

**SILÍCIO, LUZ E SUBSTRATO NA
MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIRO
[*Ananas comosus* (L.) Merr 'GOMO DE MEL']**

FRANCYANE TAVARES BRAGA

2009

FRANCYANE TAVARES BRAGA

**SILÍCIO, LUZ E SUBSTRATO NA MICROPROPAGAÇÃO DE
ABACAXIZEIRO [*Ananas comosus* (L.) Merr ‘GOMO DE MEL’]**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
área de concentração em Produção Vegetal,
para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Braga, Franciane Tavares.

Silício, luz e substrato na micropropagação de abacaxizeiro
[*Ananas comosus* (L). Merr 'Gomo de Mel'] / Franciane
Tavares Braga. – Lavras: UFLA, 2009.

95 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Anatomia vegetal. 2. Ambiente de cultivo. 3. Silicatos. 4.
Aclimatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.7743

FRANCYANE TAVARES BRAGA

**SILÍCIO, LUZ E SUBSTRATO NA MICROPROPAGAÇÃO DE
ABACAXIZEIRO [*ANANAS COMOSUS* (L.) MERR 'GOMO DE
MEL']**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 17 de julho de 2009.

Prof. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Prof ^a . Janice Guedes de Carvalho	UFLA
Dr ^a . Aparecida Gomes de Araujo	UFLA
Dr ^a . Ester Alice Ferreira	EPAMIG

Prof. Moacir Pasqual

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Francisco e Maria Auxiliadora (*In
memoriam*),

OFEREÇO.

A minha irmã, Pollyana.

A minha família.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer tudo na minha vida possível.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor Moacir Pasqual, por toda atenção, apoio, amizade e ensinamentos durante estes anos.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pela co-orientação, mas, principalmente, pela amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem e lerem este trabalho e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo.

Aos professores do Departamento de Agricultura e do setor de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos durante os cursos de mestrado e doutorado.

A minha família, mesmo com a distância, que sempre esteve ao meu lado, com apoio e amor incondicional e tornou possível a realização desse sonho. A Mel (minha cachorrinha), companheira fiel, por todo amor sem cobranças que me dedica.

Ao Sr. Jorge e Toninha, ao Marcelo e Rodrigo pela amizade e apoio durante todo o período do curso e, principalmente, pelo convívio familiar. Obrigada por todos os momentos.

Aos amigos de república, Sidney, Rayrís, Cristiano e Aurinete também pela amizade e convívio familiar e a Suzi, nossa cachorrinha, que sempre nos alegrou.

Aos meus amigos Thiago, Anderson e Rosi, por estarem sempre presentes em minha vida, compartilhando de bons e maus momentos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura: Vantuil, Claret e Antônio Carlos, pela amizade, apoio e momentos de descontração e por toda ajuda prestada durante todo o curso.

Aos alunos de pós-doutorado, doutorado, mestrado e iniciação científica do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura: Cida, Gustavo, Néia, Fred, Filipe (Batata), Penoni, Joyce, Dalíhnia, Gabrielen, Aurinete, Simone, Fabíola, Leila, Fernanda, Karine, Rose, Renato e Thaís, por todos os momentos que passamos juntos, seja no convívio do trabalho ou na descontração da 'Casa Mágica', obrigada por tudo.

Ao Gabriel Coimbra Rafael, por toda ajuda direta durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade.

A Ana Carolina Favero (Carol) pela ajuda na tradução dos abstracts, mas principalmente pelo apoio e amizade.

A todos os amigos do Departamento de Agricultura, em especial a Marli e Nelzi, pela competência frente à secretaria de Pós-Graduação, aos alunos que compartilharam todos os momentos durante o curso.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Cynthia e Jessé, pelo trabalho em conjunto, por todo tempo que se dispuseram no auxílio desta tese e pelo agradável convívio.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Prof. Eduardo Alves e a Helôisa, pela ajuda prestada durante a realização das análises de microscopia de varredura.

Aos amigos do Setor de Fisiologia Vegetal, em especial aos alunos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Lenhosas: Daí e Benet, Gabi, Diogão, Vanessa (Gaúcha), Milene, Ful (agregada assim como eu) e Tina, obrigada por todos os momentos compartilhados.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPITULO 1.....	1
1 Introdução Geral	2
2 Referencial Teórico.....	5
2.1 Origem e características do abacaxi cv. ‘IAC – Gomo de Mel’.....	5
2.2 Micropropagação do abacaxizeiro.....	6
2.3 Ambiente de cultivo.....	7
2.4 Luz no cultivo <i>in vitro</i>	8
2.5 Silício e aspectos anatômicos.....	9
2.6 Morfofisiologia e anatomia de plantas micropropagadas.....	12
3 Referências Bibliográficas	14
CAPITULO 2: Indução ao estiolamento <i>in vitro</i> de brotos de abacaxizeiro cv. ‘Gomo de Mel’	19
1 Resumo	20
2 Abstract.....	20
3 Introdução	21
4 Material e métodos.....	22
5 Resultados e discussão.....	23
6 Conclusões.....	25
7 Referências bibliográficas.....	25
Anexos.....	27
CAPITULO 3: Ambiente de luz e explante na regeneração de abacaxizeiro cv. ‘Gomo de Mel’ estiolado <i>in vitro</i> : características biométricas e anatômicas.....	29
1 Resumo	30

2 Abstract.....	30
3 Introdução	31
4 Material e métodos.....	32
5 Resultados e discussão.....	33
6 Conclusões.....	37
7 Referências bibliográficas.....	37
Anexos.....	40
CAPITULO 4: Características anatômicas de abacaxi ‘Gomo de Mel’ micropropagados com diferentes fontes de silício.....	
1 Resumo	46
2 Abstract.....	47
3 Introdução	47
4 Material e métodos.....	48
5 Resultados e discussão.....	49
6 Conclusões.....	50
7 Referências bibliográficas.....	54
Anexos.....	55
CAPITULO 5: Luz natural e substrato alternativo no enraizamento <i>in vitro</i> de abacaxizeiro ‘gomo de mel: características anatômicas.....	
1 Resumo	61
2 Abstract.....	62
3 Introdução	63
4 Material e métodos.....	63
5 Resultados e discussão.....	64
6 Conclusões.....	66
7 Referências bibliográficas.....	70
Anexos.....	71
	73

CAPITULO 6: Características anatômicas de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’, aclimatizadas com diferentes substratos.....	82
1 Resumo.....	83
2 Abstract.....	83
3 Introdução.....	84
4 Material e métodos.....	85
5 Resultados e discussão.....	86
6 Conclusões.....	89
7 Referências bibliográficas.....	90
Anexos.....	92

RESUMO

BRAGA, Franciane Tavares. **Silício, luz e substrato na micropropagação de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merr ‘Gomo de Mel’]**. 2009. 95p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O presente trabalho teve por objetivo avaliar fontes de silicatos, luz natural, componente alternativo ao ágar e substratos eficientes na micropropagação de abacaxizeiro Gomo de Mel por meio de análises fitotécnicas e anatômicas. Para isso, promoveu-se o estiolamento *in vitro* de brotos de abacaxizeiro utilizando meio MS básico testando diferentes concentrações de ANA e GA₃. Avaliou-se a regeneração de brotos estiolados em diferentes ambientes de luz: 1) sala de crescimento e 2) casa de vegetação e três regiões do broto estiolado como fonte de explante: 1) ápice; 2) meio e 3) base. Para multiplicação de abacaxizeiro *in vitro*, testaram-se duas fontes de silícios: silicato de cálcio e silicato de potássio na concentração de 1,0 g.L⁻¹ adicionados ao meio MS. Para o enraizamento *in vitro* avaliaram-se ambientes de luz: sala de crescimento e casa de vegetação e dois suportes físicos: ágar a 6 g.L⁻¹ e vermiculita a 15 g.L⁻¹ em meio MS líquido. Quatro substratos diferentes foram testados durante o processo de aclimatização: areia+xaxim+húmus; plantmax; vermiculita e plantmax+vermiculita. Após 60 dias de cultivo foram avaliados parâmetros biométricos e anatômicos para todos os experimentos avaliados com exceção para indução ao estiolamento. Maior número de brotos estiolados ocorre quando se adiciona ao meio 6,5 µM de GA₃ combinado a 20 µM de ANA. Ausência de ANA e 13 µM GA₃ promove maior comprimento de parte aérea e número de raízes. Já adição de 20 µM ANA + 6,5 µM GA₃ proporciona maior número de entrenós. Para regeneração *in vitro*, maior número de brotos e massa fresca foi obtido em ambiente de luz artificial independente do tipo de explante. Já para espessura dos tecidos do limbo foliar, o ambiente de luz natural promoveu as maiores espessuras. Luz natural e região basal do explante estiolado promoveram maior número de estômatos/mm² e diâmetro polar e equatorial. Na multiplicação *in vitro* avaliando fontes de silício, maior número de brotos, massa fresca e seca foram observados quando se adicionou ao meio silicato de potássio. Adição de silicato de potássio ao meio MS proporciona maiores espessuras dos tecidos do mesófilo foliar, maior número de estômatos, bem como maior diâmetros polar e equatorial dos mesmos. O uso do substrato vermiculita em luz artificial apresentou melhores resultados para todas as variáveis. Para as características anatômicas, maiores espessuras dos tecidos do limbo foliar foram verificadas quando se utilizou vermiculita e luz natural, sendo

que, para o uso de ágar, também houve aumento das espessuras somente quando utilizou-se o ambiente de luz natural. Quanto ao número de estômatos/mm² não houve diferença significativa para os tratamentos, maior diâmetro polar e equatorial foi observado em estômatos de folhas cultivadas em luz artificial e vermiculita e luz natural e vermiculita respectivamente. Durante o processo de aclimatização o uso do substrato vermiculita foi o recomendado para o cultivar 'Gomo de Mel' apresentando boas características de crescimento e diferenciação dos tecidos.

*Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual – UFLA. (Orientador), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA. (Co-orientador).

