 60 e 75 dias de cultivo *ex vitro* (fase de aclimatização) e para cada cultivar, foi feita análise de variância. Verificou-se que, nos três períodos de cultivo, não houve efeito significativo para tipo de frasco em que as plantas foram cultivadas na condição *in vitro*. Sendo assim, procedeu-se a uma ANOVA em parcela sub subdividida, incluindo os fatores tipo de luz, concentração de sacarose e genótipo.

Com relação à porcentagem de sobrevivência das plantas na condição *ex vitro*, em todos os tratamentos aplicados, a taxa foi de 100%.

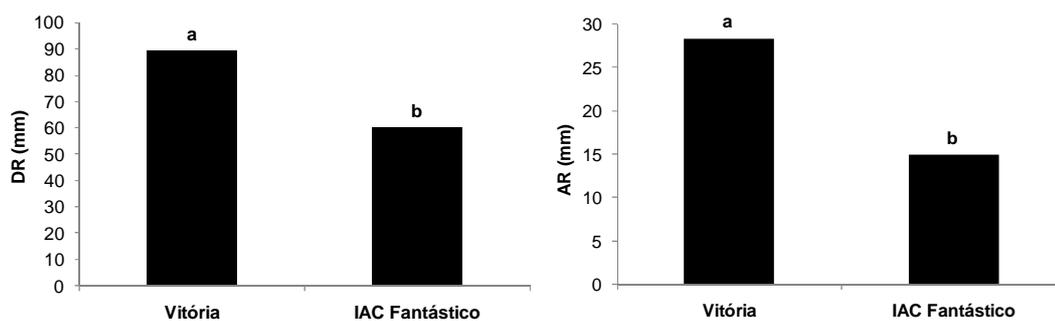
O Quadro 2 apresenta o resumo ANOVA das análises feitas aos 30 dias de aclimatização. Observa-se que não houve diferenças significativas entre as interações nesse período avaliado. Verifica-se também que, em relação ao genótipo, há diferenças significativas para AR, DR e SPAD. As demais variáveis não apresentaram diferença significativa para nenhum fator.

Quadro 2 – Resumo da análise de variância dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo com suas interações em abacaxizeiro aos 30 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		DR	AR	NF	SPAD
Luz	1	485,136 ^{ns}	0,881 ^{ns}	2,160 ^{ns}	17,625 ^{ns}
Resíduo a	4	347,231	0,742	1,843	4,258
Sac	1	5,789 ^{ns}	0,021 ^{ns}	0,106 ^{ns}	4,654 ^{ns}
Luz x Sac	1	83,238 ^{ns}	0,029 ^{ns}	0,426 ^{ns}	21,468 ^{ns}
Resíduo b	4	167,128	0,077	0,666	6,714
Gen	1	5033,479 ^{**}	10,827 ^{**}	1,500 ^{ns}	214,197 ^{**}
Luz x Gen	1	0,144 ^{ns}	0,017 ^{ns}	0,060 ^{ns}	8,841 ^{ns}
Sac x Gen	1	0,418 ^{ns}	0,072 ^{ns}	0,060 ^{ns}	4,592 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	0,756 ^{ns}	0,166 ^{ns}	0,060 ^{ns}	11,436 ^{ns}
Resíduo c	8	101,868	0,430	2,015	8,899
Total	23				
CV Luz		46,45	27,48	19,54	14,65
CV Sac		22,35	28,51	7,06	23,10
CV Gen		13,50	30,21	15,04	10,26
MÉDIA		74,75	2,70	9,43	29,06

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		Fv/Fm	PI	Área	RC / ABS
Gen	1	0,0001 ^{ns}	0,349 ^{ns}	16443 ^{ns}	0,034 ^{ns}
Resíduo a	4	0,0004	0,944	21051	0,097
Luz	1	0,0001 ^{ns}	1,265 ^{ns}	37831 ^{ns}	0,131 ^{ns}
Gen x Luz	1	0,0009 ^{ns}	1,412 ^{ns}	28512 ^{ns}	0,126 ^{ns}
Resíduo b	4	0,0011	0,304	21634	0,025
Sac	1	0,0009 ^{ns}	0,446 ^{ns}	44322 ^{ns}	0,016 ^{ns}
Gen x Sac	1	0,0004 ^{ns}	0,002 ^{ns}	11434 ^{ns}	0,005 ^{ns}
Luz x Sac	1	0,0006 ^{ns}	0,733 ^{ns}	22673 ^{ns}	0,065 ^{ns}
Gen x Luz x Sac	1	0,0000 ^{ns}	0,091 ^{ns}	25958 ^{ns}	0,020 ^{ns}
Resíduo c	8	0,0012	0,545	28456	0,037
Total	23				
CV Luz		5,33	42,90	7,67	5,87
CV Sac		1,46	13,81	7,88	15,15
CV Gen		4,64	33,55	19,45	16,58
MÉDIA		0,75	2,20	274242	1,65

^{ns} - Não significativo. ** ; * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação, Sac - Sacarose, Gen - Genótipo, Diâmetro da roseta - DR (mm), Altura da roseta - AR (mm), Número de folhas - NF, Intensidade de cor verde da folha - SPAD, Rendimento quântico máximo do fotossistema II - F_v/F_m, Índice Fotossintético - PI, Área sob a curva da fluorescência que estima o tamanho do 'pool' de plastoquinona do fotossistema II - AREA, Eficiência na absorção de luz pelo PSII - RC / ABS.

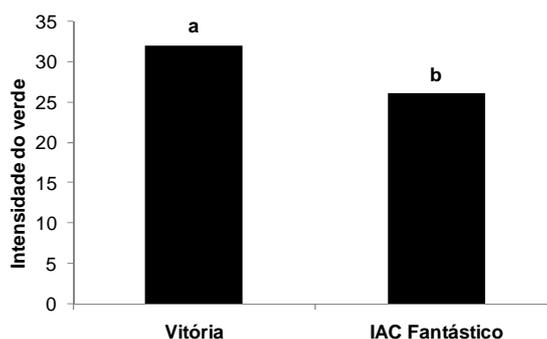


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 16 – Diâmetro e altura da roseta de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 30 dias de aclimatização.

Na condição de casa de vegetação, em comparação à cv. IAC Fantástico, a cv. Vitória apresentou maior diâmetro e altura da roseta (Figura 16). A primeira variável mede a distância entre as folhas mais opostas da mudas, e pode indicar o comprimento das folhas, bem como o crescimento destes órgãos, e a segunda, a altura da folha mais central e ereta.

A intensidade do verde (SPAD) mostrou diferença entre os genótipos (Figura 17).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 17 – Intensidade do verde (SPAD) em mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 30 dias de aclimatização.

A maior intensidade de verde foi encontrada nas mudas da cv. Vitória aos 30 dias de aclimatização, mostrando a resposta diferencial deste genótipo com relação ao desempenho na aclimatização quando cultivado em ambiente *ex vitro*.

Para a cv. Vitória, os valores de SPAD medidos nas folhas crescidas durante a aclimatização apresentaram uma redução quando comparados aos valores medidos nas plantas que saíram da condição *in vitro* (Figura 9). Este fato demonstra que estas plantas crescidas na condição *in vitro*, quando transplantadas para a casa de vegetação, são submetidas a um estresse, seja luminoso e/ou hídrico, ou podem ter sofrido um efeito de diluição, uma vez que estas mudas cresceram mais. Toyoda et al. (2010) também observaram essa mesma resposta de redução de valores de SPAD quando mudas de abacaxizeiro cv. Gold saíram da cultivo *in vitro* e foram transferidas para a fase aclimatização.

Uma gradual intensificação do fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) nos frascos de cultivo, juntamente com a diminuição da concentração de sacarose nos meios de cultura, como feito nas condições desse experimento, podem ser de grande utilidade na aclimatização das mudas, ainda na condição *in vitro*. Esta rustificação *in vitro* pode proporcionar às mudas uma anatomia diferenciada em relação às plantas não-rustificadas, com um metabolismo mais próximo da condição fotoautotrófica com melhoria de todo o aparato fotossintético, o que poderá contribuir para redução de perdas na fase de aclimatização (Lucchesini et al., 2009).

Uma das principais ações a serem estabelecidas no início do processo de aclimatização é o controle da umidade do ambiente. Este controle se torna importante para um eficiente estabelecimento das mudas, pois no cultivo *in vitro* tradicional, com alta concentração de sacarose, frascos sem trocas gasosas e reduzidos FFF, os estômatos são considerados não-funcionais na condição *in vitro*. Dessa forma, salienta-se que, logo após o transplante para as condições *ex vitro*, é de grande importância a manutenção da umidade relativa do ar e do substrato, a fim de evitar o colapso hídrico das células em decorrência da excessiva transpiração das mudas (Taveira, 2010), devendo a irrigação ser realizada três vezes ao dia durante o primeiro mês.

As plantas micropropagadas necessitam de um período de aclimatização, imediatamente após a remoção do ambiente *in vitro*, que lhes permitirá adaptar-se às condições de cultivo em campo. Em plantas micropropagadas, principalmente

no cultivo *in vitro* tradicional, ocorre uma dificuldade de transição do mecanismo heterotrófico para o fotoautotrófico, em virtude das alterações epigenéticas, anatômicas e fisiológicas, induzidas pelas condições *in vitro* (Campostrini e Otoni, 1996), sendo essas alterações grandes reponsáveis pela alta mortalidade nessa fase.

Em fase inicial de aclimatização, a baixa capacidade fotossintética e o comprometimento das relações hídricas são os principais problemas das plantas cultivadas *in vitro*. Estas plantas são expostas a baixo FFF e, quando transferidas para condições *ex vitro*, com alto FFF, tornam-se sensíveis, podendo ser submetidas a um processo de fotoinibição (Van Huylbroeck et al., 2000). Esses mesmos autores observaram redução da eficiência fotoquímica quando as plantas de *Calathea louisae* Gagnep. 'Maui Queen' foram transferidas para as condições *ex vitro*. Ainda os autores mostraram que com o tempo, os valores de F_v/F_m se elevaram. Yang e Yeh (2008), também trabalhando com *Calathea orbifolia*, observaram diminuição de F_v/F_m após sete dias em condições *ex vitro*, tendo essa variável atingido o valor considerado normal aos 35 dias de aclimatização.

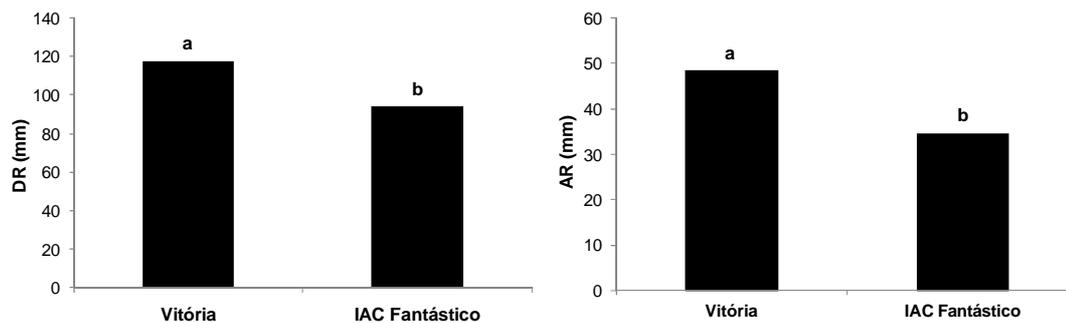
Os Quadros 3 e 4 mostram o resumo da análise de variância (ANOVA) das análises feitas aos 60 dias de aclimatização, seguindo o mesmo critério descrito aos 30 dias de aclimatização.

Quadro 3 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para as variáveis DR, AR e NF com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio		
		DR	AR	NF
Luz	1	167,217 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,158 ^{ns}
Resíduo a	4	167,217	220,630	1,154
Sac	1	21,375 ^{ns}	36,137 ^{ns}	0,175 ^{ns}
Luz x Sac	1	22,912 ^{ns}	6,987 ^{ns}	0,008 ^{ns}
Resíduo b	4	211,543	11,060	0,359
Gen	1	3232,920 ^{**}	1178,100 ^{**}	6,773 ^{ns}
Luz x Gen	1	7,877 ^{ns}	55,967 ^{ns}	0,940 ^{ns}
Sac x Gen	1	39,142 ^{ns}	0,495 ^{ns}	1,330 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	9,945 ^{ns}	8,342 ^{ns}	0,683 ^{ns}
Resíduo c	8	108,880	23,414	1,756
Total	23			
CV luz		15,78	5,31	8,52
CV Sac		19,97	26,63	2,65
CV Gen		9,84	11,65	9,78
MÉDIA		105,93	41,52	13,54

^{ns} - Não significativo. ^{**}, ^{*} - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Sac - Sacarose; Gen - Genótipo; Diâmetro da roseta - DR (mm); Altura da roseta - AR (mm); Número de folhas - NF.

A variável DR e AR apresentaram diferença significativa quanto ao genótipo, sendo observados maiores valores para a cv. Vitória (Figura 18).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 18 – Diâmetro e altura da roseta de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

Observa-se que DR e AR apresentaram aumento em relação à avaliação aos 30 dias, Figura 16, e que a cv. Vitória continuou superior à cv. IAC Fantástico, com maior crescimento.