ABSTRACT

BRAGA, Franciane Tavares. **Silicium, light and substrate in the pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr 'Gomo de Mel'] micropropagation.** 2009. 95p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The present work aimed to evaluate silicate sources, natural light, alternative component to the agar and efficient substrates in the micropropagation of pineapple 'Gomo de Mel' through developmental and anatomical analyses. The pineapple shoots etiolating was promoted in vitro using the MS medium testing different concentrations of ANA and GA₃. It was evaluated the etiolated shoots regeneration in different light environments: 1) growth room and 2) greenhouse and three regions of the etiolated shoot as explants source: 1) apical; 2) medium and 3) basal. Calcium silicate and potassium silicate in the dosage of 1,0 g.L⁻¹ added to the MS medium were tested to the pineapple multiplication in vitro. To the in vitro rooting it was evaluated light environmental: growth room and greenhouse and two physical supports: agar 6 g.L⁻¹ and vermiculite 15 g.L⁻¹ in liquid MS medium. Four different substrates were tested during the acclimatization process: sand + fern tree fiber + humus; Plantmax®; vermiculite and Plantmax® + vermiculite. After 60 days, biometrics and anatomical parameters were evaluated in all the experiments excepted for the etiolating induction experiment. Bigger number of etiolated shoots occurs when is added to the medium 6.5µM of GA₃ combined with 20 µM of ANA. Absence of ANA and 13 µM of GA₃ promotes greater length of aerial part and number of roots. The addition of 20 µM ANA + 6,5 µM GA₃ provides greater number of internodes. For the in vitro regeneration, the greater number of shoots and fresh mass was obtained in artificial light environment independent of the explants type. To the foliar limb tissues thickness the natural light environment promoted the biggest thicknesses. Natural light and the basal region of the etiolated explants promoted greater number of stomatas/mm² and polar and equatorial diameter. In the in vitro multiplication, evaluating silicon sources, greater number of shoots, fresh and dry mass was observed when potassium silicate was added to the medium. The addition of potassium silicate to the medium MS provides bigger thicknesses of the foliar mesophyll, bigger number of stomata, as well as, greater polar and equatorial diameters. The use of the vermiculite substrate in artificial light presented better results for all variables. Bigger thicknesses of the foliar limb tissues was verified with the use of vermiculite and natural light, being that, to the agar use, it also increased the thicknesses only when the natural light environment was used. Deal with the number of stomatas/mm² it did not have significant difference between treatments, greater polar and equatorial diameter

was observed in stomatas of leaves cultivated in artificial light and vermiculite and natural light and vermiculite respectively. During acclimatization process the use of vermiculite substrate was the recommended to 'Gomo de Mel' presenting good characteristics of growth and tissues differentiation.

*Guidance Committee: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Adviser).

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O abacaxi é uma fruta tropical apreciada mundialmente pelo seu aroma e sabor acentuados, além de apresentar propriedades medicinais, alto valor nutritivo, sendo principalmente rico em vitaminas e sais minerais.

O Brasil é o segundo produtor mundial de abacaxi (1,75 milhão de toneladas em 79.809 hectares plantados) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE, 2009). Existem, portanto, amplas possibilidades de expansão da abacaxicultura no país, porém, o maior problema da cultura é a alta susceptibilidade a patógenos, sendo a fusariose observada nos principais cultivares, inclusive o 'Gomo de Mel' (Fráguas, 2006).

Como essa doença se dissemina através de mudas contaminadas, pode-se afirmar que o primeiro passo para o sucesso da cultura é a aquisição de mudas saudáveis, no qual a cultura de tecidos surge como técnica a atender essa necessidade.

O uso do cultivo *in vitro* tem sido aceito em numerosas áreas da agricultura comercial, especialmente com frutíferas tropicais. A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos que visa propagar rapidamente plantas isentas de vírus, a partir de meristemas, independente da época do ano, além de requerer pequeno espaço físico (Torres et al., 2001).

Em escala comercial, a micropropagação já é realidade em diversas áreas no mundo. No Brasil, a principal limitação para o maior acesso dos produtores a essas mudas é o elevado custo deste tipo de material propagativo, que é superior ao das mudas convencionais (Dignart et al., 2009; Rocha et al., 2007), bem como o estabelecimento de protocolos adequados e viáveis economicamente.

Dentre os fatores que afetam a cultura de tecidos a composição do meio e o ambiente de cultivo aparecem como fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro*.

O meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos. Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas. De acordo com Torres et al. (2001), os meios de cultura podem ser ainda modificados conforme a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando.

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício (Si) não tem sido muito estudado na micropropagação. Contudo, do ponto de vista fisiológico, este elemento tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas (Gomes et al., 2008). Segundo o autor, acredita-se que ele possa interferir na arquitetura das plantas, favorecendo a fotossíntese, ao proporcionar folhas mais eretas, o que significa maior eficiência fotossintética.

O silício tende a acumular-se nas folhas, onde forma uma barreira protetora e regula a perda de água da planta por evapotranspiração, o que auxilia o processo de aclimatização das plantas micropropagadas, pois, ao serem transferidas para o ambiente *ex vitro*, a principal causa de mortalidade durante esse processo é devido à perda de água, pela baixa funcionalidade dos estômatos e delgada camada de cera epicuticular (Silva, 2007).

O enraizamento *in vitro* é uma etapa importante da micropropagação e é realizada em meio nutritivo contendo ágar geleificado, porém, o sistema radicular emitido em meio com esse suporte é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e com poucos pêlos radiculares (Hoffmann et al., 2001), o que acarretará dificuldades durante o processo de aclimatização.

O uso de substratos alternativos para enraizamento já foi testado em diversos trabalhos e pode ser útil em sistemas intensivos de micropropagação (Martínez-Hernández et al., 2006; Leite et al., 2002; Hoffmann et al., 2001) Os autores citam ainda que a vermiculita e outros compostos, embebidos com meio líquido, podem ser alternativas de baixo custo e apresentar melhores resultados que o ágar.

Outro fator que eleva o custo de produção de mudas micropropagadas é o gasto com energia elétrica em salas de crescimento. Uma alternativa para esse fator seria o cultivo *in vitro* em ambiente de luz natural. Essa tecnologia não é muito adotada por não estarem esclarecidos seus efeitos sobre as culturas que, convencionalmente, são condicionadas em luz artificial, com intensidades luminosas inferiores e com fotoperíodo e temperatura controlados (Erig & Schuch, 2005).

O fator luz é fundamental para o desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*. A luz influencia em aspectos anatômicos e fisiológicos, interferindo na qualidade das plantas durante o processo de aclimatização.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar fontes de silicatos, luz natural, componente alternativo ao ágar e substratos eficientes na micropropagação de abacaxizeiro Gomo de Mel por meio de análises fitotécnicas e anatômicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem e características do abacaxi cv. 'IAC – Gomo de Mel'

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de abacaxi (1,75 milhão de toneladas em 79.809 hectares plantados) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2009). Existem amplas possibilidades de expansão da abacaxicultura no país, porém, o maior problema da cultura é a alta susceptibilidade a patógenos, sendo a fusariose observada nos principais cultivares, inclusive o 'IAC – Gomo de Mel' (Fráguas, 2006).

Este cultivar, resultado de cruzamento natural, foi introduzido da China em 1991 e incorporada no mesmo ano ao banco de germoplasma de abacaxizeiro do Instituto Agrônomo de Campinas.

O nome Gomo de Mel deve-se ao fato dos frutinhos serem menos soldados entre si, ao contrário do que ocorre com os demais cultivares, sendo, portanto, facilmente destacáveis no fruto maduro (Fráguas, 2006).

Os frutos deste cultivar são pequenos, apresentam coloração amarelo-ouro. Os frutinhos são grandes, o que pode conferir maior resistência ao transporte. A polpa apresenta alta porcentagem de sólidos solúveis totais (°Brix), baixa acidez e teor de vitamina C semelhante às demais cultivares existentes (Instituto Agrônomo de Campinas, 2009).

Este cultivar, assim como os demais distribuídos no mercado, apresenta suscetibilidade à fusariose, mas moderada resistência a nematóides. Os frutos apresentam também boa “vida de prateleira” quando maduros, maior do que a dos cultivares tradicionais, isso devido a sua provável maior resistência ao transporte.

2.2 Micropropagação do abacaxizeiro

O uso de mudas convencionais de abacaxi de baixa qualidade pode acarretar problemas para a lavoura a ser estabelecida em consequência do baixo vigor, ocasionado principalmente pela contaminação por pragas e doenças.

Entre as enfermidades que acometem a abacaxicultura, a fusariose, por sua vez, é considerada a principal no Brasil, tendo sido relatada inicialmente em frutos da cultivar Smooth Cayenne. Hoje, porém, é a principal doença da maioria das cultivares (Fráguas, 2006).

O emprego da cultura de meristemas e propagação rápida *in vitro* possibilita a produção em larga escala de plantas livres de vírus para uso em pesquisas e fornecimento a viveiristas e produtores de abacaxizeiro.

A produção de mudas via cultura de tecidos consiste na regeneração de plantas completas a partir de gemas de plantas matrizes selecionadas no campo em plantios comerciais.

O processo envolve várias etapas, começando com a coleta das mudas de plantas matrizes selecionadas, passando pela extração das gemas axilares, cultivo e regeneração das plântulas, as quais são, numa segunda etapa, inoculadas em meio de multiplicação (Torres et al., 2001).

Após essa fase, os brotos são cultivados em meio próprio para alongamento/ enraizamento. Finalmente, as plântulas são transferidas para casa de vegetação para aclimatização, crescimento e desenvolvimento (Teixeira et al., 2001).

A produção comercial de mudas de laboratório das variedades mais comuns de abacaxi plantadas no Brasil tem sido inviabilizada pelo alto custo de produção. Desta forma, para viabilizar este tipo de muda, protocolos mais eficientes devem ser estabelecidos, a fim de reduzir os custos de produção e melhorar a qualidade das mudas micropropagadas.

2.3 Ambiente de cultivo

O ambiente de cultivo é um fator relevante na propagação *in vitro*, uma vez que os métodos tradicionais requerem a utilização de recipientes selados. Nessas condições, os explantes cultivados crescem em taxas de umidade relativa elevadas, assim como alta disponibilidade de água no meio de cultura, induzindo a um desenvolvimento anatômico ineficaz, tornando o processo de aclimatização difícil e demorado.

Quando cultivadas em ambiente *in vitro*, as plântulas apresentam características de fotossíntese, transpiração e absorção baixas. Tais características são observadas na formação dos órgãos, principalmente as folhas. Estas, quando formadas durante a cultura de tecidos, apresentam diferenças anatômicas se comparadas a folhas formadas pelo processo *ex vitro*, afetando, principalmente, a fotossíntese.

Nas diferenças anatômicas são observadas: composição e espessura de camadas de ceras, pigmentação e comportamento estomático. Plantas desenvolvidas *in vitro* possuem menos cera epicuticular que plantas cultivadas *ex vitro*, levando a planta a uma transpiração excessiva (Hazarika, 2006). Quando aliada a uma ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, ocorre perda de água pela planta, sendo este um fator que causa baixas taxas de sobrevivência durante o processo de transplante e aclimatização.

Diversas técnicas e metodologias têm sido aplicadas com o objetivo de fornecer condições ambientais que promovam o aumento na capacidade fotossintética do explante micropropagado, principalmente com a utilização de filtros de membranas com microporos permeáveis a gases, os quais promovem o aumento na troca de gases entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo (sistema de ventilação natural) (Cui et al., 2000).

2.4 Luz no cultivo *in vitro*

A realização de alguns processos vitais nas plantas é dependente de luz, tais como fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo. A intensidade, a qualidade e a duração afetam particularmente o processo fotossintético e processos mediados por fitocromos, tendo o fototropismo pouca influência no cultivo *in vitro* (George, 2008; Rocha et al., 2007; Costa et al., 2008; Silva et al., 2008).

A intensidade luminosa necessária para o cultivo de tecidos vegetais depende do estágio da micropropagação, do explante utilizado e, principalmente, da espécie propagada (Torres et al., 2001).

Uma das formas de facilitar o processo de aclimatização de plântulas cultivadas *in vitro* seria aumentar a intensidade luminosa, promovendo a fotossíntese e melhorando as relações hídricas (Erig & Schuch, 2005). Ibaraki & 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.

A intensidade luminosa pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar modificando características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lee et al., 2000).

As dificuldades de sobrevivência das plântulas transplantadas estão, provavelmente, relacionadas às condições hídricas, uma vez que essas plântulas apresentam um desenvolvimento cuticular reduzido e mesofilo com grandes espaços intercelulares e também divergentes configurações de estômatos, com reduzida funcionalidade (Hazarika, 2006).

Alguns autores vêm estudando as vantagens da utilização da luz natural em substituição à luz artificial. Kodyn & Zapata-Arias (1999) estudaram a utilização potencial da luz solar sobre o cultivo *in vitro* de bananeiras Grande

Naine e os efeitos de temperaturas flutuantes, do fotoperíodo e da intensidade luminosa nas taxas de multiplicação e na qualidade das plântulas. Testando três diferentes ambientes de cultivo *in vitro* - câmara de crescimento com luz artificial e temperatura controladas, sala de crescimento com luz natural sem controle de temperatura e casa de vegetação com luz natural, também sem controle de temperatura, observaram que as maiores taxas de multiplicação foram obtidas sob condições de luz natural, em casa de vegetação. Nessa condição, as plântulas apresentaram-se verdes claras e com desenvolvimento de uma área foliar maior do que na luz artificial. Entretanto, foi observada queima de folhas e perda de turgor.

A partir dos estudos apresentados, constata-se que a luz natural apresenta vantagens sobre o sistema de iluminação artificial, principalmente no que se refere a alterações anatômicas e fisiológicas, destacando-se o crescimento das plântulas micropropagadas, a melhoria das características fisiológicas, devido às condições do ambiente de cultivo serem mais semelhantes àsquelas naturais, adaptando melhor essas plantas quando transplantadas para ambiente *ex vitro*.

2.5 Silício e aspectos anatômicos

A essencialidade do silício (Si) para as plantas superiores foi demonstrada apenas para algumas espécies, apesar de ser um constituinte majoritário dos vegetais (Epstein, 1999). Os mecanismos bioquímicos responsáveis pelos efeitos da deficiência de Si ainda não estão elucidados, não havendo evidência para qualquer ligação orgânica (Birchall et al., 1996).

Acredita-se que o silício possa interferir na arquitetura das plantas, favorecendo a fotossíntese, ao proporcionar folhas mais eretas, o que significa maior eficiência fotossintética (Epstein, 1999).

A absorção do silício pelas plantas ocorre na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4). As plantas diferem bastante na sua capacidade de

absorver o silício e até mesmo genótipos de uma espécie podem apresentar concentrações diferentes de silício, como demonstrado para cevada por Nable et al. (1990). Lima Filho et al. (1999) encontraram diferenças marcantes no teor de silício em diferentes órgãos, avaliados entre cultivares de morangueiros.

O silício no interior das plantas é considerado como elemento pouco móvel e o seu transporte, da raiz até a parte aérea, ocorre através do xilema e depende da taxa de transpiração, como para todos os demais nutrientes, segundo Korndörfer & Datnoff (2000).

O silício tende a acumular-se nas folhas, formando uma barreira protetora e regulando a perda de água da planta por evapotranspiração. Existe grande diversidade de fontes de silício usadas na agricultura. Além dos produtos especialmente desenvolvidos para aplicações foliares, termofosfatos e diferentes escórias industriais são aplicados ao solo e adicionam significativas quantidades de silício, juntamente com outros nutrientes (Lima Filho et al., 1999). A forma presente na maioria dos produtos para aplicação via solo, disponível no Brasil, é o silicato de cálcio (CaSiO_3), sendo o teor de SiO_2 da fonte variável conforme a origem do material. A eficiência da adubação com silício parece depender da natureza dos silicatos utilizados (Barbosa Filho et al., 2000; Pereira et al., 2003).

Marschner (1995) relata que o fornecimento de Si é benéfico para muitas espécies vegetais e, em determinadas circunstâncias, para a maioria das plantas superiores. O silício pode estimular o crescimento e a produção vegetal por meio de várias ações indiretas, como a diminuição do auto-sombreamento, deixando as folhas mais eretas, decréscimo na suscetibilidade ao acamamento, maior rigidez estrutural dos tecidos, proteção contra estresses abióticos, como a redução da toxidez por alumínio, manganês, ferro e sódio, a diminuição na incidência de patógenos e aumento na proteção contra herbívoros, incluindo os insetos fitófagos (Epstein, 1999; Marschner, 1995).

Soares et al. (2008), trabalhando com orquídeas cultivadas *in vitro* com duas diferentes fontes de silício, silicato de sódio e Supa Potássio® (fonte de silicato de potássio), obtiveram os melhores resultados para número de brotos, utilizando 5 mg L⁻¹ de Supa potássio® e, para comprimento da parte aérea, número de raízes e comprimento médio de raízes de orquídea, com adição ao meio de cultura de 5 mg L⁻¹ de Supa Potássio® associado a concentrações elevadas (20mg.L⁻¹) de silicato de sódio.

Zhou (1995) verificou aumento de tamanho das folhas de *Phalaenopsis* cultivada *in vitro*, com concentrações de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de silicato de cálcio adicionadas ao meio de cultura VW (Vacin and Went) modificado.

As condições ambientais sob as quais ocorre o cultivo *in vitro*, no que se refere à composição do meio de cultura e do ar no interior dos recipientes, bem como quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que plantas micropropagadas proveniente da micropropagação apresentem algumas características em relação às folhas, às raízes e ao mecanismo de nutrição da plântula (Pasqual, 2001).

A análise da anatomia foliar também mostra que os depósitos de silício, comumente chamados de silicofitólitos, ocorrem na parede celular como incrustação e ou impregnação ou, ainda, sob a forma de corpos silicosos (opala) no interior das células de diferentes tecidos (Sangster, 1999).

A forma adquirida pelos depósitos do silício, bem como a sua distribuição no interior do vegetal, depende da espécie em estudo e das condições climáticas do ambiente onde esse cresce, podendo ser característica para uma espécie, gênero e mesmo para algumas famílias, sendo, então, um caráter com aplicação taxonômica (Silva, 2007).

2.6 Morfofisiologia de plantas micropropagadas

O desenvolvimento normal de uma planta pode ser afetado, principalmente quanto a aspectos anatômicos, quando estas são cultivadas fora do seu ambiente natural (Castro, 2003)¹. Há, portanto, necessidade da realização de pesquisas com anatomia foliar que possam conduzir a soluções para problemas referentes à multiplicação dessas plantas. A avaliação decorrente das condições de cultura *in vitro* é uma base para a compreensão do processo de adaptação da espécie, assim como fator importante para o estabelecimento de um manejo eficiente para a condução de sistemas de produção comercialmente viáveis (Santiago et al., 2001).

Fatores como alta umidade relativa no interior do recipiente e baixa irradiância podem provocar alterações significativas estruturais e funcionais nos tecidos, levando à incapacidade, principalmente no controle de perda de água, quando submetidas às condições adversas do ambiente natural (Sciutti & Morini, 1995).

A excessiva perda de água, que contribui para a dessecação das plantas, tem sido atribuída a anormalidades induzidas *in vitro*, como baixa formação de cera epicuticular, alteração na composição química das ceras, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos, deficiência no mecanismo de fechamento estomático (Shackel et al., 1990), aumento na frequência de estômatos (Lee et al., 2000), localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha, presença de hidatódios (Capellades et al., 1990) e reduzida diferenciação do mesofilo das folhas, com alta proporção de espaços intercelulares (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997).

¹Comunicação pessoal. CASTRO, E.M. Lavras: UFLA/Departamento de Biologia, 2003.

A desordem estrutural nas plantas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura. A consequência é baixa taxa de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro*.

Em trabalhos realizados comparando o desenvolvimento de espécies *in vitro* e *ex vitro*, Hazarika (2006) observou que folhas apresentam menor conteúdo citoplasmático e um menor desenvolvimento de cloroplastídeos, quando comparadas com folhas dessa espécie crescida a campo.

A formação de apenas uma camada de células paliçádicas em plantas micropropagadas, em comparação com plantas desenvolvidas em casa de vegetação, as quais normalmente apresentam de duas a três camadas de células paliçádicas, além de maiores espaços intercelulares no mesofilo, vem sendo relatada para algumas espécies (Soares, 2005).

Folhas persistentes de morangos tornaram-se mais espessas devido à camada de células paliçádicas (Fabbri et al., 1986), porém, não houve mudanças no número ou na quantidade dos espaços intercelulares no mesofilo. O desenvolvimento de novas folhas, depois da remoção do meio de cultivo, foi considerado como sendo importante para o crescimento vigoroso das plantas. Durante a aclimatização, folhas presentes, como folhas primordiais *in vitro*, assumiram características intermediárias entre folhas crescidas *in vitro* e aquelas crescidas em casa de vegetação.