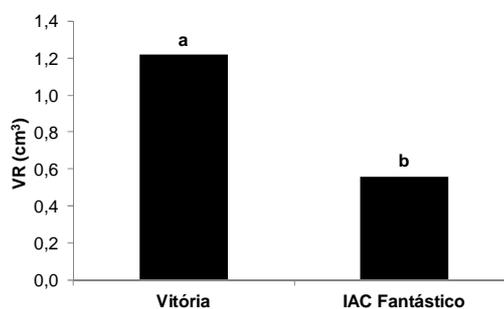
Quadro 4 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para as variáveis VR, AF, MSF, MSR, MST, MFE, SPAD, F_v/F_m , PI, AREA e RC/ABS com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		VR	AF	MSF	MSR	MST
Luz	1	0,156 ^{ns}	275,835 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,000005 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Resíduo a	8	0,101	198,919	0,012	0,001266	0,021
Sac	1	0,042 ^{ns}	2014,412 ^{**}	0,093 ^{ns}	0,004141 ^{**}	0,137 ^{**}
Luz x Sac	1	0,020 ^{ns}	174,139 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,000255 ^{ns}	0,011 ^{ns}
Resíduo b	8	0,031	124,388	0,005	0,000393	0,007
Gen	1	4,830 ^{**}	29931,841 ^{**}	0,983 ^{**}	0,030085 ^{**}	1,357 ^{**}
Luz x Gen	1	0,072 ^{ns}	243,246 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,000034 ^{ns}	0,001 ^{ns}
Sac x Gen	1	0,002 ^{ns}	1152,402 ^{**}	0,037 ^{ns}	0,001357 ^{ns}	0,053 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	0,0002 ^{ns}	173,139 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0,000378 ^{ns}	0,015 ^{ns}
Resíduo c	16	0,087	219,827	0,010	0,000439	0,014
Total	39					
CV Luz		11,22	32,73	3,69	2,08	5,25
CV Sac		3,44	20,47	1,56	0,65	1,75
CV Gen		32,59	24,40	30,58	34,56	30,06
MÉDIA		0,90	60,72	0,33	0,06	0,40

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio					
		MFE	SPAD	F_v/F_m	PI	AREA	RC / ABS
Luz	1	1,438 ^{ns}	16,129 ^{ns}	0,0013 [*]	0,535 ^{ns}	76303 ^{ns}	0,036 ^{ns}
Resíduo a	8	0,844	4,604	0,0001	0,288	32071	0,035
Sac	1	0,665 ^{ns}	3,721 ^{ns}	0,0005 ^{ns}	0,062 ^{ns}	61047 ^{ns}	0,0004 ^{ns}
Luz x Sac	1	0,173 ^{ns}	2,209 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,078 ^{ns}	27546 ^{ns}	0,005 ^{ns}
Resíduo b	8	0,336	24,250	0,0001	0,189	68079	0,025
Gen	1	0,173 ^{ns}	0,016 ^{ns}	0,0055 ^{**}	0,002 ^{ns}	34145 ^{ns}	0,098 ^{ns}
Luz x Gen	1	0,777 ^{ns}	57,60 ^{**}	0,0001 ^{ns}	0,219 ^{ns}	51489 ^{ns}	0,034 ^{ns}
Sac x Gen	1	0,201 ^{ns}	6,084 ^{ns}	0,00005 ^{ns}	0,00003 ^{ns}	37940 ^{ns}	0,0007 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	0,289 ^{ns}	34,596 ^{ns}	0,00002 ^{ns}	0,060 ^{ns}	39658 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Resíduo c	16	4,161	11,902	0,0002	0,212	47895	0,026
Total	39						
CV Luz		14,96	16,02	0,13	18,70	12,36	3,72
CV Sac		5,95	8,44	0,13	12,27	26,23	2,65
CV Gen		32,13	12,00	1,90	29,81	23,45	17,29
MÉDIA		5,64	28,73	0,73	1,54	259461	0,94

^{ns} - Não significativo. ^{**}, ^{*} - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Sac - Sacarose; Gen - Genótipo; Volume de raiz - VR (cm³); Área Foliar - AF (cm²); Massa da matéria seca da folha - MSF (g); Massa da matéria seca radicular - MSR (g); Massa da matéria seca total - MST (g); Massa foliar específica - MFE (g m⁻²); Intensidade do verde - SPAD; Rendimento quântico máximo do fotossistema II - F_v/F_m ; Índice Fotossintético - PI, Área sob a curva da fluorescência que estima o tamanho do 'pool' de plastoquinona do fotossistema II - AREA, Eficiência na absorção de luz pelo PSII - RC / ABS.

A variável VR foi significativa para genótipo (Figura 19).

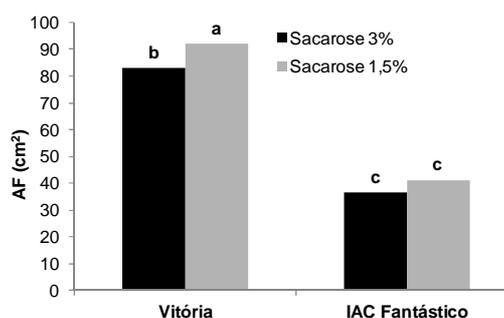


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 19 – Volume de raiz de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

Para a variável VR, observa-se que a cv. Vitória apresentou valores maiores do que a cv. IAC Fantástico.

A área foliar mostrou-se significativa para a interação sacarose x genótipo (Figura 20).



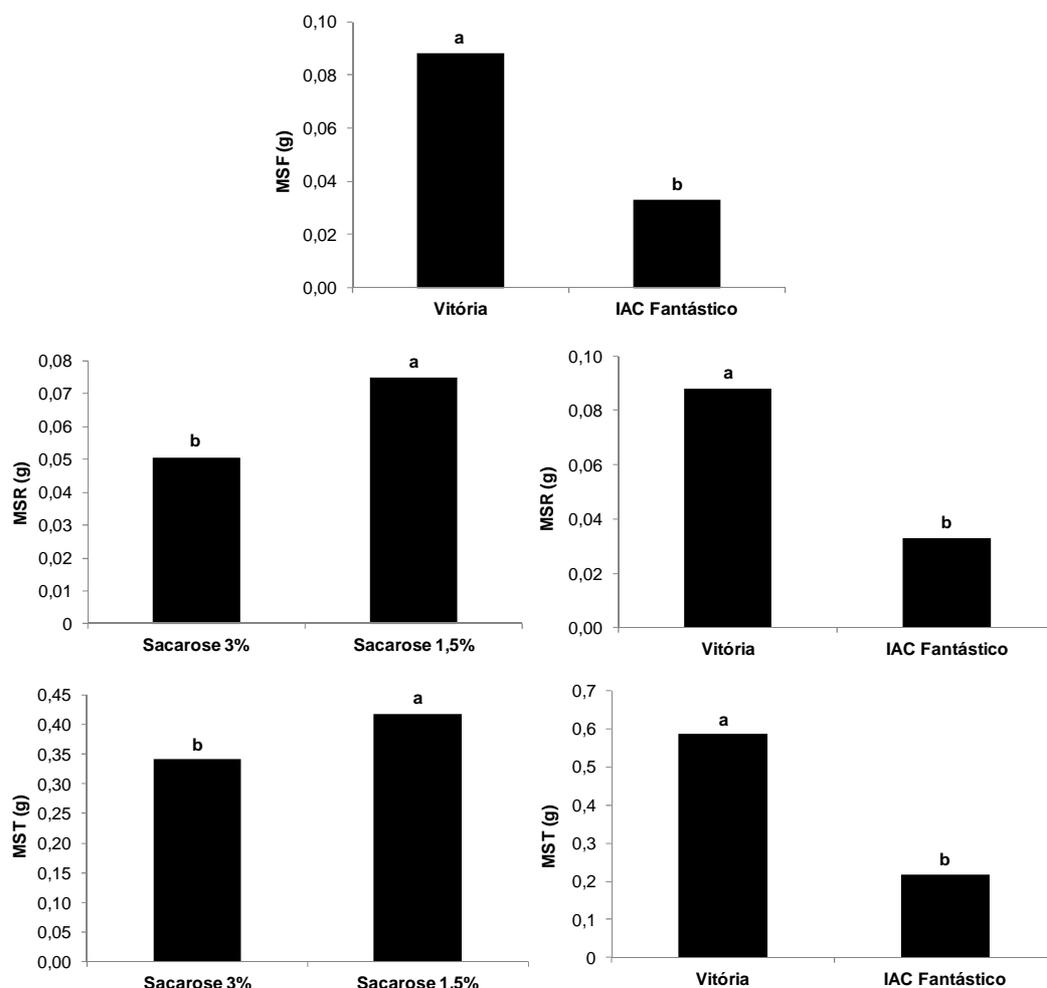
As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 20 – Área foliar de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

A cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico e, quanto à cv. Vitória, as mudas que estavam na concentração de sacarose 1,5% na condição *in vitro* apresentaram maior área foliar aos 60 dias de aclimatização em relação às

mudas que estavam a 3% de sacarose. Na cv. IAC Fantástico, não houve diferença.

A MSF foi significativa para genótipo, e a MSR e MST foram significativas para os fatores sacarose e genótipo (Figura 21).

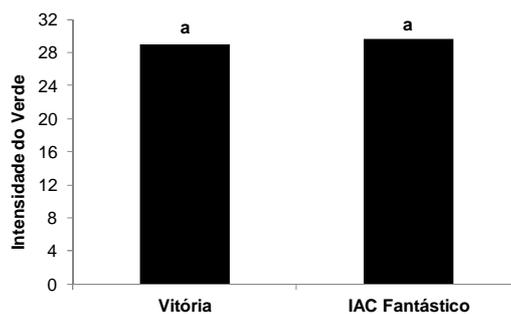


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 21 – Massa seca das folhas, raiz e total de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 60 dias de aclimatização.

MSF foi superior para a cv. Vitória. A MSR e MST foram maiores para as mudas que vieram da condição *in vitro* com 1,5% de sacarose e para a cv. Vitória.

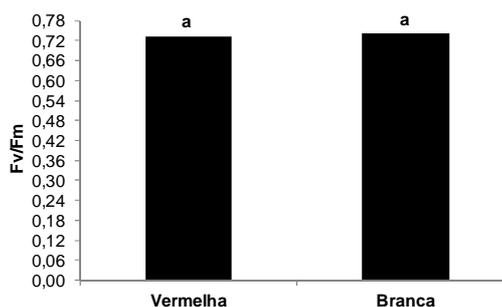
A intensidade do verde (SAPD) foi significativa para genótipo (Figura 22).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 22 – Intensidade do verde (SPAD) de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

A variável F_v/F_m foi significativa para os fatores luz e genótipo (Figura 23).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 23 – Eficiência fotoquímica (F_v/F_m) de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

Com relação à eficiência fotoquímica máxima do PSII, a cv. Vitória apresentou valores estatisticamente iguais à cv. IAC Fantástico, e para a cv. Vitória, os valores ficaram dentro da faixa considerada normal (0,75 a 0,80), mantendo a mesma resposta das plantas dos 30 dias de aclimatização.

Toyoda et al. (2010) observaram redução de F_v/F_m em plantas de abacaxizeiro cv. Gold, quando foram transferidas para condições *ex vitro*. Os autores relataram que as plantas precisam de uma fase de adaptação e de

formação de novas folhas na condição *ex vitro* para que essa variável apresente uma elevação no valor.

Para todas essas variáveis analisadas, de modo geral, quando aclimatizada aos 60 dias, a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico, não sendo observada diferença quanto ao tipo de luz. Para ambos os genótipos, a concentração de sacarose a 1,5% foi superior para a maioria das variáveis analisadas aos 60 dias. Ao que tudo indica, para essas cultivares e para um tempo maior de aclimatização, concentrações menores de sacarose no ambiente *in vitro* podem facilitar o desempenho *ex vitro*.

Uma gradual intensificação do FFF ainda na condição *in vitro*, simultaneamente à diminuição na concentração de sacarose nos meios de cultura, pode ser de grande utilidade na aclimatização, uma vez que esta alteração no ambiente de cultivo proporciona às plantas um metabolismo mais próximo da condição fotoautotrófica, contribuindo para a redução de perdas nas plantas cultivadas na condição *ex vitro* (Rocha et al., 2007).

Kozai et al. (1991) afirmam que, na presença de fontes externas de carbono para os explantes, as plantas não desenvolvem fotoautotrofismo, podendo causar crescimento reduzido, bem como resultar em morte durante a aclimatização. Isso porque o acúmulo de açúcares nas folhas inibe a fotossíntese. No entanto, diversos autores são contrários à ideia de redução da sacarose durante a micropropagação. Eles afirmam que os mecanismos pelos quais a concentração de carboidrato influencia na aclimatização não são muito claros. Portanto, manter os níveis de sacarose em torno de 3% na fase que antecede a aclimatização é recomendável, pois, desse modo, a planta acumularia reservas de energia para sobreviver melhor ao ambiente *ex vitro* (Capellades et al. 1990; Rocha et al., 2007).

Segundo Desjardins et al. (1995), a total remoção de carboidratos no meio de cultura para algumas espécies, frequentemente, torna-se prejudicial para o crescimento das plantas, o que pode prejudicar o processo de aclimatização. Nesta condição, durante o cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o fotoautotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte externa de carbono.

Neste presente experimento com as duas cultivares de abacaxizeiro, de um modo geral, a redução em 50% na concentração de sacarose praticamente

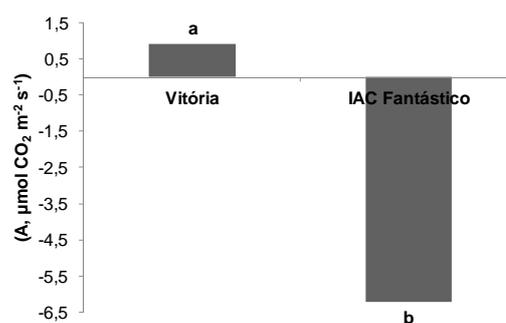
não influenciou no desempenho das plantas na condição *ex vitro*. Possivelmente, a baixa intensidade do FFF na condição *in vitro* comparada às condições *ex vitro*, neste experimento com abacaxizeiro, possa ter sido o fator principal da não-resposta das plantas aos tratamentos *in vitro*, quando as plantas foram cultivadas na condição *ex vitro*.

Aos 60 dias de aclimatização, as variáveis A e gs, medidas durante o dia, apresentaram diferença significativa para o fator genótipo, Figuras 24 e 25, e a variável E apresentou diferença significativa para genótipo e interação luz x genótipo (Figuras 26).

Quadro 5 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para as variáveis A, gs e E com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio		
		A	gs	E
Luz	1	27,454 ^{ns}	0,006 ^{ns}	62,500 ^{ns}
Resíduo a	8	8,809	0,031	6,110
Sac	1	0,004 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,121 ^{ns}
Luz x Sac	1	0,004 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,625 ^{ns}
Resíduo b	8	15,967	0,002	2,497
Gen	1	70,524*	0,342**	48,841**
Luz x Gen	1	40,628 ^{ns}	0,007 ^{ns}	61,009**
Sac x Gen	1	1,060 ^{ns}	0,001 ^{ns}	4,900 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	0,042 ^{ns}	0,019 ^{ns}	3,600 ^{ns}
Resíduo c	16	12,00	0,016	4,333
Total	39			
CV Luz		-49,48	11,35	64,65
CV Sac		-89,70	7,32	26,42
CV Gen		-194,64	47,24	22,02
MÉDIA		-1,78	0,273	9,45

^{ns} - Não significativo. **, * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Sac - Sacarose; Gen - Genótipo; Fotossíntese - A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Condutância estomática - gs ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Transpiração - E ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

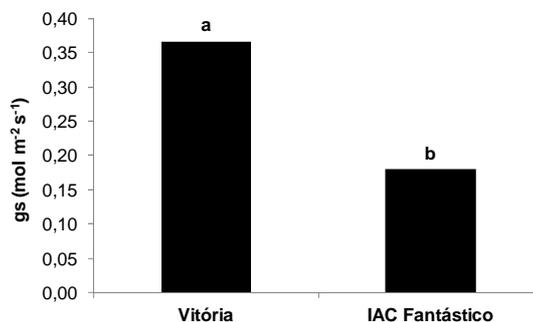


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 24 – Taxa fotossintética de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

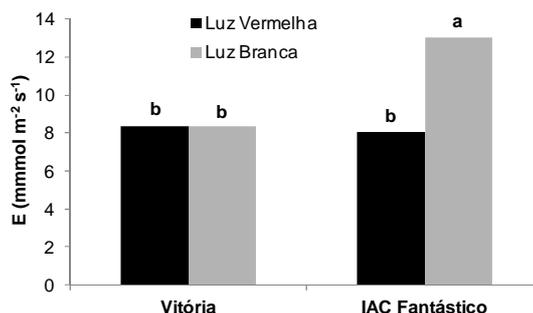
As mudas da cv. Vitória apresentaram assimilação fotossintética do carbono aos 60 dias de aclimatização em casa de vegetação e as mudas da cv.