As novas folhas produzidas durante a aclimatização possuem características de transição que podem conferir maior capacidade fotossintética, conseqüentemente aquisição de fotoautotrofia e de regulação hídrica às plantas (Hazarika, 2006). Capellades et al. (1990) citam que o período de aclimatização *ex vitro* permite redução na densidade estomática, altera o formato e a topografia dos mesmos e, no geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

Por tais motivos, faz-se necessária uma gradual aclimatização, a fim de que as plântulas sobrevivam quando transferidas para diferentes condições ambientais.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATIA, M.H.; BESFORD, R.T. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**, London, v.58, n.3, p.343-351, Mar. 1986.

BARBOSA FILHO, M.P.; SNYDER, G.H.; PRABHU, A.S.; DATNOFF, L.E.; KORNDORFER, G.H. **Importância do silício para a cultura do arroz: uma revisão de literatura**. Piracicaba: UNESP, 2000. 11p. (Informações Agronômicas, 89).

BIRCHALL, J.D.; BELLIA, J.P.; ROBERTS, N.B. On the mechanisms underlying the essentiality of silicon: interactions with aluminium and copper. **Coordination Chemistry Reviews**, Lausanne, v.149, p.231-240, May 1996.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141-145, Jan.1990.

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S.; PASQUAL, E.M.; SANTOS, A.M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p. 742-748, maio/jun. 2009.

CUI, Y.Y.; HAHN, E.J.; KOZAI, T.; PAEK, K.Y. 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, v.62, n. 2, p.219-226, Aug. 2000.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. 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 Cultured**, Dordrecht, v.47, n.2, p.127-134, May 1997.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.641-664, June 1999.

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

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S.K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, n.4, p.331-337, May 1986.

FRÁGUAS, C.B. **Análises bioquímicas e histológicas na micropopagação de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ Submetido a reguladores vegetais**. 2006. 100p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Great Britain: Exegetics, 2008. 479p.

GOMES, F.B.; MORAES, J.C.; SANTOS, C.D. dos; ANTUNES, C.S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, n.2, p.185-190, mar./abr. 2008.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, n.1, p.105-120, June 2006.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; VIEIRA, S.S.N. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.11, p.1371-1379, nov. 2001.

IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.80, n.1, p.111-113, Jan. 2005.

INSTITUO AGRONÔMIGO DE CAMPINAS. **Abacaxi cv. 'Gomo de Mel'**. Disponível em: < <http://herbario.iac.sp.gov.br/cultivares/Folders/Abacaxi/IACGomo-de-Mel.asp>>. Acesso em: 9 fev. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>>. Acesso em: 9 fev. 2009.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. 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**, Amsterdam, v.55, n.2, p.141-14, May 1999.

KORNDÖRFER, G.H.; DATNOFF, L.E. Papel do silício na produção de cana-deaçúcar. In: SEMINÁRIO DE CANA-DE-ACÚCAR DE PIRACICABA, 5., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p.53-61.

LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v.87, n.4, p.447-455, Apr. 2000.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.L.; FORTES, G.R.L. Use of vermiculite as a substrate and effect of light on *in vitro* rooting of pears, cv. Bartlett and clone oh x f97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.977-982, set./out. 2002.

LIMA FILHO, O.F.; LIMA, M.T.G.; TSAI, S.M. **O silício na agricultura**. Piracicaba: UNESP, 1999. (Informações Agronômicas, 87).

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. New York: Academic, 1995. 887p.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M.J.; LÓPEZ, A.A.; OSORIO-ACOSTA, F.; LÓPEZ, F.G.; MOCTEZUMA, H.L.; ROSAS, M.M. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al ágar. **Interciência**, Caracas, v.31, n.8, p.616-619, jul. 2006.

NABLE, R.O.; LANCE, R.C.M.; CARTWRIGHT, B. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. **Annals of Botany**, London, v.66, n.1, p.83-90, Jan. 1990.

PASQUAL, M. **Texto acadêmicos:** meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 127p.

PEREIRA, H.S.; VITTI, G.C.; KORNDORFER, G.H. Comportamento de diferentes fontes de silício no solo e na cultura do tomateiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.27, n.1, p.101-108, jan./fev. 2003.

ROCHA, H.S.; SILVA, C.R.R.; ARAÚJO, A.G.; SILVA, A.B. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata anã (AAB)': intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell culture and Micropropagation**, Lavras, v.3, n.1, p. 10-17, 2007.

SANGSTER, A.G.; HODSON, M.J.; TUBB, H.J. Silicon on deposition in higher plants. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 1999, Flórida. **Abstracts...** Florida: University of Florida, 1999.

SANTIAGO, E.J.A; PINTO, J.E.B.P.; CASTRO, E.M. de; LAMEIRA, O.A.; CONCEIÇÃO, H.E.O. da; GAVILANES, M.L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.D.C.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1035-1042, set./out. 2001.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.10, n.2, p.221-228, 1995.

SHACKEL, K.A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E.G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Jornal of The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.468-472, 1990.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A. de.; BRAGA, F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr). **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p.839-843, nov. 2008.

SILVA, D.P. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de gébera**. 2007. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 120p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, J.D.R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; VILLA, F.; CARVALHO, J.G. Adubação com silício via foliar na aclimatização de um híbrido de orquídea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.2, p.626-629, mar./abr. 2008.

TAKAHASHI, E. Uptake mode and physiological functions of silica. In: MATSUO, T.; KUMAZAWA, K.; ISHII, R.; ISHIHARA, K.; HIRATA, H. (Ed.). **Science of the rice plant: physiology**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1995. cap.5, p.420-433.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.1, n.3, p.42-47, nov./dez. 2001.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, 2001. 19p. (Circular Técnica, 24).

ZHOU, T.S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v.75, n.6, p.605-607, June 1995.

CAPITULO 2

INDUÇÃO AO ESTIOLAMENTO *IN VITRO* DE BROTOS DE ABACAXIZEIRO ‘GOMO DE MEL’

1 RESUMO

Objetivou-se obter explantes de abacaxizeiro através da técnica de estiolamento utilizando-se dois diferentes reguladores de crescimento. Brotações de abacaxizeiro já se encontravam preestabelecidas *in-vitro*. Brotos com aproximadamente 2,0 cm de comprimento foram colocados em meio de cultura MS acrescidos de 2mg. L⁻¹ de BAP, associados a diferentes concentrações de GA₃ (0; 6,5; 13,0 e 26,0 μM) e ANA (0; 5; 10 e 20 μM), e, em todas as combinações possíveis, os tubos foram mantidos no escuro para estiolamento. Avaliou-se número de brotos, entrenós e raízes e comprimento de parte aérea. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x4, quatro concentrações de ANA e quatro concentrações de GA₃, totalizando 16 tratamentos e cinco repetições. Observou-se interação significativa para as variáveis: comprimento de parte aérea, número de raízes e entrenós, não houve interação para número de brotos e nem para os fatores separadamente. Ausência de ANA e 13 μM GA₃ promove maior comprimento de parte aérea e número de raízes. Já adição de 20 μM ANA + 6,5 μM GA₃ proporciona maior número de entrenós.

2 ABSTRACT

It was to obtain pineapple explantes through the etiolate technique using two different growth regulators. Pineapple shoots were already pre-established *in vitro*. Shoots with approximately 2.0cm of length were placed in the culture medium MS added of 2mg. L⁻¹ of BAP, associated to different concentrations of GA₃ (0; 6.5; 13.0 and 26.0 μM) and ANA (0; 5; 10 and 20 μM), in all possible combinations, the tubes were kept in the darkness to etiolating. It was evaluated the number of shoots, internodes and roots and the length of aerial part. A

randomized completely design was adopted in a 4x4 factorial model, four concentrations of ANA and four concentrations of GA₃, totalizing 16 treatments and five replications. Significant interactions were observed to: length of aerial part, number of roots and internodes, it did not have interaction for number of shoots as well as for the factors separately. Absence of ANA and 13 µM GA₃ promotes greater length of aerial part and number of roots. By the other hand, the addition of 20 µM ANA + 6.5 µM GA₃ provides greater number of internodes.

3 INTRODUÇÃO

A aplicação da técnica de cultura de tecidos é de extrema importância para o agronegócio bem como para a inovação biotecnológica. Na cultura do abacaxi, a qualidade da muda é fundamental para se alcançar sucesso econômico no cultivo desta frutífera.

Muitas pesquisas têm focado a micropropagação de abacaxizeiro, como a regeneração de plantas através de brotos cultivados em meio sólido (Silva et al., 2008), porém, a proliferação de gemas axilares é, geralmente, preferida na micropropagação (Piza et al., 2003).

O cultivo *in vitro* dessa cultura é normalmente demorado se comparado a outras culturas, pois não se consegue a produção antes de nove a doze meses depois do estabelecimento *in vitro*. Nesse sentido, são propostos métodos de propagação rápida do abacaxizeiro, baseados no alongamento de brotos induzidos *in vitro*, por meio do estiolamento (Teixeira et al., 2001).

O estiolamento é o desenvolvimento de brotos, ramos ou partes desses em ausência de luz, o que causa o alongamento, paredes celulares mais delgadas e falta de clorofila nos órgãos próprios, apresentando assim coloração amarela ou branca.(Moreira et al., 2003).

Em vários trabalhos, o meio MS (Murashigue & Skoog, 1962) tem sido utilizado e vários reguladores de crescimento testados na iniciação e manutenção de propágulos no meio de cultura, especialmente combinações de auxinas e citocininas (Silva et al., 2007; Barboza & Caldas, 2001; Teixeira et al., 2001).

Para indução ao estiolamento *in vitro* não tem sido diferente, pesquisas buscando adequação de meios para essa finalidade são realizadas em abacaxizeiro (Moreira et al., 2003; Barboza & Caldas, 2001; Moreira et al., 1999), com o propósito de indicar melhor regulador de crescimento ou combinações do mesmo em concentrações específicas, a fim de se obter material regenerativo em grande quantidade e com qualidade genética e fitossanitária.

Diante disso, objetivou-se induzir o estiolamento *in vitro* de abacaxizeiro cv. 'Gomo de Mel', testando combinações de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ANA (ácido naftaleno acético) e GA₃ (ácido giberélico).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado de abacaxizeiro encontrava-se já estabelecido *in vitro*, o mesmo foi subcultivado em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido, suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, para posterior utilização no experimento.