IAC Fantástico somente respiravam, nas condições desse experimento, aos 60 dias.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 25 – Condutância estomática de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 26 – Transpiração de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

Aos 75 dias de aclimatização, as avaliações das trocas gasosas foram feitas em dois períodos - diurno, entre 07:00 e 10:00 h, e noturno, entre 20:30 e 23:30 h - para avaliar a existência do metabolismo tipo CAM, sendo o resumo da ANOVA mostrado nos Quadros 6 e 7.

Quadro 6 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para A, gs, e E no período diurno com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio		
		A	gs	E
Luz	1	0,618 ^{ns}	0,0707 ^{ns}	78,904 ^{ns}
Resíduo a	8	1,509	0,0846	46,459
Sac	1	0,157 ^{ns}	0,0068 ^{ns}	0,380 ^{ns}
Luz x Sac	1	0,001 ^{ns}	0,0717 ^{ns}	11,990 ^{ns}
Resíduo b	8	2,349	0,0161	8,024
Gen	1	103,314 ^{**}	0,00001 ^{ns}	16,770 ^{ns}
Luz x Gen	1	4,180 ^{ns}	0,0664 ^{ns}	15,500 ^{ns}
Sac x Gen	1	3,153 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	1,592 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	2,748 ^{ns}	0,0042 ^{ns}	6,544 ^{ns}
Resíduo c	16	1,444	0,1356	65,041
Total	39			
CV luz		22,86	21,15	49,74
CV Sac		35,60	40,25	85,91
CV Gen		182,25	92,90	86,34
MÉDIA		0,66	0,40	9,34

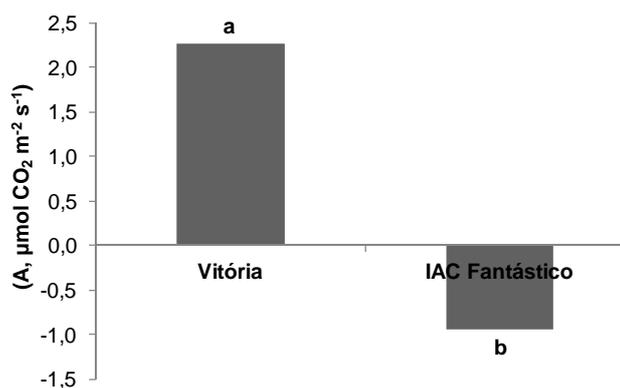
^{ns} - Não significativo. ^{**}, ^{*} - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Sac - Sacarose; Gen - Genótipo; Fotossíntese - A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Condutância estomática - gs ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Transpiração - E ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Quadro 7 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para A e E no período noturno com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		A	E
Luz	1	5,578 ^{ns}	111,370 ^{**}
Resíduo a	8	3,659	6,566
Sac	1	11,530 ^{ns}	0,453 ^{ns}
Luz x Sac	1	3,533 ^{ns}	0,570 ^{ns}
Resíduo b	8	2,733	20,463
Gen	1	50,648 ^{**}	11,900 ^{**}
Luz x Gen	1	7,413 ^{ns}	11,900 ^{**}
Sac x Gen	1	10,159 ^{ns}	3,300 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	0,649 ^{ns}	3,300 ^{ns}
Resíduo c	16	2,443	1,144
Total	39		
CV luz		39,34	4,69
CV Sac		29,38	14,62
CV Gen		-167,59	7,64
MÉDIA		-0,93	13,99

^{ns} - Não significativo. **, * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Sac - Sacarose; Gen - Genótipo; Fotossíntese - A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Transpiração - E ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

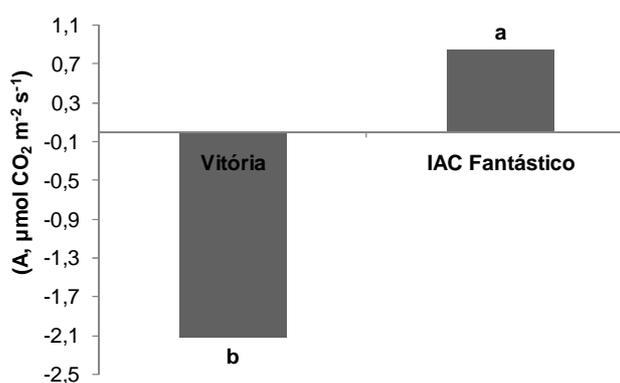
O Quadro 7 mostra que a variável A apresentou diferença significativa para o fator genótipo, e as outras variáveis não apresentaram diferença significativa. A Figura 27 mostra a taxa fotossintética medida durante o dia, aos 75 dias. Nesta avaliação diurna realizada aos 75 dias de aclimatização, a cv. Vitória mostrou assimilação fotossintética do carbono positiva e a cv. IAC Fantástico não apresentou assimilação fotossintética. Em relação à avaliação desta variável aos 60 dias, verifica-se a mesma resposta entre os genótipos (Figura 24).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

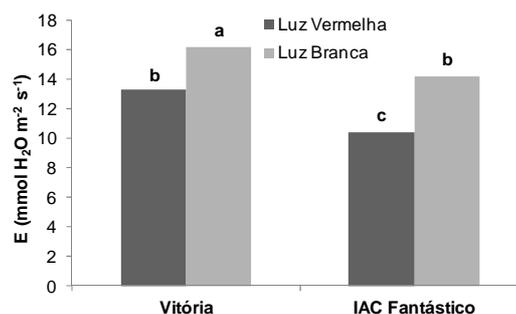
Figura 27 – Valores da assimilação fotossintética do carbono em folhas de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico', na avaliação diurna, aos 75 dias de aclimatização.

A Figura 28 mostra a diferença significativa entre os genótipos para a variável A determinada aos 75 dias, no período noturno. Para a cv. IAC Fantástico, a assimilação fotossintética do carbono foi positiva e para a cv. Vitória, negativa.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 28 – Valores da assimilação fotossintética do carbono em folhas de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico', na avaliação noturna, aos 75 dias de aclimatização.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 29 – Transpiração de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’, no período noturno, aos 75 dias de aclimatização.

Nas condições desse experimento, as plantas da cv. Vitória apresentaram assimilação fotossintética do carbono aos 60 dias de aclimatização (DA) em casa de vegetação, enquanto as mudas da cv. IAC Fantástico somente apresentaram uma respiração escura (Figura 24). Nesta época (60 DA), a medida das trocas gasosas foi feita pela manhã, o que mostrou que a planta da cv. Vitória apresentou o metabolismo do tipo C₃, pois esta cultivar apresentou abertura estomática neste período do dia (Figura 25). Contudo, neste horário, a cv. IAC Fantástico não apresentou assimilação do CO₂. Como as mudas da cv. IAC apresentaram uma adequada eficiência fotoquímica, a não-assimilação de CO₂ por esta cultivar neste horário da manhã possa ser devida ao metabolismo do tipo CAM, apresentado por esta cultivar (Zhu et al, 2005). A assimilação fotossintética do carbono das mudas da cv Vitória contribuiu para o maior crescimento desta cultivar aos 60 DA (Figura 24). Nesta época, bem como aos 75 DA, a baixa taxa de crescimento verificada nas plantas da cv. IAC Fantástico talvez seja devida a uma possível assimilação de CO₂ no período da noite, o que pode relatar um possível metabolismo ácido das crassuláceas nesta espécie. De fato, as plantas do metabolismo tipo CAM apresentam uma baixa assimilação fotossintética noturna (Nobel, 1991), o que poderia explicar a baixa taxa de crescimento das plantas da cv. IAC Fantástico nesta época. Realmente, ao se observar a Figura 27, verifica-se que, durante o dia, aos 75 DA, as mudas da cv. IAC Fantástico não apresentaram assimilação fotossintética do carbono, e à noite, Figura 28, esta cultivar apresentou assimilação fotossintética. Uma resposta inversa foi apresentada pela cultivar Vitória. Nestas condições, pode-se relatar que a cv. IAC

Fantástico experimentou um maior nível de estresse térmico e/ou hídrico, o que proporcionou a esta cultivar atuar como planta do metabolismo CAM, enquanto a cv. Vitória não experimentou os níveis de estresse. Tal resposta pode mostrar certa tolerância da cv. Vitória aos estresses hídrico e térmico por alta temperatura. Essa plasticidade fenotípica é característica do abacaxizeiro, ou seja, é uma espécie que apresenta CAM facultativo, podendo mudar para a assimilação fotossintética do tipo C_3 quando as condições ambientais, sobretudo o suprimento hídrico, forem favoráveis ao crescimento da espécie (Almeida e Reinhardt, 1999).

Apesar de ser altamente eficiente quanto ao consumo de água, o metabolismo do tipo CAM, ao limitar a perda de vapor d'água por meio dos estômatos, também limita a entrada de CO_2 por eles, resultando numa taxa de assimilação fotossintética inferior à das plantas mesofíticas com o metabolismo C_3 ou C_4 . O CAM é, portanto, uma adaptação que permite a continuação do crescimento, embora lento, e a sobrevivência do abacaxizeiro em condições de déficit hídrico severo. Contudo, nessas condições, observa-se uma baixa produtividade da planta (Almeida e Reinhardt, 1999).

Como demonstrado, as condições ambientais da casa de vegetação durante a aclimatização, com alta temperatura diurna, volume pequeno de substrato, umidade relativa baixa e alto fluxo de fótons fotossintéticos, Figura 4, podem ter causado estresse à cv. IAC Fantástico, o que levou essa cultivar a apresentar o metabolismo tipo CAM. A cv. Vitória demonstrou ser mais tolerante a essas condições ambientais.

Em mudas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne cultivadas *in vitro*, Nievola et al. (2005) compararam a fixação do carbono a uma temperatura constante de 28 °C em um ambiente, e no outro, com temperatura de 28 °C diurna e 15 °C noturna, ambos com fotoperíodo 16:8. Estes autores verificaram que as plantas do segundo ambiente apresentaram índice de suculência duas vezes maior e também maior acidez titulável noturno devido à atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase). Os autores relataram que tal resposta indicou o metabolismo do tipo CAM, além de as folhas da espécie apresentarem características histológicas típicas de plantas CAM. As plantas do primeiro ambiente não apresentaram variação do conteúdo de acidez, além de terem maior crescimento do que as demais plantas (28/15°C). Esta resposta mostrou que tais plantas apresentaram o metabolismo do tipo C_3 . Esses autores

concluíram que a temperatura é um fator do ambiente de grande importância na determinação do tipo de via de assimilação de carbono em plantas de abacaxi cultivadas *in vitro*. Com base nos resultados deste experimento com duas cultivares de abacaxizeiro, pode-se relatar que temperaturas supraótimas também podem alterar o tipo de metabolismo nesta espécie.

Embora não se tenha feito a determinação das trocas gasosas das plantas cultivadas em condição *in vitro* na luz e no escuro para verificar o tipo de metabolismo, pode-se especular que a cv. Vitória tenha respirado menos *in vitro*, possivelmente via metabolismo C₃, pois, segundo Aragón et al. (2011), as condições ambientais *in vitro*, com baixo FFF e alta umidade, favorecem o estabelecimento do metabolismo C₃.

Aragón et al. (2011), em estudos com abacaxizeiro cv. Gold, avaliaram a plasticidade do metabolismo das plantas nos primeiros 60 dias de aclimatização. Para tanto, produziram as mudas *in vitro* em baixo FFF e alta umidade, utilizando biorreatores de imersão temporária. Estes autores verificaram que as mudas apresentaram o metabolismo do tipo C₃. Ao levar as mudas para aclimatização, separaram em dois grupos, um grupo cresceu com baixo FFF e alta umidade relativa e outro, com alto FFF e baixa umidade relativa, respectivamente, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 85% e 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 50%. Por meio da análise da taxa fotossintética e do conteúdo de PEPCase, os resultados demonstraram que as plantas do segundo ambiente apresentaram o metabolismo do tipo CAM devido ao estresse causado pelas condições ambientais impostas. As mudas do primeiro ambiente (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 85%) mostraram o metabolismo do tipo C₃, pois cresceram mais e tiveram um bom enraizamento. Esses autores relataram que as boas condições ambientais mantidas durante as fases iniciais da aclimatização são importantes para ter mudas com padrão de qualidade e altamente produtivas.

Portanto, constata-se que a cv. Vitória apresentou o metabolismo C₃ e a cv. IAC Fantástico o metabolismo CAM. Tal fato pode ser verificado pela superioridade da cv. Vitória em praticamente todas as análises feitas durante os 75 dias de aclimatização.

Aos 60 DA, a condutância estomática (gs) medida no período da manhã apresentou diferença significativa entre os genótipos (Figura 25). As mudas da cv. Vitória apresentaram maior condutância estomática do que as mudas da cv. IAC Fantástico. Percebe-se que, em relação à cv. Vitória, a cv. IAC Fantástico

apresentou uma condutância estomática reduzida, caracterizando o metabolismo CAM, uma vez que tal metabolismo está associado à redução da condutância estomática durante o dia.

A variável E, aos 60 DA, Figura 26, foi significativa para luz, genótipo e para a interação luz x genótipo. A cv. IAC Fantástico apresentou maior valor de E em relação à cv. Vitória, sendo que para a cv. IAC Fantástico as plantas que vieram da condição de luz branca apresentaram maior transpiração. Mesmo apresentando uma condutância menor, a cultivar IAC apresentou maior transpiração. Essa resposta diferencial pode ser devida a alterações na temperatura da folha desta cultivar pela coloração da folha, posição ou presença de pelos. Tais características podem alterar a absorção da energia luminosa.

Aragón et al. (2006), avaliando as características fisiológicas de bananeira durante a aclimatização, observaram uma diminuição da taxa fotossintética das mudas após 35 dias de aclimatização. Os autores relataram que as mudas atingiram o desenvolvimento máximo até esse período. A partir desta data, houve limitação do crescimento radicular devido ao reduzido volume do recipiente, tendo os autores sugerido que as plantas produzidas na condição *in vitro* devem ser transferidas para recipientes maiores para que o crescimento seja restabelecido.