Para a indução ao estiolamento foram testados dois reguladores de crescimento em quatro concentrações distintas: ANA (0; 5; 10 e 20 µM) e GA₃ (0; 6,5; 13e 26µM) em todas as combinações possíveis, em meio MS, adicionou-se ao mesmo 30g L⁻¹ de sacarose e 6g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, brotos com aproximadamente 2cm foram individualizados e inoculados, em tubos de ensaio de 25x150 mm contendo 15mL do meio de cultivo com os diferentes

tratamentos. Após a inoculação, os frascos foram fechados com tampas de polipropileno e vedados com parafilme. As culturas foram mantidas em condições controladas de sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, em armários de aço conferindo ambiente escuro.

Após 60 dias, os propágulos foram avaliados com base nas características biométricas: número de brotos, entrenós e raízes e comprimento de parte aérea.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×4 , quatro concentrações de ANA e quatro concentrações de GA_3 , totalizando 16 tratamentos e cinco repetições, cada uma composta por quatro tubos. Os dados foram submetidos à análise de variância, as médias de fator quantitativo foram comparadas por regressão polinomial, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se, para todas as variáveis analisadas, que brotos estiolados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento promoveram apenas crescimento da parte aérea e alongamento foliar, não ocorrendo brotações e principalmente entrenós (Figura 1).

Para número de brotos não houve diferenças estatísticas significativas tanto para interação, quanto para os fatores isoladamente.

Houve interação significativa para comprimento de parte aérea para ANA dentro dos níveis de 6,5 e 13 μM de GA_3 conforme apresentado na Figura 2. Maior comprimento foi observado quando se acrescentou ao meio MS 13 μM GA_3 na ausência de ANA, o qual foi significativamente melhor para comprimento dos brotos estiolados, porém, não foram encontrados trabalhos onde se utilizou a combinação de ANA e GA_3 para indução do estiolamento.

Alguns trabalhos testando ANA e BAP demonstraram que o estiolamento *in vitro* de abacaxizeiro pode ser obtido sem aplicação exógena de auxinas (Moreira et al., 2003; Barboza & Caldas, 2001; Praxeses et al., 2000). Por outro lado, Sá et al. (2000) observaram que maior comprimento de segmentos estiolados foi obtido com 10 μM BAP + 10 μM ANA.

Os resultados obtidos neste trabalho para comprimento de parte aérea foram superiores aos apresentados por Moreira et al., (2003), trabalhando com o cultivar Pérola, testaram combinações de ANA e BAP aliados ao tempo de escuro que permaneceram a cultura.

O comprimento de brotos estiolados é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações, quando colocados em condições de luz.

Assim como para comprimento de parte aérea o uso apenas de GA_3 foi eficaz, a ausência de ANA e 13 μM GA_3 proporcionou maior número de raízes em brotos estiolados de abacaxi ‘Gomo de Mel’(Figura 3). Tal fato demonstra que ausência de auxinas não é prejudicial ao enraizamento, porém quando associado a doses de GA_3 promove aumento significativo no número de raízes.

Uma possível explicação para os resultados obtidos utilizando GA_3 é que um dos efeitos fisiológicos básicos das giberelinas em plantas é a aceleração do crescimento caulinar.

Já para número de entrenós, a combinação ANA+ GA_3 proporcionou maiores resultados, e o uso de 20 μM ANA + 6,5 μM GA_3 apresentou média de 7,75 entrenós (Figura 4).

No escuro, os entrenós do abacaxizeiro se alongaram, separando os nós que, normalmente, em presença de luz, permanecem próximos. Para fins de micropropagação, essa separação de nós facilita o desenvolvimento de gemas axilares e a manipulação de propágulos quando submetidos à regeneração.

6 CONCLUSÕES

Ausência de ANA e 13 μM GA₃ promove maior comprimento de parte aérea e número de raízes.

A adição de 20 μM ANA + 6,5 μM GA₃ proporciona maior número de entrenós.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G. de; FRAGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.5, p.1002-1006, set./out. 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantrarum**, Copenhagem, v.15, n.3, p.473-497, July 1962.

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

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

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A. de.; BRAGA; F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr). **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p.839-843, nov. 2008.

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

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.
Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas
micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**.
Brasília, v.1, n.3, p.42-47, nov./dez. 2001.

ANEXOS

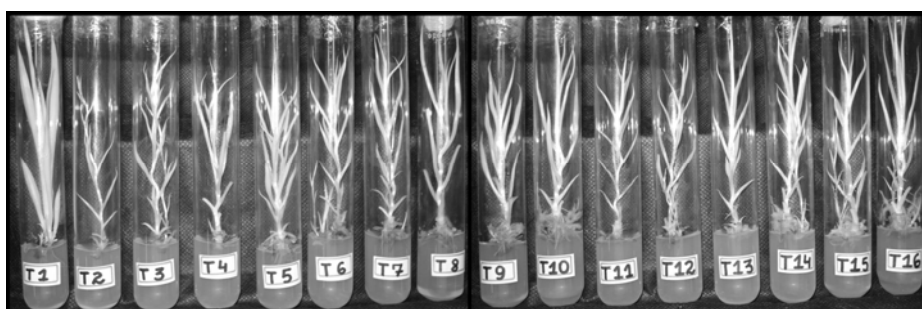


FIGURA 1 Estiolamento de abacaxizeiro cv. 'IAC-Gomo de Mel', cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de GA3 e ANA.

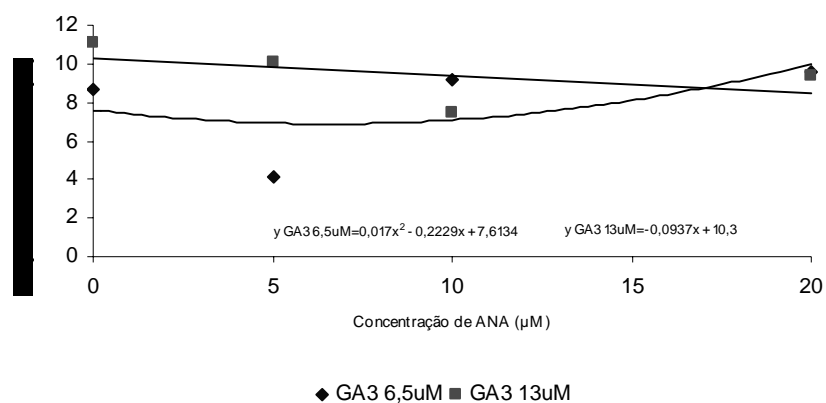


FIGURA 2 Comprimento de parte aérea (cm) em brotações estioladas de abacaxi cv. 'Gomo de Mel' cultivado em meio de cultura com diferentes concentrações de ANA e GA3.

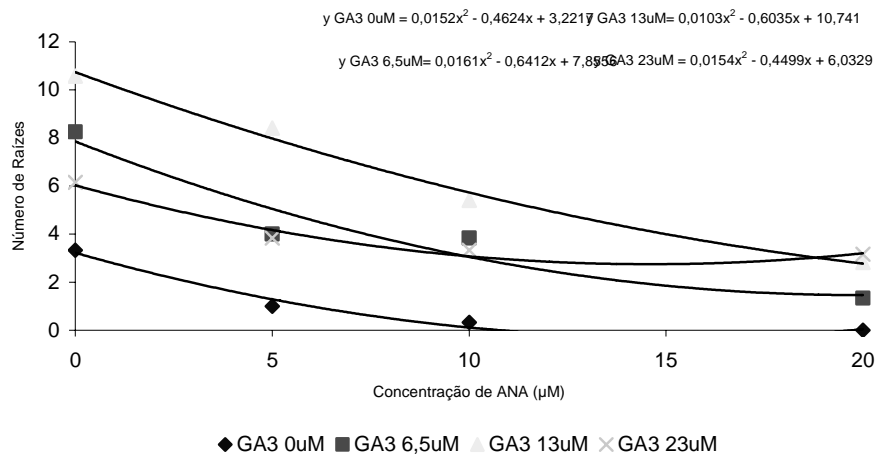


FIGURA 3 Número de raízes em brotações estioladas de abacaxi cv. 'Gomo de Mel' cultivado em meio de cultura com diferentes concentrações de ANA e GA3.

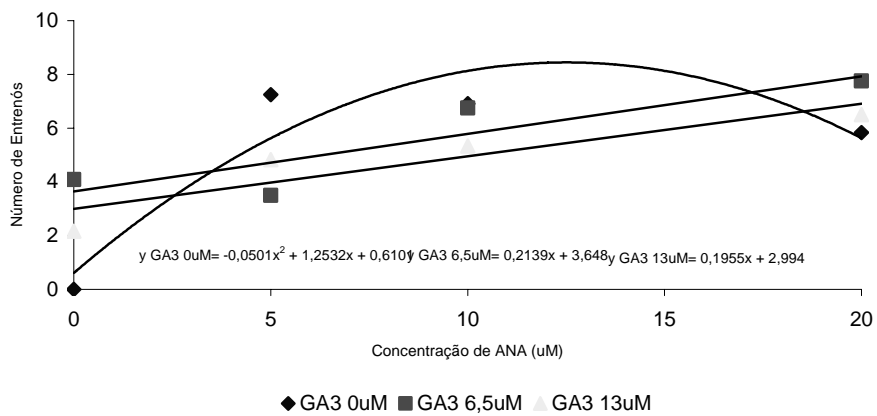


FIGURA 4 Número de entrenós em brotações estioladas de abacaxi cv. 'Gomo de Mel' cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de ANA e GA₃.

CAPITULO 3

LUZ E EXPLANTE NA REGENERAÇÃO DE ABACAXIZEIRO ‘GOMO DE MEL’ ESTIOLADO *IN VITRO*: CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS

1 RESUMO

Objetivou-se avaliar o uso da luz natural e artificial e o tipo de explante estiolado na regeneração *in vitro* de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’, através de análises biométricas e anatômicas. O material vegetal utilizado de abacaxi encontrava-se já estabelecido *in vitro*, brotos estiolados foram utilizados como fonte de explante para o experimento de regeneração *in vitro*. Utilizou-se o meio MS líquido suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP, 30g L⁻¹ de sacarose. Foram avaliados três tipos de explantes do broto estiolado: região basal, mediana e apical. Avaliaram-se também dois ambientes de cultivo: 1) sala de crescimento (luz artificial) a temperatura de 25±2°C, irradiância de 45 W.m⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W e fotoperíodo de 16 horas e 2) casa de vegetação (luz natural), com média de 115,08 W.m⁻².s⁻¹ e 33 °C. Após 60 dias, os propágulos foram avaliados com base nas características fitotécnicas e anatômicas. Maior número de brotos e massa fresca é obtido em ambiente de luz artificial independente do tipo de explante. Já para espessura dos tecidos do limbo foliar, o ambiente de luz natural promove as maiores espessuras. Luz natural e posição basal do explante estiolado proporcionam maior número de estômatos/mm² e diâmetro polar e equatorial.