A qualidade e a intensidade de luz, o fotoperíodo, a temperatura, a umidade e a fonte de carbono são determinantes no crescimento e no desenvolvimento de plantas *in vitro*. Estas condições ambientais podem interferir no número de folhas, no teor de clorofila, na densidade estomática e na taxa fotossintética durante a fase de aclimatização (Desjardins et al., 1995; Lian et al., 2002).

Debergh (1991) afirma que, para o sucesso da aclimatização, a luz e a umidade do ambiente *in vitro* devem ser monitoradas cuidadosamente. A adaptação dessas plantas depende do ajuste da maquinaria fotossintética, de modo que a luminosidade seja utilizada da maneira mais eficiente possível. Por essa razão, o sucesso na adaptação de uma espécie a ambientes com baixa ou alto FFF pode ser baseado na eficácia e na rapidez dos padrões de alocação e no metabolismo fotossintético ajustados em ordem para aumentar a aquisição de recursos em um determinado ambiente.

De acordo com Sutter (1988), quando transferidas para aclimatização, as plantas enraizadas *in vitro* são submetidas a uma condição de alta transpiração

que está associada à alta demanda hídrica do ar em torno da planta, causada pela baixa funcionalidade ou ausência de controle estomático durante as primeiras semanas de aclimatização.

Percebe-se que, aos 60 dias, as mudas da cv. IAC Fantástico apresentaram maior sensibilidade ao estresse das condições *ex vitro* do que a cv. Vitória, pois, apesar de terem menor condutância estomática, transpiraram mais que a cv. Vitória. Como foi relatado, as mudas da cv. IAC Fantástico não apresentaram assimilação fotossintética do carbono durante as medidas diurnas e ainda tiveram menor condutância estomática, estando sob metabolismo tipo CAM. Embora não se tenha feito avaliação para comprovar a existência desse metabolismo aos 60 dias, a análise feita aos 75 dias, Figuras 25 e 26, comprovou a diferença dos tipos de metabolismo C_3 (cv.Vitória) e CAM (cv.IAC Fantástico).

O Quadro 8 mostra o resumo da ANOVA de algumas variáveis estudadas aos 75 dias.

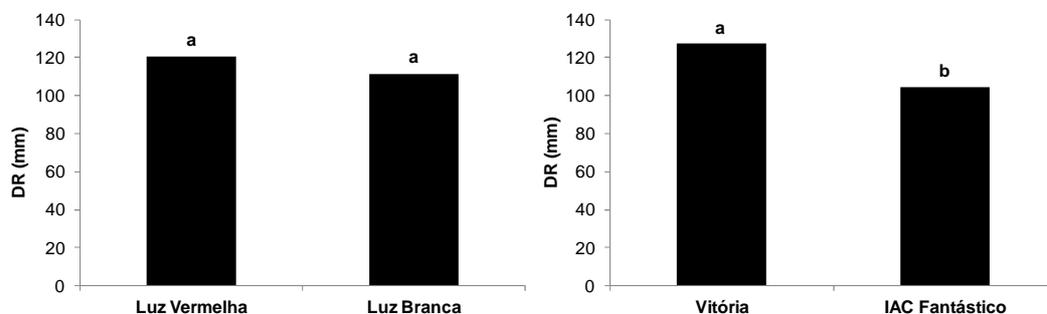
Quadro 8 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para algumas variáveis com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio						
		DR	AR	NF	VR	AF	MSF	MSR
Luz	1	1513,80**	148,51 ^{ns}	1,800 ^{ns}	0,006 ^{ns}	35951,08**	0,976**	1,449**
Resíduo a	18	375,45	127,39	2,466	0,219	286,86	0,021	0,005
Sac	1	26,45 ^{ns}	23,11 ^{ns}	0,450 ^{ns}	0,814*	0,07 ^{ns}	0,045 ^{ns}	0,032**
Luz x Sac	1	180,00 ^{ns}	70,31 ^{ns}	2,450 ^{ns}	0,002 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,015 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Resíduo b	18	306,86	48,79	3,227	0,137	246,70	0,007	0,010 ^{ns}
Gen	1	10672,20**	4758,61**	20,0**	3,132**	5545,16**	0,034 ^{ns}	1,772**
Luz x Gen	1	14,45 ^{ns}	32,51 ^{ns}	3,20 ^{ns}	0,424 ^{ns}	32449,20**	0,841**	1,247**
Sac x Gen	1	135,20 ^{ns}	0,11 ^{ns}	1,25 ^{ns}	1,019*	15,46 ^{ns}	0,027 ^{ns}	0,026**
Luz x Sac x Gen	1	832,05 ^{ns}	357,01 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,025 ^{ns}	14,22 ^{ns}	0,012 ^{ns}	0,002 ^{ns}
Resíduo c	36	144,11	111,53	3,141	0,152	302,37	0,013	0,005
Total	79							
CV Luz		32,3	24,5	16,33	25,17	57,15	6,36	22,72
CV Sac		26,4	9,41	21,37	15,74	49,15	21,21	45,45
CV Gen		10,35	20,37	11,73	44,65	34,64	34,48	33,8
MÉDIA		115,97	51,83	15,10	0,87	50,19	0,33	0,22

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio					
		MST	SPAD	F _v /F _m	PI	AREA	RC / ABS
Luz	1	36191,45**	0,471 ^{ns}	0,00102 ^{ns}	0,2160 ^{ns}	6393 ^{ns}	0,0100 ^{ns}
Resíduo a	18	74,41	8,679	0,00136	0,3708	1426	0,0446
Sac	1	227,51 ^{ns}	5,756 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,0890 ^{ns}	4451 ^{ns}	0,0304 ^{ns}
Luz x Sac	1	214,62 ^{ns}	1,584 ^{ns}	0,000005 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	5201 ^{ns}	0,0045 ^{ns}
Resíduo b	18	86,60	19,218	0,00024	0,1838	1714	0,0271
Gen	1	36546,84**	197,380**	0,01121**	0,2199 ^{ns}	3124 ^{ns}	0,0307 ^{ns}
Luz x Gen	1	36185,41**	2,941 ^{ns}	0,00005 ^{ns}	0,0784 ^{ns}	5449 ^{ns}	0,0089 ^{ns}
Sac x Gen	1	225,54 ^{ns}	18,682 ^{ns}	0,00023 ^{ns}	0,0875 ^{ns}	6080 ^{ns}	0,0221 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	214,01 ^{ns}	40,242 ^{ns}	0,00130 ^{ns}	0,3573 ^{ns}	1498 ^{ns}	0,0320 ^{ns}
Resíduo c	36	80,13	11,037	0,00028	0,2132	2119	0,0323
Total	79						
CV Luz		34,13	31,21	1,76	31,42	5,69	5,57
CV Sac		39,72	6,91	3,11	15,57	6,84	3,38
CV Gen		41,05	11,95	2,20	38,84	18,37	2,60
MÉDIA		21,80	27,80	0,77	1,18	250507	0,80

^{ns} - Não significativo. **, * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Gen - Genótipo; Sac - Sacarose; Diâmetro da roseta - DR (mm); Altura da roseta - AR (mm); Número de folhas - NF; Volume de raiz - VR (cm³); Área Foliar - AF (cm²); Massa da matéria seca da folha - MSF (g); Massa da matéria seca radicular - MSR (g); Massa da matéria seca total - MST (g); Massa foliar específica - MFE (g m⁻²); Intensidade do Verde - SPAD; Rendimento quântico máximo do fotossistema II - F_v/F_m; Índice Fotossintético - PI; Área sob a curva da fluorescência que estima o tamanho do 'pool' de plastoquinona do fotossistema II - AREA, Eficiência na absorção de luz pelo PSII - RC/ABS.

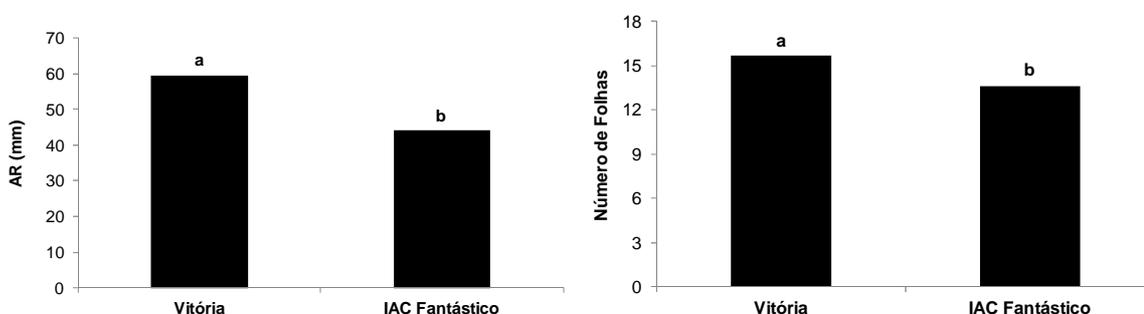
Aos 75 DA, a variável DR apresentou significância para os fatores luz e genótipo (Figura 30).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 30 – Diâmetro da roseta de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 75 dias de aclimatização.

As variáveis AR e NF foram significativas para genótipo (Figura 31).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

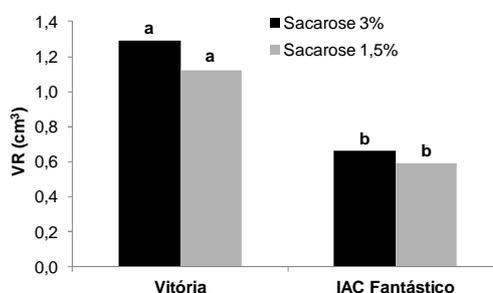
Figura 31 – Altura da roseta e número de folhas de mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico' aos 75 dias de aclimatização.

As Figuras 28 e 29 mostram que, para essas variáveis de crescimento, aos 75 de aclimatização, a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico. Observa-se que, ao longo dos períodos avaliados, 30, 60 e 75 DA, houve aumento dos valores de DR e/ou AR, sempre com a superioridade da cv. Vitória.

Esse valores de DR e NF foram superiores aos encontrados por Catunda et al. (2008). Estes autores avaliaram o efeito de brassinosteroides durante 150 DA do abacaxizeiro cv. Imperial, provenientes do cultivo *in vitro*. Aos 75 dias de aclimatização, os valores destas variáveis de crescimento obtidos neste experimento com as cultivares Vitória e IAC evidenciam sua superioridade em relação à cv. Imperial. Estes resultados revelam a excelente taxa de crescimento das destas duas cultivares.

Os valores de NF foram superiores aos encontrados por Souza Júnior et al. (2001), que, aos 90 dias de aclimatização do abacaxizeiro cv. Pérola, avaliaram o efeito de diferentes recipientes e substratos. Os autores encontraram o maior valor médio desta variável NF em mudas crescidas no substrato Plantmax® e em saco plástico como recipiente. Observa-se que os valores foram menores do que aqueles encontrados para as duas cultivares aos 75 dias de aclimatização.

Para a variável VR, foi observada diferença significativa para sacarose, genótipo e para a interação sacarose x genótipo (Figura 32).



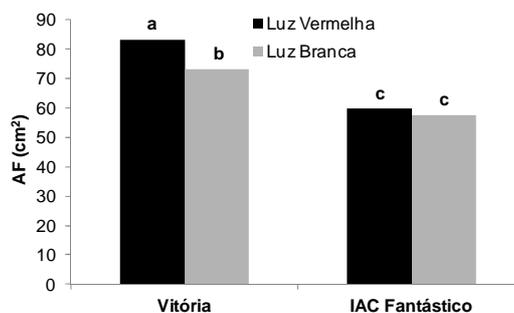
As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 32 – Volume de raiz e área foliar de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.

Ao observar a Figura 32, verifica-se que, aos 75 DA, a variável VR apresentou diferença significativa. Para essas variáveis, a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico, não sendo observada diferença para o fator sacarose dentro de cada cultivar. Se comparado com a avaliação anterior (60 DA), percebe-se que houve pouca diferença dos valores de VR para as duas cultivares em relação à

avaliação anterior. Este fato mostra que praticamente não houve crescimento do sistema radicular.

A AF foi significativa para luz, genótipo e para a interação luz x genótipo (Figura 33).

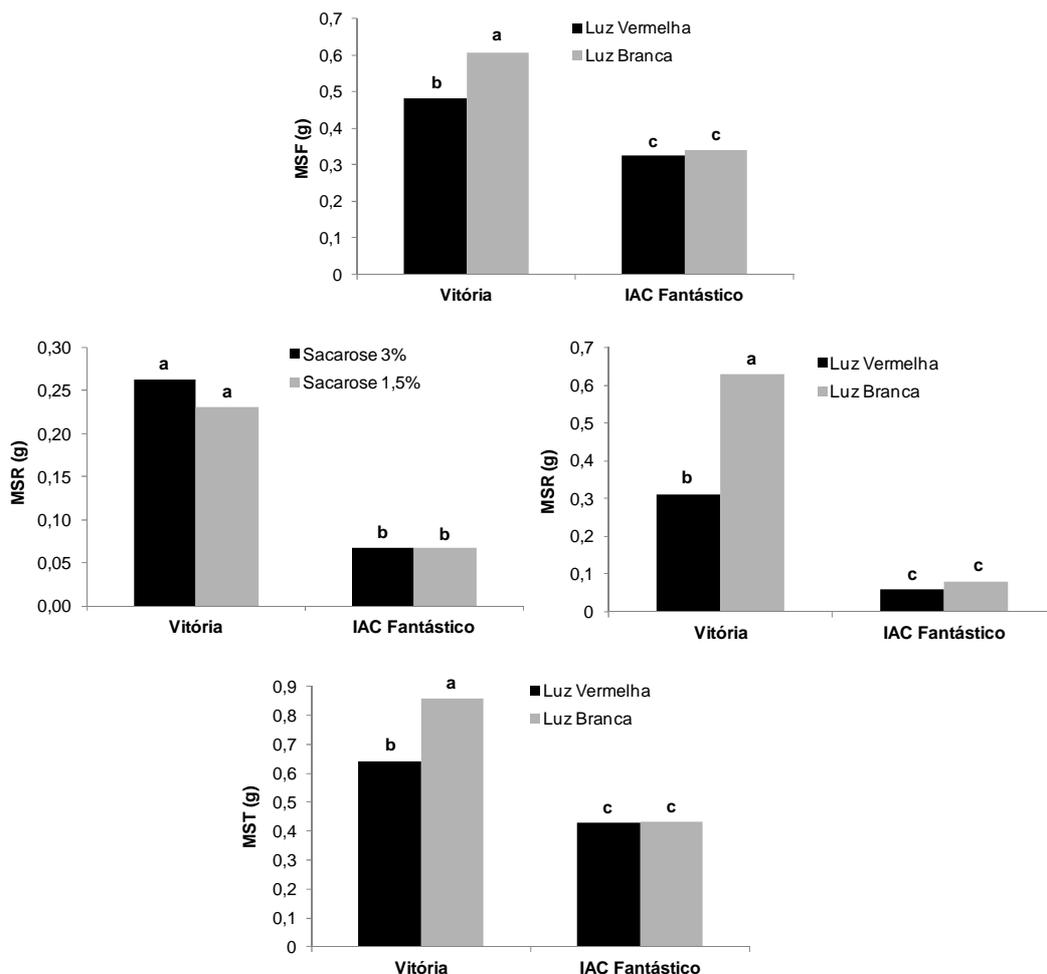


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 33 – Área foliar de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.

As mudas da cv. Vitória que vieram da condição *in vitro* sob luz vermelha apresentaram maior AF aos 75 DA. Para cv. IAC Fantástico, não houve diferença entre as luzes. Quando comparada à cv. IAC Fantástico, a AF da cv. Vitória não demonstrou o mesmo crescimento. Como a cv. Vitória apresentou maior crescimento aos 30 e 60, esta cv. já estaria sendo submetida ao efeito da restrição mecânica do sistema radicular.

A Figura 34 mostra a diferença significativa para MSF, MSR e MST.



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 34 – Massa da matéria seca foliar, radicular e total de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.

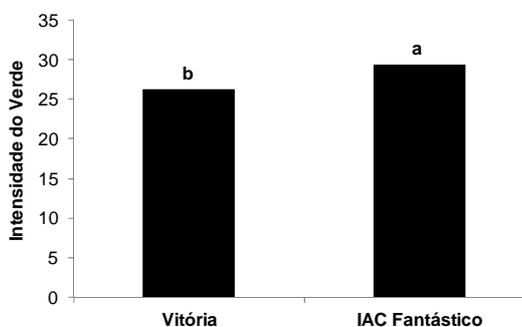
A MSF apresentou diferença significativa para os fatores luz e genótipo. A cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico, e para a cv. Vitória, as plantas que vieram de condições de luz branca *in vitro* apresentaram valores superiores. Para cv. IAC Fantástico, não houve diferença para o fator luz. Em relação às avaliações anteriores, essa variável apresentou valores maiores.

A MSR apresentou significância para luz, sacarose, genótipo e para as interações luz x genótipo e sacarose x genótipo. Para essa variável, a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico, não diferindo para o fator sacarose dentro da cada cultivar, e para o fator luz, as mudas que vieram da condição de luz branca *in vitro* foram superiores.

Para MST, houve significância para o fator luz e para a interação luz x genótipo, com a cv. Vitória superior à cv. IAC Fantástico e com superioridade das mudas que vieram da condição de luz branca *in vitro* na cv. Vitória.

Nas condições desse experimento, aos 75 dias de aclimatização, em comparação à cv. IAC Fantástico, a cv. Vitória mostrou maior crescimento, apresentando valores superiores de MSF e MSR, quando comparados aos valores observados por Catunda et al. (2008), que trabalharam com o abacaxizeiro cv. Imperial, aos 150 dias de aclimatização.

A intensidade do verde (SPAD) apresentou diferença significativa para o fator genótipo (Figura 35).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

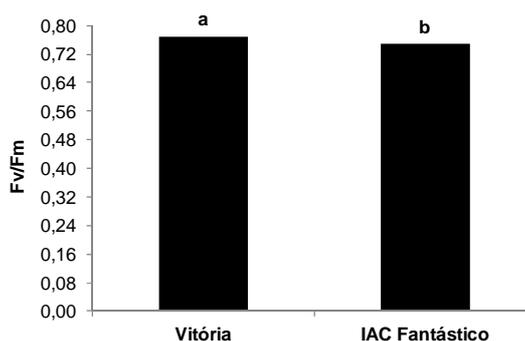
Figura 35 – Intensidade do verde (SPAD) de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.

Ao observar os valores de SPAD, nota-se que a cv. IAC Fantástico apresentou valores maiores do que a cv. Vitória, não sendo observada diferença significativa para tipo de luz e concentração de sacarose. É importante analisar que, aos 75 dias de aclimatização, a cv. Vitória apresentou valores inferiores de SPAD em relação aos encontrados na avaliação de 30 dias, ocorrendo o contrário com a cv. IAC Fantástico. Tal fato pode mostrar que, devido ao maior crescimento da cv. Vitória, esta cv já estaria sendo submetida ao estresse proporcionado pelo confinamento do sistema radicular. Esta resposta pode ser de extrema importância para os produtores de mudas que utilizam bandejas do tipo poliestireno expandido, que apresentam reduzido volume de substrato. Tais

produtores necessitam rever o processo de propagação das mudas de modo a permitir o uso de recipientes com maior volume e maior crescimento do sistema radicular.

Contudo, Pospisilova et al. (2000) afirmam que é comum o acréscimo no conteúdo de clorofila nas mudas durante a aclimatização dependendo das condições ambientais em que essas são mantidas. Segundo Sandoval et al. (1994), durante a fase de aclimatização, o aumento de luminosidade faz com que as folhas adquiram coloração verde-escura mais intensa pelo acréscimo no conteúdo de pigmentos e pela diferenciação do mesófilo. Estas alterações podem ter ocorrido na cv. IAC Fantástico.

Com relação à eficiência fotoquímica do PSII (F_v/F_m), esta característica apresentou diferença significativa para o fator genótipo (Figura 36).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 36 – Eficiência fotoquímica de mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 75 dias de aclimatização.

As mudas da cv. Vitória apresentaram maior valor de F_v/F_m do que as mudas da cv. IAC Fantástico. Contudo, em ambas as cultivares, esses valores estão dentro da faixa considerada normal, sem comprometimento do aparato fotossintético (0,75 - 0,85) (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989). Este resultado mostra que, embora a cv. Vitória tenha possivelmente sido submetida a um estresse moderado, por meio da redução nos valores da intensidade de verde, tal redução na concentração de clorofilas, avaliada pela leitura do medidor portátil de

clorofilas, não foi suficiente para causar danos na eficiência fotoquímica máxima do PSII.

Couto et al. (2011) também não observaram comprometimento da eficiência fotoquímica (F_v/F_m) em mudas de abacaxizeiro cv. Vitória após 90 dias de aclimatização. Entretanto, Toyoda et al. (2010), avaliando F_v/F_m e SPAD durante a aclimatização de abacaxizeiro cv. Gold, constataram redução dessas variáveis aos 90 dias de aclimatização, relatando que essa queda se deu, provavelmente, por causa da restrição de crescimento do sistema radicular, possivelmente associado ao reduzido volume das células da bandeja.

O estado nutricional do abacaxizeiro tem uma larga influência no crescimento da planta e, conseqüentemente, na produção e na qualidade do fruto (Malézieux e Bartholomew, 2003). O abacaxizeiro é considerado uma planta muito exigente em nutrientes, extraído do substrato de crescimento, macronutrientes e micronutrientes na seguinte ordem: K, N, Ca, Mg, S, P, Mn, Fe, Zn, B, Cu e Mo (Paula et al., 1998).

De maneira geral, pode-se considerar que o N e P são os nutrientes mais absorvidos pelo abacaxizeiro. A influência do N é maior no peso do fruto e do K, na qualidade do fruto (Souza, 1999).

Com relação aos teores de macronutrientes das mudas aos 60 e 75 dias de aclimatização, os Quadros 9 e 10 mostram o resumo da ANOVA bem como as interações.

Quadro 9 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para macronutrientes com suas interações em abacaxizeiro aos 60 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		N	P	K	Ca	Mg
Luz	1	1,7393 ^{ns}	0,0123 ^{ns}	20,102 ^{ns}	0,2606	0,0255
Resíduo a	4	2,7295	0,0052	16,940	0,3579	0,3588
Sac	1	0,8951 ^{ns}	0,0013 ^{ns}	55,702 ^{ns}	0,6108 ^{ns}	2,3807*
Luz x Sac	1	1,3656 ^{ns}	0,010 ^{ns}	4,012 ^{ns}	1,9568*	0,5289 ^{ns}
Resíduo b	4	0,4825	0,0088	75,072	0,3469	0,4967
Gen	1	34,4760 ^{ns}	0,2747*	348,50**	10,3792**	15,0590**
Luz x Gen	1	0,5194 ^{ns}	0,0230 ^{ns}	125,350 ^{ns}	0,0415 ^{ns}	0,2950 ^{ns}
Sac x Gen	1	7,5971 ^{ns}	0,0005 ^{ns}	2,167 ^{ns}	0,1863 ^{ns}	0,4813 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	1,2572 ^{ns}	0,000004 ^{ns}	190,773 ^{ns}	0,4933 ^{ns}	0,2618 ^{ns}
Resíduo c	8	5,9380	0,0257	29,173	0,2645	0,3841
Total	23					
CV Luz		19,30	1,97	43,61	7,11	6,84
CV Sac		3,41	3,34	19,32	6,89	9,47
CV Gen		17,22	6,07	13,90	10,20	11,81
MÉDIA		14,14	2,63	38,84	5,03	5,24

^{ns} - Não significativo. **, * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Nitrogênio - N (g Kg⁻¹); Fósforo - P (g Kg⁻¹); Potássio - K (g Kg⁻¹); Cálcio - Ca (g Kg⁻¹) e Magnésio - Mg (g Kg⁻¹).

Quadro 10 – ANOVA dos fatores luz, concentração de sacarose e genótipo para macronutrientes com suas interações em abacaxizeiro aos 75 dias de aclimatização

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio				
		N	P	K	Ca	Mg
Luz	1	0,0042 ^{ns}	0,1089*	5,500 ^{ns}	0,2709 ^{ns}	1,1624 ^{ns}
Resíduo a	4	1,7010	0,0149	15,588	0,8012	0,4518
Sac	1	0,0210 ^{ns}	0,0368 ^{ns}	12,010 ^{ns}	0,0153 ^{ns}	0,1597 ^{ns}
Luz x Sac	1	1,5240 ^{ns}	0,0872 ^{ns}	24,879 ^{ns}	0,5508 ^{ns}	0,1610 ^{ns}
Resíduo b	4	0,3287	0,0135	55,591	0,6674	0,7241
Gen	1	1,8872 ^{ns}	0,2287**	65,663*	2,3002 ^{ns}	44,1350**
Luz x Gen	1	0,9266 ^{ns}	0,0276 ^{ns}	6,882 ^{ns}	0,2336 ^{ns}	0,2238 ^{ns}
Sac x Gen	1	0,00009 ^{ns}	0,0144 ^{ns}	45,144 ^{ns}	2,5977 ^{ns}	0,0001 ^{ns}
Luz x Sac x Gen	1	0,3978 ^{ns}	0,0075 ^{ns}	53,240 ^{ns}	0,0634 ^{ns}	0,2633 ^{ns}
Resíduo c	8	1,2759	0,0146	11,291	0,6646	0,2998
Total	23					
CV Luz		15,75	5,84	5,10	13,48	9,35
CV Sac		3,04	5,29	8,19	11,23	14,99
CV Gen		10,45	4,75	10,99	13,71	11,32
MÉDIA		10,80	2,55	30,55	5,94	4,83

^{ns} - Não significativo. **, * - Significativo pelo teste F a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente. CV (%) - Coeficiente de Variação; Sac - Sacarose; Gen - Genótipo; Nitrogênio - N (g Kg⁻¹); Fósforo - P (g Kg⁻¹); Potássio - K (g Kg⁻¹); Cálcio - Ca (g Kg⁻¹) e Magnésio - Mg (g Kg⁻¹).

Aos 60 e 75 dias de aclimatização e com relação ao nitrogênio, observa-se que este nutriente não apresentou diferença significativa para nenhum dos fatores e suas interações. Os teores de N aos 60 dias foram: para 'Vitória', de 12,94 g kg⁻¹, e para 'IAC Fantástico', de 15,34 g kg⁻¹; e aos 75 dias, para 'Vitória' foram de 10,52 g kg⁻¹, e para 'IAC Fantástico', de 11,08 g kg⁻¹).

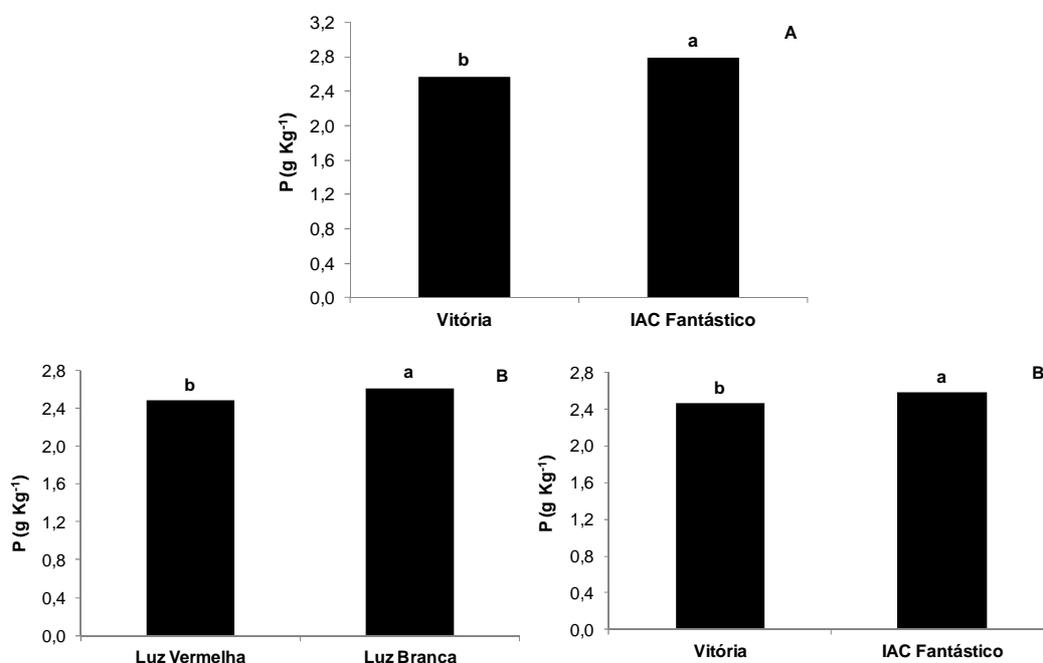
O nitrogênio é um dos nutrientes minerais mais importantes para as plantas, sendo considerado o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas (Raven et al., 2007). Observa-se que, aos 60 e 75 dias de aclimatização, a cv. IAC Fantástico apresentou teores foliares de N maiores que a cv. Vitória e, que, para as duas cultivares, os teores aos 75 dias apresentaram redução em relação à última avaliação.

A cv. IAC Fantástico apresentou valores de SPAD superiores à cv. Vitória. Essa maior intensidade do verde pode ser devida principalmente ao nitrogênio, componente principal das moléculas de clorofilas. De fato, existe uma alta

correlação entre N e a concentração de clorofilas nos tecidos foliares das plantas (Evans, 1989).