2 ABSTRACT

It was aimed to evaluate the use of the natural light and explants type etiolated in the *in vitro* regeneration of pineapple ‘Gomo de Mel’, through phytotecnics and anatomical analyses. The vegetal material of pineapple was already established *in vitro*, etiolated shoots were used as source of explants for the regeneration experiment *in vitro*. It was used the MS liquid medium supplemented with 2 mg. L⁻¹ of BAP, 30g L⁻¹ of sucrose. Three types of the

explants of the etiolated shoot were evaluated: basal, medium and apical region. Two environments of culture were also evaluated: 1) growth room (artificial light), with temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiance of $45 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ supplied by white fluorescent light of 20W and photoperiod of 16 hours and 2) greenhouse (natural light), with $115.08 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 33°C . After 60 days the propagules were evaluated through the phytotechnical and anatomical characteristics. Bigger number of shoots and fresh mass were obtained in artificial light environment independent of the explants type. For the foliar limb tissues thickness, the environment of natural light promoted the biggest thicknesses. Natural light and basal position of the etiolated explants provide greater number of stomata/ mm^2 and polar and equatorial diameter.

3 INTRODUÇÃO

Os métodos utilizados na propagação convencional de abacaxizeiro apresentam baixo rendimento de mudas e podem disseminar a fusariose, doença responsável por perdas de produtividade no campo.

As técnicas de cultura de tecidos têm apresentado vantagens em relação ao método convencional, como, por exemplo, produção em larga escala e mudas livres de patógenos (Silva et al., 2007), porém o emprego comercial desta técnica é reduzido em virtude dos altos custos de produção, principalmente com mão-de-obra especializada e perdas durante o processo de aclimatização (Teixeira et al., 2001; Rocha et al., 2007).

O que eleva o custo de produção de mudas micropropagadas é o gasto com energia elétrica em salas de crescimento. Uma alternativa para esse fator seria o cultivo *in vitro* em ambiente de luz natural. Essa tecnologia não é muito adotada, por não estarem esclarecidos seus efeitos sobre as culturas que, convencionalmente, são condicionadas em luz artificial, com intensidades

luminosas inferiores e com fotoperíodo e temperatura controlados (Erig & Schuch, 2005).

O fator luz é fundamental para o desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*. A luz influencia em aspectos anatômicos e fisiológicos, interferindo na qualidade das plantas durante o processo de aclimatização.

Dessa forma, objetivou-se avaliar diferentes ambientes de luz e posição do explante estiolado na regeneração *in vitro* de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’, por meio de análises fitotécnicas e anatômicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado de abacaxizeiro encontrava-se já estabelecido *in vitro*, o mesmo foi induzido ao estiolamento em meio MS com 20 μM ANA, 6,5 μM GA₃, 30g L⁻¹ de sacarose e 6g L⁻¹ de ágar, em ausência de luz. Após 60 dias, os brotos estiolados foram utilizados como fonte de explante para o experimento de regeneração *in vitro*.

Para regeneração *in vitro* dos brotos estiolados utilizou-se o meio MS líquido suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP, 30g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Foram avaliadas três posições de explantes do broto estiolado: basal, mediana e apical. Avaliaram-se também dois ambientes de cultivo: 1) sala de crescimento (luz artificial) e 2) casa de vegetação (luz natural).

1) À temperatura de 25±2°C, irradiância de 45 W.m⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W e fotoperíodo de 16 horas e 2) casa de vegetação (luz natural), a radiação e temperatura dentro da casa de vegetação foi avaliada utilizando sensor de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 12 horas (das 06:00 às 18:00 horas). Os dados da caracterização do

comportamento diurno da radiação solar e da temperatura estão apresentados abaixo (Figura 1 A e B).

Após 60 dias, os propágulos foram avaliados com base nas características biométricas: número de brotos, massa fresca e seca.

Para caracterização da anatomia foliar foram mensurados espessura das epidermes abaxial e adaxial, parênquimas aquífero e clorofiliano, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). As variáveis paradérmicas, número de estômatos/mm² e diâmetro polar e equatorial foram realizadas segundo técnica de Laboriau et al., (1961) e a caracterização paradérmica da folha na superfície abaxial utilizando protocolo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de Alves (2004).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2, com seis tratamentos e dez repetições, cada uma composta por um frasco contendo cinco brotos. Os dados foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 60 dias de cultivo, todos os explantes utilizados nos tratamentos (basal, meidia e apical) dos brotos estiolados regeneraram (Figura 1). Verificou-se também que não houve interação significativa para as fontes de variação estudadas, porém, quando se analisou isoladamente ambiente de luz e tipo de explante, os mesmos apresentam diferenças significativas (Tabela 1).

Para número de brotos por explante e massa fresca desses brotos, o ambiente luz artificial apresentou maiores resultados, já para massa seca não houve diferença quanto ao ambiente de luz.

Para o tipo de explante utilizado, verificou-se que houve diferenças apenas para a variável massa fresca, onde o uso da posição apical do explante foi superior em relação aos demais, porém não diferiu estatisticamente da posição mediana. Mesmo não ocorrendo diferenças para número de brotos e massa fresca, o explante apical apresentou maiores resultados.

A concentração de auxinas endógenas na planta não é uniforme. Segundo Cid (2000), essas concentrações diminuem ao longo do caule, em ordem decrescente, onde maiores concentrações estão no ápice, depois gemas axilares, sementes em formação, folhas novas, folhas maduras, ápices radiculares, grão de pólen e câmbio. Essa afirmativa pode explicar os resultados apresentados neste trabalho onde a região apical do broto apresentou as maiores médias, podendo estar relacionado à maior concentração endógena de auxinas nessa região.

Nenhum trabalho reporta a utilização de diferentes ambientes de luz para a regeneração *in vitro* de brotos estiolados, porém, Dias et al., (2008) trabalhando com abacaxi ornamental e testando diferentes concentrações de BAP na regeneração de brotos estiolados, verificaram que 4,44 μM de BAP aos 60 dias de cultivo *in vitro* proporcionaram maior número de propágulos regenerados. Já Barboza & Caldas (2001) observaram que o uso de 2mg.L⁻¹ de BAP foi mais eficiente na regeneração de brotos estiolados de abacaxizeiro híbrido PExSC – 52.

Quanto à escolha de uma região ideal do explante estiolado para regeneração, poucos trabalhos indicam qual a melhor posição para utilizar como fonte de explante, onde normalmente usa-se a região mediana. Pereira et al. (2007) cita a retirada da posição basal e apical do broto estiolado com o intuito de quebrar a dominância apical, sendo que, normalmente, os ápices são descartados. Os autores citam ainda a possibilidade de se obter propágulos

provenientes tanto da posição mediana, quanto a basal e apical, podendo assim aproveitar todas as partes dos brotos estiolados.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os de Pereira (2006) trabalhando com Curaúá onde a autora observou que não houve diferença significativa quanto ao uso de diferentes posições do broto estiolado para regeneração, comprovando assim o aproveitamento de todas as partes dos brotos.

Secções transversais de folhas de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ para todos os tratamentos apresentaram epidermes unisseriadas, mesofilo dorsiventral com parênquima aquíífero voltada para superfície adaxial e clorofiliano para a superfície abaxial. Estômatos apenas na epiderme da superfície abaxial, sendo, portanto, hipoestomático (Figuras 2 e 3).

Observou-se que folhas desenvolvidas em ambiente de luz natural apresentaram mesofilo mais espesso, tecido do parênquima aquíífero com 5 a 6 camadas de células arredondadas. Parênquima clorofiliano com células arredondadas com poucos espaços intercelulare. Já folhas desenvolvidas em ambientes de luz artificial apresentaram mesofilo mais delgado. Ambos tratamentos apontaram a presença de tricomas tectores glandulares multicelulares (Figura 2).

A espessura da epiderme abaxial e adaxial e parênquima clorofiliano foi maior em folhas desenvolvidas sob luz natural e proveniente da posição basal do explante, ocorrendo interação significativa para todas as variáveis. Já parênquima aquíífero, luz natural, porém, explante da região apical, apresentou maior espessura desse tecido (Tabela 2).

O aumento na espessura dos tecidos que compõem o limbo constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz evidenciando a plasticidade adaptativa da planta (Lee et al., 2000). A capacidade de alterar a estrutura da folha em resposta ao ambiente, principalmente ao nível

de irradiância, tem sido comumente observada em diversas espécies (kiwi, banana e abacaxi), cultivadas *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997; Rocha, 2007; Silva et al., 2008).

Corroborando com os dados obtidos neste trabalho, Dignart et al., (2009) trabalhando com *C. walkeriana* (Orchidaceae), observaram aumento na espessura dos tecidos que compõem o limbo foliar quando se utilizou luz natural como ambiente de cultivo. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al., (2008) ao avaliarem o uso de luz natural no enraizamento *in vitro* de abacaxizeiro cv. Imperial, onde este ambiente também proporcionou maiores espessuras dos tecidos.

Tais resultados apontam a plasticidade anatômica das plantas, demonstrando a adaptação dos tecidos às condições de alta irradiância. As alterações promovidas pelo ambiente podem tornar a folha semelhante àquela encontrada em ambiente natural, podendo evidenciar uma maior capacidade fotossintética.

Para as características paradermicas, as folhas apresentaram estômatos do tipo tretracítico, estando presentes apenas na superfície abaxial, tricomas multicelulares glandulares captados, tricomas não glandulares escamiformes achatados e multicelulares (Figura 3). A presença de tricomas escamiformes já foi reportado por Batagin et al., (2009) quando avaliaram alterações morfológicas foliares no cultivar ‘Gomo de Mel’ aclimatizados em diferentes condições luminosas. Barboza et al., (2006) porém, apontaram apenas a presença de tricomas tectores no cultivar ‘Pérola’, podendo este tricoma ser característico apenas do cultivar em estudo.