Nos primeiros meses de aclimatização, Ribeiro et al. (2011) avaliaram a contribuição das raízes previamente formadas de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória no crescimento e na absorção de nitrogênio. Estes autores relataram que a poda total ou parcial das raízes no momento do transplante das mudas micropropagadas reduziu o crescimento e a acumulação de N da parte aérea do abacaxizeiro e que a aplicação de N no transplante proporcionou maior crescimento da parte aérea do que a aplicação tardia de N. Os teores de N obtidos por esses autores foram: sem poda das raízes, de 19,8 g kg⁻¹; com meia-poda, de 19,8 g kg⁻¹; e com poda total de 16,1 g kg⁻¹. Estes teores foram superiores aos encontrados neste experimento, nos dois períodos avaliados. Contudo, devem ser levados em consideração o tipo de adubação, a quantidade aplicada e demais ações para se fazer uma comparação adequada.

Os teores de fósforo apresentaram diferença significativa entre os genótipos aos 60 e para luz e genótipo aos 75 dias de aclimatização (Figura 37).



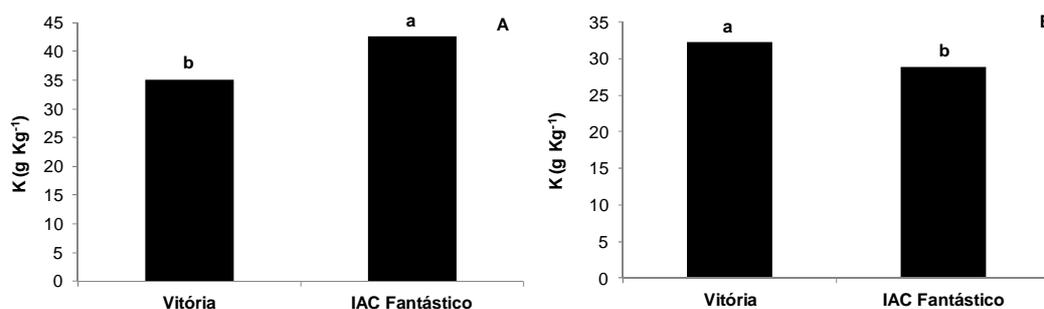
As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 37 – Teores de fósforo (g Kg⁻¹) em mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico'. (A) 60 dias de aclimatização e (B) 75 dias de aclimatização.

O maior teor de fósforo foi verificado para a cv. IAC Fantástico, tanto aos 60 dias, quanto aos 75 dias de aclimatização. Aos 75 DA, o teor foi significativo para o fator luz, sendo o maior valor encontrado nas mudas que vieram da condição *in vitro* sob luz branca.

De acordo com Raven et al. (2007), o P faz parte de compostos fosfatados (ATP e ADP), ácidos nucleicos, coenzimas e fosfolipídios. Malézieux e Bartholomew (2003) relatam que o abacaxizeiro é pouco exigente em fósforo, e a importância deste nutriente para a planta é principalmente na fase de diferenciação floral e no desenvolvimento do fruto.

O potássio apresentou diferença significativa para genótipo aos 60 e 75 dias de aclimatização (Figura 38).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

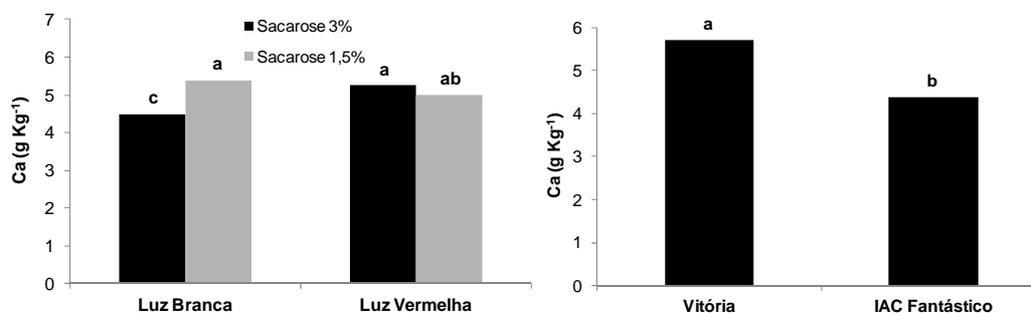
Figura 38 – Teores de potássio (g Kg^{-1}) em mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico'. (A) 60 dias de aclimatização e (B) 75 dias de aclimatização.

Aos 60 dias de aclimatização, os teores de K foram diferentes, sendo observados os maiores valores para a cv. IAC Fantástico. Aos 75 DA, foi observado o inverso, com o maior valor sendo observado para a cv. Vitória.

Observou-se que, tanto para o N quanto para o K, em ambas as cultivares, os valores destes nutrientes foram menores aos 75 DA do que aos 60 DA. Este resultado mostra os possíveis efeitos do confinamento do sistema radicular, uma vez que a restrição mecânica da raiz pode comprometer a absorção de nutrientes minerais (Hanson et al, 1987, Bar-Tal et al, 1996), bem como um menor volume de substrato pode ser mais susceptível à lixiviação de nutrientes móveis como o N e o K.

O potássio é um nutriente que está envolvido na abertura e fechamento dos estômatos, regula a osmose e o balanço iônico, além de ser um ativador de enzimas (Raven et al., 2007). Paula et al. (1991) relatam que a deficiência de potássio pode levar a perdas na produção e na qualidade do fruto pela grande importância desse elemento para o abacaxizeiro. Segundo Malézieux e Bartolomeu (2003), a deficiência de K^+ pode reduzir a fotossíntese, o crescimento da planta e o rendimento do fruto.

Com relação ao nutriente Ca, foi observada diferença significativa para a interação luz x sacarose e para genótipo aos 60 dias de aclimatização e não foi observada diferença significativa aos 75 dias de aclimatização (Figura 39).



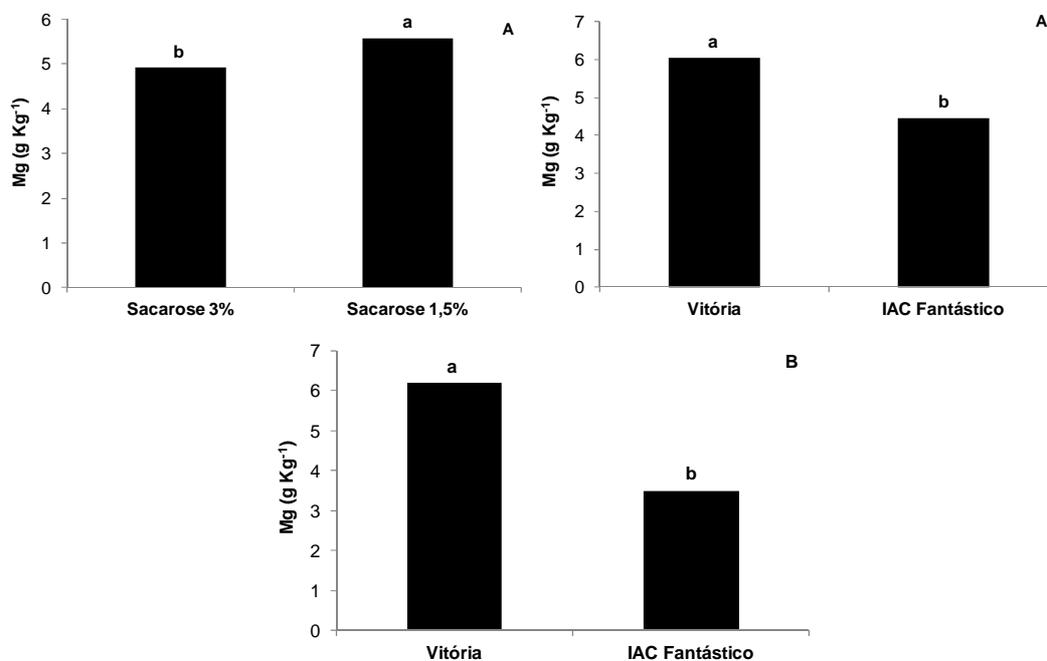
As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 39 – Teores de cálcio ($g\ Kg^{-1}$) em mudas dos abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘IAC Fantástico’ aos 60 dias de aclimatização.

Aos 60 dias de aclimatização, a cv. Vitória apresentou maiores teores de Ca do que a cv. IAC Fantástico. Para a luz vermelha não houve diferença entre a concentração de sacarose utilizada na condição *in vitro*, porém para a luz branca o maior valor foi encontrado na concentração de 1,5%.

O cálcio é o principal componente da parede celular, e o movimento deste nutriente para a parte aérea é favorecido pela transpiração (Raven et al., 2007). Durante a fase de aclimatização, a absorção de Ca é feita pelas raízes novas, daí a importância de se ter um bom espaço físico no recipiente de cultivo para que haja um bom volume radicular. Como a maior parte do Ca está na estrutura da parede celular, este nutriente tem uma baixa mobilidade, por isso, quando em deficiência, os sintomas aparecem nas folhas novas (Prado, 2008).

O teor de Mg mostrou-se contraditório, pois aos 60 dias de aclimatização ele foi significativo para genótipo e sacarose e aos 75 dias de aclimatização, para genótipo e luz (Figura 40).



As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Figura 40 – Teores de magnésio (g Kg^{-1}) em mudas dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico'. (A) 60 dias de aclimatização e (B) 75 dias de aclimatização.

Os teores de Mg aos 60 dias de aclimatização foram superiores para a cv. Vitória e foi observado maior teor nas plantas que vieram da condição *in vitro*, com 1,5% de sacarose para ambas as cultivares. Aos 75 dias de aclimatização, foram observados maiores valores para a cv. Vitória.

O Mg é componente presente na molécula de clorofila. Esse nutriente ativa um grande número de enzimas e facilita a absorção de outros nutrientes, principalmente o P. Quanto maior a concentração de Mg próxima à raiz, mais ele pode ser absorvido (Raven et al., 2007). Por ser componente da clorofila, a deficiência de Mg poderá reduzir a concentração deste pigmento fotossintético, reduzindo a fotossíntese e, possivelmente, o crescimento da planta (Malézieux e Bartholomew, 2003).

O fato de a cv. Vitória ter apresentado teores menores para alguns nutrientes pode indicar que, como esta cultivar apresentou maior crescimento na fase de aclimatização, pode ter ocorrido uma espécie de efeito de diluição dos nutrientes nas folhas dessa cultivar, que no caso da cv. IAC Fantástico, podem ter ficado mais concentrados, por isso apresentando maior valor nas folhas.

A análise foliar é um método muito utilizado na avaliação do estado nutricional das plantas. O uso da folha justifica-se por ser o órgão que melhor reflete o estado nutricional da planta (Malavolta et al., 1997). Na condição de mudas jovens de abacaxizeiro em fase de aclimatização, não existe uma padronização quanto à parte da planta que será analisada e quanto à época a ser coletada a amostra. A maioria das metodologias sobre a diagnose nutricional é estabelecida para as plantas adultas no campo de produção, existindo pouca informação a respeito da análise nutricional de mudas na aclimatização.

Em plantas bem crescidas/desenvolvidas, por meio de várias amostragens das partes da planta adulta, Siebeneichler et al. (2002) visaram a esclarecer a variação da composição mineral da folha do abacaxizeiro. Estes autores relataram que a variação dos teores dos nutrientes ao longo da folha “D” do abacaxizeiro não permite que sejam comparadas as análises feitas com diferentes partes da folha. Eles afirmaram ainda que uma comparação confiável pode ser estabelecida entre análises feitas com a folha “D” inteira e a porção clorofilada desta folha e que realmente existe necessidade de padronização da amostragem foliar quanto à parte de folha a ser analisada.

Diante do exposto, mais investigações devem ser feitas no sentido de quantificar a utilização dos macronutrientes durante a fase de aclimatização, de maneira que a quantidade do nutriente fornecido às mudas não seja um fator limitante ao crescimento/desenvolvimento das plantas nessa fase, ou em alguma fase posterior.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, objetivou-se estudar sob cultivo *in vitro* e *ex vitro*, fase de aclimatização, as possíveis variações entre genótipos relacionadas à capacidade fotossintética, às relações hídricas, ao estado nutricional e ao crescimento dos abacaxizeiros 'Vitória' e 'IAC Fantástico', em resposta a alterações do ambiente *in vitro* por meio da utilização de diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. Tal estudo foi uma tentativa de otimizar a micropropagação destas cultivares, bem como tentar compreender as respostas fotossintéticas e de crescimento destes genótipos nas condições de estudo relatadas. Nas condições *in vitro*, verificou-se que na presença de luz vermelha a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico para algumas características relacionadas à capacidade fotossintética, como SPAD, eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, área sob a curva e RC/ABS. Observou-se que, com a adição da sacarose ao meio de cultura como fonte de carbono (15 g L^{-1} ou 30 g L^{-1}), não foi verificada assimilação fotossintética *in vitro*. Neste experimento, a tentativa de ventilar os frascos de cultivo, ou seja, melhorar as trocas gasosas, não foi suficiente para otimizar a assimilação fotossintética *in vitro* das duas cultivares em estudo. Foram observadas diferentes respostas das duas cultivares para as avaliações da capacidade fotossintética aos 30, 60 e 75 dias, sendo que para a maioria delas a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico. Nas avaliações de crescimento, a cv. Vitória foi superior à cv. IAC Fantástico em todo o período, e tal fato foi constatado aos 75 dias, em que se verificou que a cv. Vitória

apresentou o metabolismo tipo C₃ e a cv. IAC Fantástico, o metabolismo tipo CAM. Nessa condição *ex vitro*, o metabolismo C₃ das plantas da cv. Vitória pode ter contribuído para o maior crescimento dessa cultivar. Nessa fase, os teores de macronutrientes foram variáveis entre as cultivares, demonstrando a necessidade de pesquisas relacionadas à nutrição de plantas em fase de aclimatização. Neste experimento, não houve relação entre os tratamentos aplicados na condição *in vitro* e a resposta dos genótipos na condição *ex vitro*, o que mostra que alterações deverão ser feitas no ambiente *in vitro*, como maior redução na concentração de sacarose, incremento na intensidade de luz vermelha e elevação na concentração de CO₂ nos frascos de cultivo, para que estas cultivares possam apresentar o metabolismo fotoautotrófico já na condição *in vitro*. Tal alteração neste ambiente *in vitro* será fundamental para a otimização do crescimento na fase de aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, O.A., Reinhardt, D.H.R.C. (1999) Irrigação. *In*: Cunha, G.A.P., Cabral, J.R.S., Souza, L.F.S. (Org.). *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 203-227.
- Almeida, O.A.; Souza, L.F.S, Reinhardt, D.H., Caldas, R.C. (2002) Influência da irrigação no ciclo do abacaxizeiro cv. Pérola em área de Tabuleiro Costeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(2):431-435.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M. (1995) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 500 p.
- Amâncio, S., Rebordão, J.P., Chaves, M.M. (1999) Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 58:31-37.
- Anna, W., Young, C.C., An, W., Cy, C. (1999) Effect of photosynthetic foton flux density and sucrose on the photoautotrophy of rose explants *in vitro*. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 45(4):345-352.
- Antunes, F., Mendes, P.S., Araújo, W.F., Chagas, E.A., Donini, L.P., Couceiro, M.A. (2010) Efeito da ventilação no frasco e concentração da sacarose no cultivo *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus*). *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura*, Natal-RN.
- Aragón, C.E., Escalona, M., Capote, I., Pina, D., Cejas, I., Rodriguez, R., Canãl, M.J., Sandoval, J., Roels, S., Debergh, P., Gonzales-olmedo, J. (2005) Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (MUSA AAB) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41:550-554.

- Aragón, C., Escalona, M., Capote, I., Pina, D., Cejas, I., Rodríguez, R., Noceba, C., Sandoval, J., Roels, S., Debergh, P., González-Olmedo, J.L. (2006) Metabolic importance of starch in the acclimation of plantain 'CEMSA 3/4' (AAB) plants. *InfoMusa*, 15(1-2):32-35.
- Aragón, C.E., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M.J., Capote, I., Pina, D., González-olmedo, J. (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46:89-94.
- Aragón, C.E., Carvalho, L., González, J., Escalona, M., Amâncio, S. (2011) The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C₃ is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Reports*, Springer.
- Aradhya, M.K., Zee, F., Manshardt, R.M. (1994) Isoenzyme variation in cultivated and wild pineapple. *Euphytica*, Dordrecht, 79:87-99.
- Bandeira, J.M., Lima, C.S.M, Rubin, S., Ribeiro, M.V., Falqueto, A.R., Peters, J.A, Braga, E.J.B. (2007) Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5, suplemento, 2:472-474.
- Barreira Neto, M., Santos, E.S. (1999) *Abacaxicultura: contribuição tecnológica*. Documentos, 26, João Pessoa-PB, 95 p.
- Bar-Tal, A., Pressman, E. (1996) Root restriction and potassium and calcium solution concentrations affect dry-matter production, cation uptake, and blossom-end rot in greenhouse tomato. *Journal American Society Horticulturæ Science*. 121(4):649-655.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Oquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Öquist, G (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. *In*: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (eds), *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a Field and Laboratory Manual*, Chapman & Hall, London. p.193-206.
- Bomfim, G.V., Azevedo, B.M., Viana, T.V.A., Furlan, R.A., Carvalho, A.C.P.P. (2011) Aclimatização *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes frequências de irrigação. *Irriga*, Botucatu, 16(1):104-114.
- Botella, J.R., Smith, M, (2008) Genomics of pineapple, crowning the king of tropical fruits. *In*: Moore PH, Ming R (eds) *Plant genetics/genomics: genomics of tropical crop plants*. Springer, USA, p.441-451.

- Bateson, J.M., Grout, B.W.W., Lane, S. (1987) The influence of container dimensions on the multiplication rate of regenerating. *Plant Cell Cultures*, 275-277.
- Braga, F.T., Pasqual, M., Castro, E.M., Rafael, G.C. (2011) Características morfofisiológicas de abacaxizeiro 'Gomo de Mel' enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(2):551-557.
- Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Coppens d'eeckenbrugge, G. (1997) Segregation for resistance to fusariose, leaf margin type, and leaf colour from the EMBRAPA pineapple hybridization programme. *Acta Horticulturae*, Wageningen, 425:193-200.
- Cabral, J.R.S., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Matos, A.P. (2000) Introduction of selfing in pineapple breeding. *Acta Horticulturae*, Wageningen, 529:165-168.
- Cabral, J.R.S., Souza, A.S., Matos, A.P., Caldas, R.C. (2003) Efeito da autofecundação em cultivares de abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(1):184-185.
- Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Coppens d'Eeckenbrugge, G. (2005) Variation for main quantitative traits in the seedling and vegetative cycles of the Embrapa pineapple hybridization program. *Acta Horticulturae*, Wageningen, 666:83-92.
- Cabral, J.R.S., Ledo, C.A.S., Caldas, R.C., Junghans, D.T. (2009a) Variação de caracteres em híbridos de abacaxizeiro obtidos de diferentes cruzamentos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 31(4):1129-1134.
- Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Junghans, D.T., Souza, F.V.D. (2009b) Pineapple genetic improvement in Brazil. *Acta Horticulturae*, 822:39-46.
- Campos, P.S., Pais, M.S. (1990) Mass propagation of the dwarf rose cultivar "Rosamin". *Scientia Horticulturae*, 43:321-330.
- Campostrini, E., Otoni, W.C. (1996) Aclimatização de plantas: abordagens recentes. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abctp25.htm>, em 12/01/2011, página mantida pela ABCTP.
- Campostrini, E., Teixeira, J.B., Cruz, A.R.R., Yamanishi, O.K. (1999) Efeito da concentração de CO₂ e do teor de sacarose no crescimento de plântulas de abacaxi (*Ananas comosus* [L.] Merrill) cultivadas *in vitro*. *Anais do Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, 7, Brasília: SBFV, v.11, p.33-33.
- Capellades, M., Fountarnau, R., Carulla, C., Debergh, P. (1990) Environment Influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 115(1):141-145.

- Carlier, J.D., Sousa, N.H., Espírito Santo, T., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leitão, J.M. (2010) A genetic map of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) including SCAR, CAPS, SSR and EST-SSR markers. *Molecular Breeding*, 29(1):245-260.
- Carvalho, L.C., Osório, M.L., Chaves, M.M.; Amâncio, S. (2001) Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 67:271-280.
- Cassana, F.F., Braga, E.J.B., Bacarin, M.A., Falqueto, A.R., Peters, J.A. (2008) Atividade fotoquímica máxima do fotossistema II em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, 14:4-4.
- Catunda, P.H.A., Marinho, C.S., Gomes, M.M.A., Carvalho, A.J.C. (2008) Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, 30(3):345-352.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Duval, M.F., Van Miegroet, F. (1993) Fertility and self-incompatibility in de genus *Ananas*. *Acta Horticulturae*, 334:45-51.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Duval, M.F. (1995) Bases genéticas para definir una estrategia de mejoramiento de la piña. *Revista de la Facultad de Agronomia*, Maracay, 11(3/4):95-118.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leal, F. (2003) Morphology, anatomy and taxonomy. In: Bartholomew, D.P. (org) *The pineapple - botany, production and uses*. Oxon: CABI, p.13-32.
- Costa, F.H.S., Pereira, J.E.S., Pasqual, M., Castro, E.M., Santos, A.M. (2009) Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. *Ciência Rural*, 39(3):742-748.
- Couto, T.R. Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Torres Netto, A., Campostrini, E. (2011) Características biométricas e eficiência fotoquímica durante a aclimatização de mudas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23 (Suplemento):97-98.
- Cournac, L., Dimon, B., Carrier, P., Lohou, A., Chagvardieff, P. (1991) Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO₂ enrichment. *Plant Physiology*, 97:112-117.
- Cui, Y.Y., Hahn, E.J., Kozai, T., Paek, K.Y. (2000) Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 62(3):219-226.

- Cunha, G.A.P. (1999) 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.
- Cunha, G.A.P. (2007) *Equipe técnica de abacaxi comemora 30 anos de atividades e realizações*. Documentos, 170. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 20p.
- Cuzzuol, G.R.F., Gallo, L.A., Almeida, M., Crocomo, O.J. (1995) Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, 52(3).
- Chang, H.S., Chakrabarty, D., Hahn, E.J, Paek, K.Y. (2003) Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39:129-134.
- Crespo, L.E.C. (2007) 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. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 49p.
- Crestani, M., Barbieri, R.L., Hawerrothl, Carvalho, F.I.F., Oliveira, A.C. (2010) Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40(6):1473-1483.
- Damiani, C.R., Schuch, M.W. (2006) 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.
- Dary, S., Desjardins, Y., Le, V. (2001) Sucrose enhances phosphoenol pyruvate conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37:130-139.
- Debergh, P.C. (1991) Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 289: 291-300.
- Debergh, P.C., Aitken – Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R., Ziv, M. (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Amsterdam (30):135-140.
- Decetti, S.F.C. (2004) Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 93 p.
- Desjardins, Y. (1995) Photosynthesis – On the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulturae*, 393:45-61.
- Dewald, M.G., Moore, G.A., Sherman, W.B. (1992) Izoenzimas in *Ananas* (pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Alexandria, 117(3):491-496.

- Dignart, S.L. (2006) Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 132 p.
- Dimassi-Theriou, K., Bosabalidis, A.M. (1996) Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 47(2):127-134.
- Erig, A.C., Schuch, M.W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35(4):961-965.
- Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C₃ plants. *Oecologia*, 78: 9-19.
- Faisal, M., Anis, M. (2009) Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 99:125-132.
- FAO. FAOSTAT (2011) *Agricultural statistics database*. Home: World Agricultural Information Center. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em: 19/01/2012.
- Faria, R.T., Rodrigues, F.N., Oliveira, L.V.R.; Müller, C. (2004) *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 22(4):780-783.
- Farias, M.F., Saad, J.C.C. (2005) Crescimento e qualidade de crisântemo cultivado em vaso sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 23(3):740-742.
- Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L.K., Carvalho, J.F.R.P. (2012) 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.
- Feuser, S., Nodari, R.O., Guerra, M.P. (2001) Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 23:6-10.
- Filho, W.B., Pereira, A.M.S., França, S.C., Furlan, M. (2002) Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus illicifolia*. *Eclética Química*, São Paulo, 27, número especial.
- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaría, J.M. (2007) Low exogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. *Acta Horticulturae*, 748:151-156.

- George, E.F., Sherrington, P.D. (1984) *Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of comercial laboratories*. Eversley, Exergetics, 704p.
- George, E.F. (2008) Plant tissue culture procedure – background. In: Goerge, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Springer, v.1, p.423-464.
- George, E.F., Davies, W. (2008) Effects of the Physical Environment. In: Goerge, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Springer, v.1, p.423-464.
- Guerra, M.P., Vesco, L.L., Pescador, R., Schuelter, A.R., Nodari, R.O. (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 34: 557-1563.
- Gonçalves, N.B., Carvalho, V.D. de (2000) Abacaxi pós-colheita 2 - Característica da Fruta. *Frutas do Brasil*, (5):13-27.
- Gonçalves, L.A., Geraldine, R.M., Picoli, A.T., Vendrame, W.A. (2008) *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92:243-250.
- Gottardi, M.V.C., Lemos, E.G.M., Ruggiero, C. (2001) Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cultivar Smooth Cayenne utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 23(3):463-467.
- González-Olmedo, J.L., Fundora, Z., Molina, L.A., Abdulnor, J., Desjardins, Y., Escalona, M. (2005) New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *In Vitro Celular & Developmental Biology – Plant*, 47:87-90.
- Glynn, P., Fraqser, C., Gillian, A. (2003) Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. *Journal of Arboriculture*, 29:61-65.
- Grattapaglia, D., Machado, A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, v.1, p.183-260.
- Gribaudo, I., Fronda, A. (1993) L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura*, 1:75-79.
- Grout, B., Aston, J. (1988) Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. *Annals of Botany*, 42:993-995.
- Hahn, E., Paek, K., Hahn, E., Paek, K. (2001) High photosynthetic foton flux and high CO₂ concentration under increased number of air exchanges promote growth and photosynthesis of four kinds of orchid plantlets *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37(5):678-682.

- Hanson, P.J., Dixon, R.K., Dickenson, R.E. (1987) Effect of container size and shape on the growth of northern red oak seedlings. *HortScience*, Alexandria, 22(12):1293-1295.
- Hazarika, B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 108(1):105-120.
- Houllou-Kido, L.M., Silva, K.S., Rivas, R., Dias, A.L.F., Alves, G.D. (2009) Viability of *Noppalea cochenilifera* (cv. IPA Sertania) photoautotrophic micropropagation. *Acta Horticulturae*, 811:309-313.
- Hoffmann, A., Chalfun, N.N.J., Antunes, L.E.C., Ramos, J.D., Pasqual, M., Rezende, E., Silva, C.R. (1996) *Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 319p.
- Hoffmann, A., Pasqual, M., Chalfun, N.N.J., Vieira, S.S.N. (2001) Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 36(11):1371-1379.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and Phosphoenol pyruvatecarboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 36:27-36.
- Ibaraki, Y., Nozaki, Y. (2005) Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 80(1):111-113.
- IBGE/LSPA (2011) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. *Pesquisa mensal de acompanhamento das safras agrícolas no ano civil*, Rio de Janeiro, 11 (24):1-82.
- Jackson, M.L. (1965) *Soil chemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 489p.
- Jiang, C.D., Shi L., Gao, H.Y., Schansker, G., Tóth, S.Z., Strasser, R.J. (2006) Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll a fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44:454-463.
- Jo, E., Tewari, E.R.K., Hahn, E.E., Paek, E. K. (2009) *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96:307-315.
- Jones, H.G. (1992). *Plant and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology*. 2 ed.: Cambridge University Press, p.19-46.
- Kadlecek, P., Rank, B., Tichá, I. (2003) Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. *Journal of Plant Physiology*, 160:1017-1024.
- Kanechi, M., Ochi, M., Abe, M, Inagaki, N., Maekawa, S. (1998) The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of *Cauliflower* plantlets cultured *in vitro*

- photoautotrophically and photomixotrophically. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 123(2):176-181.
- Kao, W.Y., Forseth, I.N. (1992) Diurnal leaf movement, chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in soybean grown under different nitrogen and water availabilities. *Plant, Cell & Environment* Volume, 15(6):703-710.
- Kodym, A., Zapata-Arias, F.J. (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, 55:141-145.
- Kozai, T. (1989) Autotrophic (sugar-free) micropropagation for a significant reduction of production costs. *Chronica Horticultural*. In: Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M. *Collected papers on environmental control in micropropagation*. v.1, 368p.
- Kozai, T., Iwanami, Y. (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 57:279-288.
- Kozai, T. (1991a) Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 27:47-51.
- Kozai, T. (1991b) Acclimatization of micropropagated plants. In: Bajaj, Y.P.S. (org). *Biotechnology in agriculture and forestry 17: high-tech and micropropagation I*. Berlin: Springer- Verlag Heidelberg, p.127-141.
- Kozai, T., Iwabuchi, K., Watanabe, K., Watanabe, I. (1991) Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25:107-115.
- Kozai, T., Kubota, C. (2001) Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Research*, 114:525-537.
- Kozai, T., Nguyen, Q.T. (2003) Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: Jain, S.M., Ishii, K. *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht, Kluwer Academic, p.757-781.
- Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S.M.A. (2005) *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system*. Springer, Dordrecht, p.315.
- Kubota, C., Tadokoro, N. (1999) Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, New York, 35(4):296-298.
- Khan, S.V., Kozai, T., Ngyen, O.T., Kubota, C., Dhawan, V. (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia Plantarum*, Copenhagen, 46(2):161-166.