Houve interação significativa entre os fatores estudados, onde maior número de estômatos/mm² foi observado em folhas desenvolvidas em ambiente de luz natural e utilizando a posição mediana como explante e não diferindo estatisticamente da luz natural e posição mediana e apical. Os diâmetros polar e

equatorial dos estômatos mostram-se maiores quando submetidos ao ambiente de luz natural e o explante utilizado da posição basal do broto estiolado. Maior razão diâmetro polar e equatorial foi observado em estômatos de folhas desenvolvidas em luz artificial e se utilizou posição basal do explante.

Alguns autores descrevem que, apesar da variabilidade estomática ser um fenômeno relacionado principalmente à umidade relativa dentro dos frascos, a intensidade luminosa pode ter implicações nesse processo (Dignart et al., 2009). Assim, de acordo com os resultados apresentados, pode-se notar que as maiores densidades estomáticas estão geralmente associadas à alta irradiância.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com Braga et al., (2009) e Dignart et al., (2009) que, trabalhando respectivamente com crisântemo e orquídea, verificaram maior número de estômatos em folhas desenvolvidas *in vitro* em condições de casa de vegetação, sendo que resultados semelhantes foram observados também para diâmetro polar e equatorial dos estômatos.

6 CONCLUSÕES

O ambiente de luz artificial proporciona maior número de brotos e massa fresca em abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’, podendo-se utilizar todas as posições do explante estiolado regeneração *in vitro*.

Maiores espessuras dos tecidos que compõem o limbo foliar ocorreram quando explantes foram regenerados em ambiente de luz natural.

Maior número de estômatos e diâmetros polar e equatorial dos mesmos foi obtido quanto se utilizou ambiente de luz natural e a posição basal do explante estiolado na regeneração.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras. UFLA/FAEPE, 2004. 88p.

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

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

BATAGIN, K.D.; ALMEIDA, C.V.; TANAKA, F.A.O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv. IAC “Gomo de Mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições luminosas. **Acta Botânica Brasília**, Porto Alegre, v.23, n.1, p. 85-92, jan./jun. 2009.

BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de; DIGNART, S.L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J.M.P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. rage: características morfofisiológicas. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.

CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2000. 180p.

DIAS, G.M.G.; CARVALHO, A.C.P.P de; PINHEIRO, M.V.M.; MORAIS, J.P.S. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v.4, n.1, p. 1-7, 2008.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. 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 Cultured**, Dordrecht, v.47, n.2, p.127-134, May 1997.

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

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo: I, Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-252, jan./jun. 1961.

LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. 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, v.87, n.4, p.447-455, Apr. 2000.

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

PEREIRA, F.D. **Propagação *in vitro* do curauá [*Ananas erectifolius* (L.B.Sm) – Bromeliaceae] a partir de brotos estiolados e caracteres anatômicos de folhas**. 2006. 78p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; DE CASTRO, D.M.; RODRIGUES, H.C.D.A.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. Anatomical characters of curauá foliar fibers from plantlets *in vitro* propagation. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v.29, n.1, p. 23-28, jan./jun. 2007.

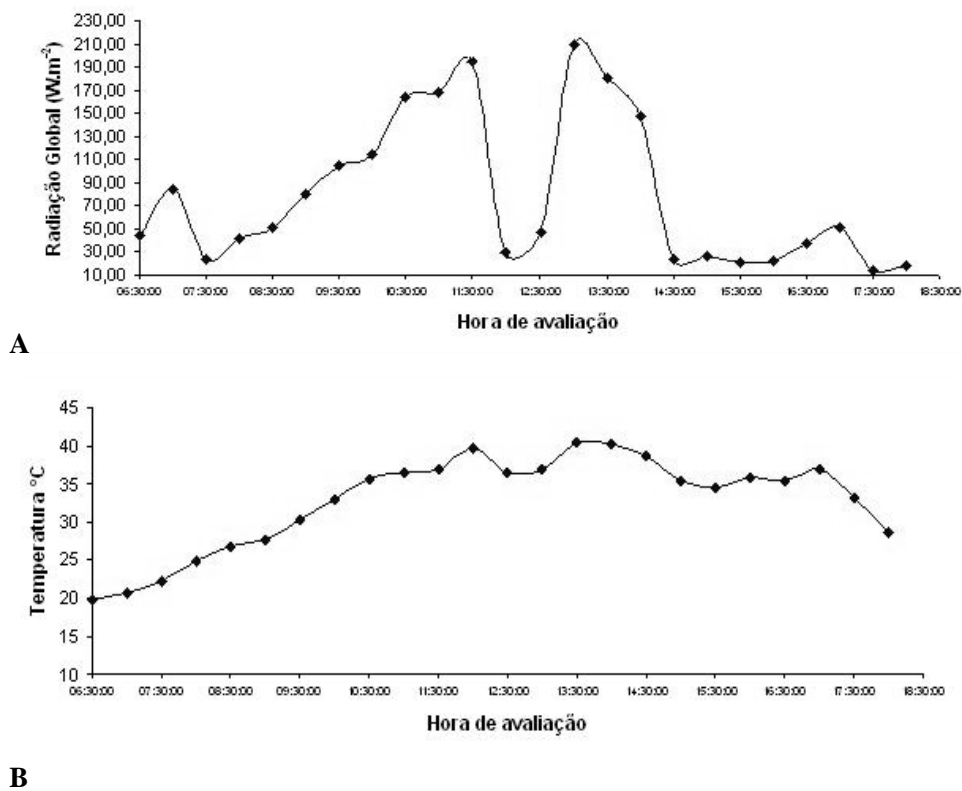
ROCHA, H.S.; SILVA, C.R.R.; ARAÚJO, A.G.; SILVA, A.B. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata anã (AAB)': intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell culture and Micropropagation**, Lavras, v.3, n.1, p. 10-17, 2007.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A. de.; BRAGA; F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr). **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p.839-843, nov. 2008.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; TEIXERIA, J.B.; ARAUJO, A.G. de. Métodos na micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.9, p.1257-1260, set. 2007.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.
Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas
micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**.
Brasília, v.1, n.3, p.42-47, nov./dez. 2001.

ANEXOS



A

B

FIGURA 1 Comportamento diurno radiação solar global (A) e da temperatura (B) na casa de vegetação (luz natural).

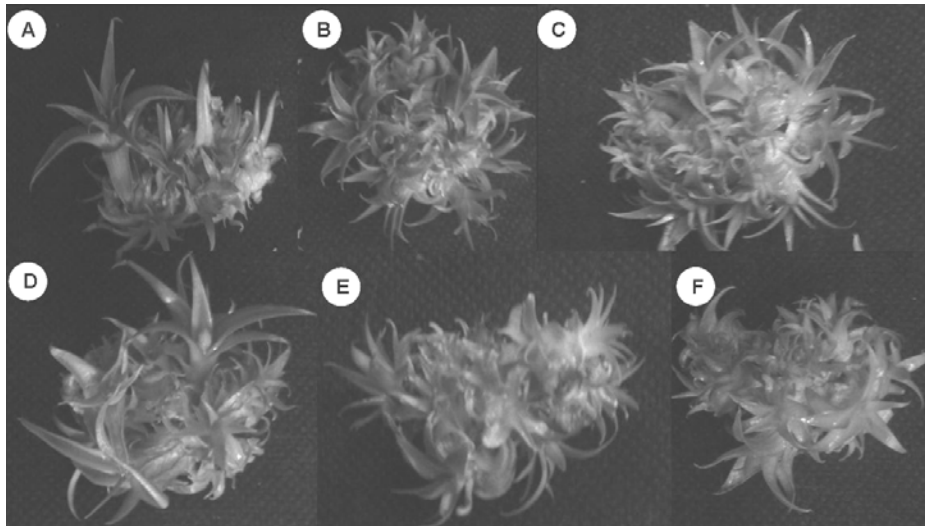


FIGURA 2 Brotos regenerados *in vitro* de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. LN-Basal (A), LN-Mediana (B), LN-Apical (C), LA-Basal (D), LA-Mediana (E) e LA-Apical (F). LN=Luz Natural e LA=Luz Artificial.

TABELA 1 Número de brotos (NB), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da parte aérea de abacaxizeiro regenerado com diferentes tipos de explantes e luz natural.

	Luz		
	NB	MF	MS
Luz Artificial	10,73a*	3,61a	0,18a
Luz Natural	7,40b	2,85b	0,18a
Explante			
Basal	7,50a	2,75b	0,176a
Mediana	9,60a	3,30ab	0,184a
Apical	10,10a	3,65a	0,194a

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 2 Espessura dos tecidos do limbo foliar⁽¹⁾ de abacaxizeiro regenerado com diferentes tipos de explantes e luz natural.

	Epiderme Abaxial (μm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	26,30aA	27,55aA	26,55aA
Luz Natural	39,40bA	20,69aB	26,92aB
	Parênquima Clorofiliano (μm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	573,41aA	414,35bB	404,78bB
Luz Natural	603,87aA	567,41aAB	535,95aB
	Parênquima Aquifero (μm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	562,92aA	355,78bB	491,19bA
Luz Natural	562,28aB	501,80aB	681,03aA
	Epiderme Adaxial (μm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	35,49bA	33,50aA	35,13aA
Luz Natural	53,19aA	28,33aB	32,96aB

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3 Número de estômatos (NE), diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) e razão diâmetro polar e equatorial (DP/DE) de estômatos de abacaxizeiro regenerado com diferentes tipos de explantes e luz natural.