- Langford, P.F., Wainwright, H. (1987) Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, 60:633-640.
- Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, RiMa. São Paulo. 529p.
- Lee, N., Wezstein, Y., Sommer, H.E. (1988) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, Rockville, 78(3):637-641.
- Lee, D.W., Oberbauer, S.F., Johnson, P., Krishnapilay, B., Mansor, M., Yap, S.K. (2000) Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast Asian *Hopea* (*Dipterocarpaceae*) species. *American Journal of Botany*, Columbus, 87(4):447-455.
- Leite, G.B., Finardi, N., Fortes, G.R.L. (2000) Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH x F97. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 24(2):353-357.
- Lian, M.L., Murthya, H.N., Paek, K.Y. (2002) Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 94:365-370.
- Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A., Pistelli, A. (2009). Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. *Scientia Horticulturae*. 122: 484-490.
- Macêdo, C.E.C., Silva, M.G., Nóbrega, F.S., Martins, C.P., Barroso, P.A.V., Alloufa, M.A.I. (2003) Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25(3):501-504.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: Potafos. p. 309.
- Malézieux, E., Bartholomew, D. P. (2003) Plant Nutrition. In: Bartholomew, D.P., Paul, R.E., Rohrbach, K.G. (eds.) *The pineapple - botany, production and uses*. Honolulu: CABI Publishing, p. 143-165.
- Marks, T.R., Simpson, S.E. (1999) Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant growth regulation*, Dordrecht, 28(2):133-142.
- Martin, K.P. (2004) *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. *Scientia Horticulturae*, 102:277-282.
- Meletti, L.M.M., Sampaio, A.C., Ruggiero, C. (2011) Avanços na fruticultura tropical no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, volume especial: 73-75.

- Mendonça, V., Medeiros, L.F. (2011) Culturas do abacateiro e do abacaxizeiro. *Boletim Técnico*. Vol. 5. Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA.
- Mothé, G.P.B., Netto, A.T., Crespo, L.E.C., Campostrini, E. (2008) Eficiência fotoquímica e características de crescimento da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e qualidade de luz. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 4(2):84-91.
- Murashige, T., Skoog, F.A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Nicoloso, F.T., Erig, A.C., Russowski, D., Martins, C.F. (2003) Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 27(1):84-90.
- Nievolá, C.C., Kraus, J.E., Freschi, L., Souza, B.M., Mercier, H. (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 41(6):832-837.
- Nobel, P.S. (1991) Variations in root water potentials: influence of environmental factors for two succulent species. *Annals of Botany*, 67(6):549-554.
- Nguyen, Q.T., Kozai, T., Heo, J., Thai, D.X. (2001) Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 66(3):215-225.
- Nhut, D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K., Tanaka, M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73:43-52.
- Pasqual, M. (2001) Textos acadêmicos: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p.
- Pereira, C.D., Kerr, W.W. (2001) Divergência genética entre doze genótipos de abacaxizeiro (*Ananas Comosus* L., merril.) estimada por análise de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2):335-338.
- Paula, M.B., Mesquita, H.A., Nogueira, F.D. (1998) Nutrição de adubação do abacaxizeiro. *Informe agropecuário*, 19(195):33-39.
- Pierik, R.L.M. (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, 326 p.
- Ponciano, N.J., Constantino, C.O.R., Souza, P.M., Detmann, E. (2006) Avaliação econômica da produção de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cultivar Pérola na região norte fluminense. *Revista Caatinga*, Mossoró, 19(1):82-91.

- Pospíšilová, J., Haisel, D., Synkova, H., Catsky, J., Wilhelmová, N., Plzáková, S., Prochárková, D., Sramek, F. (2000) Photosynthetic pigments and gas Exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 61: 125-133.
- Py, C., Lacoeyuilhe, J.J., Teisson, C.L. (1984) *L'Ananas sa culture, ses produits*. Paris: G.M. Maisoneuve et Larose, 562p.
- Pyke, K., López-Juez, E. (1999) Cellular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4):527-546.
- Preece, J.E., Sutter, E.G. (1991) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Deberg, P.C., Zimmerman, R.H. *Micropropagation: Technology and Application*. Dordrecht. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.72-93.
- Ramos, M.J., Monnerat, P.H., Pinhol, L.G.R., Silva, J.A. (2011) Deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial': composição mineral. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):261-271.
- Rangan, T.S. (1984) Pineapple. In: Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Yamada, Y. (Eds.) *Handbook of plant cell culture*. New York. MacMillan, 3:373-382.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2007) *Biologia Vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Reinhardt, D.H.R., Souza, L.F.S., Cunha, G.A.P. (2000) Exigências edafoclimáticas. In: Reinhardt, D.H., Souza, L.F.S., Cabral, J.R.S. (Ed.) *Abacaxi produção*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência Tecnológica, p. 9. (Frutas do Brasil, 7).
- Reinhardt, D.H. (2002) *Técnicas de produção e pós-colheita do abacaxi*. Fortaleza, FRUTAL/SINDIFRUTA, 72 P.
- Reinhardt, D.H., Cabral, J.R.S., Souza, L.F.S., Sanches, N.F., Matos, A.P. (2002) Pérola and 'Smooth Cayenne' pineapple cultivars in the state of Bahia, Brazil: growth, flowering, pests and diseases, yield and fruit quality aspects. *Fruits*, Paris, 57:43-53.
- Ribeiro, M.N.O., Pasqual, M., Silva, A.B., Rodrigues, V.A. (2009) Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). *Revista Ciência Agronômica*, 39(1):101-106.
- Ribeiro, D.G., Vasconcellos, M.A.S., Araújo, A.P. (2011) contribuição do sistema radicular de mudas micropropagadas na absorção de nitrogênio de abacaxizeiro cultivar Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(4):1240-1250.

- Ripley, B.S., Redfern, S.P., Dames, J. (2004) Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll-fluorescence kinetics. *South African Journal of Science*, 100:615-618.
- Rocha, H.S., Silva, C.R.R., Araújo, A.G., Silva, A.B. (2007) Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata Anã (AAB)': intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, Lavras, 3(1):10-16.
- Rocha, P.S.G., Oliveira, R.P., Scivittaro, W.B., Santos, U.L. (2010) Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*, 40(9):1922-1928.
- Ruas, P.M., Ruas, C.F., Fairbands, J.D., Andersen, R.W., Cabral, J.R.S. (1995) Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, 18(3):413-416.
- Rugini, E., Tarini, P., Rossodivita, M.E. (1987) Control of shoot vitrification of almond and olive grown *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 212:177-183.
- Saebo, A., Krekling, T., Appelgren, M. (1995) Light quality effects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 41(2):177-185.
- Sandoval, F.J., Müller, L.E., Weberling, F. (1994) Foliar morphology and anatomy of Musa cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* during hardening as compared to field-grown plants. *Fruits*, Paris, 49(1):37-46.
- Sas Institute (2003) Sas user's guide: statistics. Cary, 846p.
- Seabrook, J.E.A. (1980) Laboratory culture. In: Staba, E.J. (Ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. Boca Raton: CRC Press. p.1-20.
- Seko, Y., Nishimura, M. (1996) Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown *in vitro* on sugar-free medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 46(3):257-264.
- Seon, J.H., Cui, Y.Y., Kozai, T. (2000) Influence of *in vitro* conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61:135-142.
- Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J., Araus, J.L. (1997) The effect of different closure types, light and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during the micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 47(3):217-230.

- Siebeneichler, S.C., Monnerat, P.H., Carvalho, A.J.C., Silva, J.A. (2002) Composição mineral da folha em abacaxizeiro: efeito da parte da folha analisada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 24(1):194-198.
- Silva, S., Tassara, H. (2001) Abacaxi. In: Silva, S., Tassara, H. *Frutas no Brasil*. São Paulo: Nobel, p.25-27.
- Simmonds, J. (1983) Direct rooting of micropropagated M26 apple rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 21:233-241.
- Souza, L. F.S. (1999) Exigências edáficas e nutricionais. In: Cunha, G.A.P., Cabral, J.R.S., Souza, L.F.S. (Orgs.) *O abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.67-77.
- Souza, L.F.S., Cabral, J.R.S., Reinhardt, D.H., Souza, J.S. (2002) *Abacaxi Produção – Aspectos Técnicos*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.
- Souza, G.M., Wanderley, M.G.L. (2007) *Aechmea rodriguesiana* (L. B. Sm) (Bromeliaceae) uma espécie endêmica da Amazônia brasileira. *Acta Amazônica*, Manaus, 37(4):517-520.
- Souza, F.V.D., Souza, A.S., Santos-Serejo, J.A., Souza, E.H., Junghans, T.G., Silva, M.J. (2009a) 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.
- Souza, F.V.D., Cabral, J.R.S., Souza, E.H., Ferreira, F.R., Nepomuceno, O.S., Silva, M.J. (2009b) Evaluation of F₁ hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. *Acta Horticulturae*, 822:79-84.
- Souza, E.H., Souza, F.V.D., Costa, M.A.P.C., Costa Jr, D.S., Santos-Serejo, J.A., Amorim, E.P., Ledo, C.A.S. (2011) Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58.
- Sutter, E. (1988) Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Geneva, 113:234-238.
- Schmidt, O. (2010) Cultivo *in vitro* e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'UENF/CALIMAN 01'. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 116p.
- Sciutti, R., Morini, S. (1995) Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, 70(2):221-228.

- Shim, S., Hahn, E., Paek, K. (2003) *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75:57-62.
- Short, K.C., Warburton, J., Robert, A.V. (1987) *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. *Acta Horticulturae*, 212:329-334.
- Spironello, A., Siqueira, W.J., Usberti Filho, J.A., Teófilo Sobrinho, J., Carvalho, C.R.L., Bettioli Neto, J.E., Sigrist, J.M.M., Ferrari, J.T., Louzeiro, I.M., Martins, A.L.M. (2010) *Cultivar de abacaxizeiro IAC Fantástico*. Instituto Agrônomo, Campinas, SP, "Folder", 6p.
- Spironello, A., Siqueira, W.J., Martins, A.L.M., Usberti Filho, J.A., Carvalho, C.R.L.; Bettioli Neto, J.E., Sigrist, J.M.M., Ferrari, J.T., Louzeiro, I.M. (2011) *Avaliação do Híbrido de abacaxizeiro IAC Fantástico visando à indicação de cultivo*. In: Simpósio Brasileiro de Abacaxizeiro, 4, Bauru, Anais...
- Sriskandarajah, S., Mullins, M.G. (1981) Micropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation "in vitro". *Journal of Horticultural Science*, 56:71-71.
- Stefanello, S., Karsten, J., Müller, T.S., Tomczak, A.P., Bonett, L.P., Schuelter, A.R. (2009) Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia fl avescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(1):53-59.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2000) 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.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004): Analysis of the fluorescence transient. In: George C., Papageorgiou C., Govindjee (eds.): *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series*. Springer, Dordrecht, 321-362.
- Strauss, A.J., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J., Van Heerden, P.D.R. (2006) Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany*, 56:147-157.
- Taveira, J.A.M. (2010) Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: Gerald, L.T.S. (Org.) *Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro*. Antiqua, São Paulo, p. 246-269.
- Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J. A. (1998) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.2, p.864.

- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) 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 of Plant Physiology*, 14(3):203-210.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J., Bressan-Smith, R. (2005) Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*, 104:199-209.
- Toyoda, P.R.M., Couto, T.R., Torres Netto, A., Silva, J.R., Athayde, M.O., Carvalho, V.S., Leal, N.R. (2010) Análise biométrica e ecofisiológica da aclimatização de mudas de abacaxizeiro cultivar 'Gold' oriundos de micropropagação. *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura – Natal, RN*.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., Klerk, G.J., Roberts, A., George, E.F. (2008) The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: Goerge, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Springer, v.1, p.1-23.
- Valero-Aracama, C., Wilson, S.B., Kane, M.E., Philman, N.L. (2007) Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy-and difficult - to - acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 43:237-246.
- Van Huylenbroeck, J.M., Piqueras, A., Debergh, P.C. (1998) Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*, 134:21-30.
- Van Huylenbroeck, J.M., Piqueras, A., Debergh, P.C. (2000) The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant science*, 155:59-66.
- Ventura, A.J., Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Costa, H. (2006) 'Vitória', cultivar de abacaxi resistente à fusariose. Documentos nº 148, Vitória: INCAPER.
- Vieira, L.J., Santos, L.R., Castelen, M.S., Junghans, D.T. (2010) Caracterização morfológica de acessos de abacaxizeiro. *C&D - Revista Eletrônica da Fainor, Vitória da Conquista*, 3(1):68-77.
- Vieira, A., Celestino, R.C.C., Ide, C.D. (2010) Efeito do tratamento de mudas de abacaxizeiro Pérola, durante o período de ceva, em solos arenosos do município de São João da Barra - RJ. *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura – Natal, RN*.
- Vyas, S., Purohit, S.D. (2003) *In vitro* growth and shoot multiplication of *Wrightia tomentosa* Roem at Schult in a controlled carbon dioxide environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, 75(3):283-286.

- Usberti Filho, J.A., Siqueira, W.J., Spironello, A., Harris, M., Badan, A.C.C. (1995) Inheritance of leaf spininess and segregation of leaf color in pineapple (*Ananas comosus* L.Merrill). *Revista Brasileira de Genética*, Campinas, 18(4):547-552.
- Yang, S.H., Yeh, D.M. (2008) *In vitro* leaf anatomy, *ex vitro* photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 93:201-207.
- Wainwright, H., Scrace, J. (1989) Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. *Scientia Horticulturae*, 38:261-9267.
- Xiao, Y., Kozai, T. (2004) Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plantlet growth and production cost. *Hort science*, 39:1387-1391.
- Xiao, Y., Kozai, T. (2006) *In vitro* multiplication of static plantlet using sugar-free media. *Scientia Horticulturae*, 1-7.
- Zanandrea, I., Bacarin, M.A., Schimitz, D.D. (2006) Chlorophyll fluorescence in *in vitro* cultivated apple. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12: 305-308.
- Zivčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., Slamka, P. (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil and Environment*, 54(4):133-139.
- Zobayed, S.M.A., Armstrong, J., Armstrong, W. (1999) Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59:113-123.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Kozai, T. (2000) Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation. *Acta Horticulturae*, 530:377-386.
- Zobayed, S.M.A., Armstrong, J., Armstrong, W. (2002) Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Science*, 161: 537-548.
- Zhu, J., Bartholomew, D.P., Goldstein, G. (2005) Photosynthetic gas exchange and water relations during drought in 'Smooth Cayenne' pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) grown under ambient and elevated CO₂ and three day/night temperatures. *Acta Horticulturae*, 666:161-173.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y. (2009) Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *Hort Science*, 44:757-763.