	Número de estômatos (mm²)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	39,40bA	37,61bA	48,35aA
Luz Natural	58,50aA	61,49aA	51,93aA
	Diâmetro Polar (µm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	43,62bB	54,23aA	55,68aA
Luz Natural	68,23aA	53,74aB	48,23bB
	Diâmetro Equatorial (µm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	28,69aB	50,52aA	43,84aA
Luz Natural	53,81aA	46,73aA	46,34aA
	Razão DP/DE (µm)		
	Basal	Mediana	Apical
Luz Artificial	1,54aA	1,12aB	1,30aAB
Luz Natural	1,36aB	1,15aAB	1,05aB

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

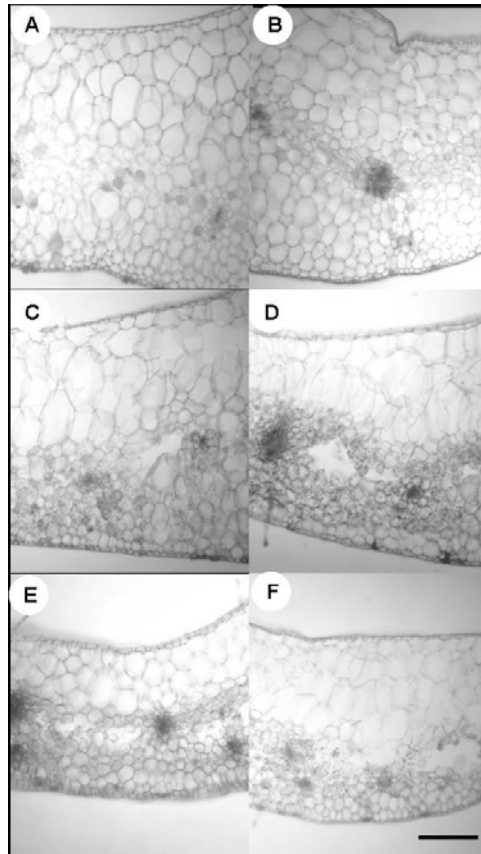


FIGURA 2 Fotomicrografias de secções transversais de folhas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. LN-Base (A), LN-Meio (B), LN-Ápice (C), LA-Base (D), LA-Meio (E) e LA-Ápice (F). LN=Luz Natural e LA=Luz Artificial. Barra = 40 μ m.

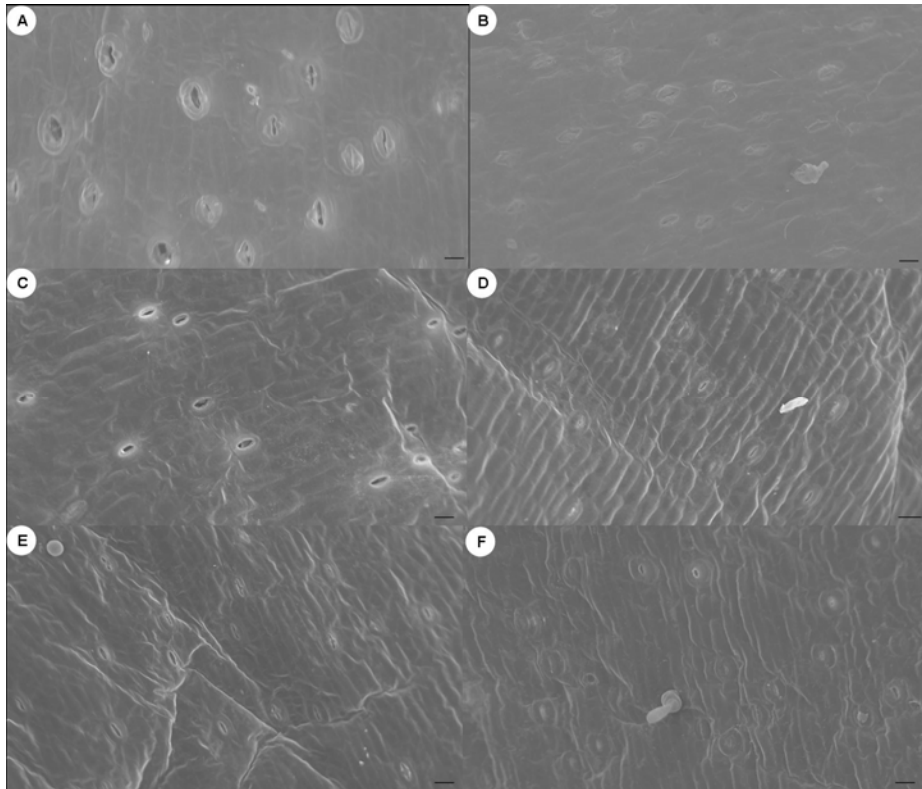


FIGURA 3 Eletromicrografias de folhas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. LN-Base (A), LN-Meio (B), LN-Ápice (C), LA-Base (D), LA-Meio (E) e LA-Ápice (F). LN=Luz Natural e LA=Luz Artificial. Barra = 20 μ m.

CAPITULO 4

FONTES DE SILÍCIO NA MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO 'GOMO DE MEL': CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS

1 RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência da adição de silício no meio básico de cultura MS sobre a micropropagação do abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’. Brotos com 2 cm foram cultivados em meio MS acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 2 mg.L⁻¹ de BAP e 1,0 g.L⁻¹ de silicato de cálcio e potássio, a testemunha foi o meio MS completo sem silício e 6 g.L⁻¹ de ágar. Os brotos foram mantidos por 60 dias em sala de crescimento a 25±1 °C, 36µmol.m⁻².s⁻¹ durante 16 horas. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições. Avaliaram-se características fitotécnicas e anatômicas dos propágulos *in vitro*. Maior número de brotos, massa fresca e seca foi observado quando se adicionou ao meio silicato de potássio. Adição de silicato de potássio ao meio MS ofereceu maiores espessuras dos tecidos do mesofilo foliar, maior número de estômatos, bem como maiores diâmetros polar e equatorial dos mesmos.

2 ABSTRACT

It was aimed to evaluate the influence of the silicon addition in the MS culture medium on the micropropagation of the pineapple ‘Gomo de Mel’. Shoots with 2 cm were cultivated in MS medium added with 30g.L⁻¹ of sucrose, 2 mg. L⁻¹ of BAP and 1,0 g.L⁻¹ of calcium and potassium silicate, the control treatment was the complete MS medium without silicon and 6 g.L⁻¹ of agar. The shoots were maintained for 60 days in growth room 25±1°C, 36µmol.m⁻².s⁻¹ during 16 hours. The experiment was installed in a randomized completely design, with ten replications. Anatomical and developmental characteristics of the propagules were evaluated *in vitro*. Bigger number of shoots, fresh and dry mass was observed when it was added potassium silicate to the medium. The

potassium silicate addition to the MS medium offered greater thicknesses of the foliar mesophyll tissues, bigger number of stomatas, as well as, polar and equatorial greater diameters.

3 INTRODUÇÃO

O meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de tecidos *in vitro*. Plantas ou explantes cultivados nessas condições têm exigências nutricionais específicas. Assim, durante o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, considerando os elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (Torres et al., 2001). Conforme citam os mesmos autores, os meios de cultura podem ser ainda modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando.

Por não ser considerado um elemento essencial às plantas, o silício (Si) não tem sido muito estudado na micropropagação. Contudo, do ponto de vista fisiológico, este elemento tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas (Gomes et al., 2008). Segundo o autor, acredita-se que ele possa interferir na arquitetura das plantas, favorecendo a fotossíntese, ao proporcionar folhas mais eretas, o que significa maior eficiência fotossintética.

Analisando anatomicamente folhas cultivadas em meio contendo alguma fonte de silício, é possível observar silicofitólitos, que são depósitos de silício que ocorrem na parede celular como incrustação e/ou impregnação ou, ainda, sob a forma de corpos silicosos (opala) no interior das células de diferentes tecidos (Sangster, 1999). Trabalhando com fontes de silicato na micropropagação de morangueiro, Braga et al. (2009) verificaram a presença de corpos silicosos no interior das células do tecido paliçádico.

Na epiderme foliar, o silício combina-se com a celulose podendo estar presente nas células-guarda dos estômatos e nos tricomas. O silício também pode estar presente nos elementos vasculares.

A forma adquirida pelos depósitos do silício, bem como a sua distribuição no interior do vegetal, depende da espécie em estudo e das condições do ambiente de crescimento, podendo ser característica para uma espécie, gênero e, mesmo, para algumas famílias, sendo, então, um caráter com aplicação taxonômica (Wrang et al., 1998).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar fontes e doses de silício na micropropagação de abacaxi ‘Gomo de Mel’, a fim de melhorar a qualidade das mudas, através de análises fitotécnicas e anatômicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado de abacaxi encontrava-se já estabelecido *in vitro*, o mesmo foi subcultivado em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido, suplementado com adição de 30g L⁻¹ de sacarose, para posterior utilização no experimento.

Foram testadas duas fontes de silício: silicato de cálcio (CaSiO₃) e silicato de potássio (K₂SiO₃) na dosagem de 1g.L⁻¹ e o meio MS padrão (sem fonte de silicato) como testemunha. Adicionou-se ao meio de cultura 30g L⁻¹ de sacarose, 2mg.L⁻¹ de BAP e 6g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, brotos com aproximadamente 2 cm foram individualizados e inoculados, em frascos com capacidade de 200 mL, contendo 30 mL do meio de cultivo com os tratamentos. Após a inoculação, os frascos foram fechados com tampas de polipropileno e vedados com parafilme. Os explantes foram mantidas em sala de crescimento a

25±2°C, irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W e fotoperíodo de 16 horas.

Após 60 dias, os propágulos foram avaliados com base nas características biométricas: número de brotos, massa fresca e seca.

Para as características anatômicas foram mensurados espessura das epidermes abaxial e adaxial, parênquimas aquífero e clorofiliano e mesofilo, seguindo a metodologia descrita por Kraus e Arduin (1997). As variáveis parâdermicas, número de estômatos/ mm^2 e diâmetro polar e equatorial, foram realizados segundo técnica de Laboriau et al., (1961) e a caracterização parâdermica da folha na superfície abaxial utilizando protocolo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de Alves (2004).

Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e dez repetições, cada uma composta por um frasco contendo três brotos. Os dados foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Maior número de brotações e massa seca de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ foi observado quando se acrescentou ao meio MS silicato de potássio (K_2SiO_3), diferindo significativamente em relação ao uso de silicato de cálcio (CaSiO_3) e ao meio MS sem adição de silicato, não houve diferenças significativas apenas para massa fresca dos brotos (Tabela 1).

Em comparação com o tratamento testemunha (MS), pode-se verificar que, tanto para número de brotações, quanto para massa fresca e seca, os resultados apresentados pelo tratamento utilizando-se K_2SiO_3 foram superiores para essas variáveis. Isso demonstra que a capacidade de absorção e acúmulo de

silício pelas plantas é variável de acordo com a forma com que esse elemento é disponibilizado, bem como a espécie estudada.

Brotos de abacaxizeiro submetidos aos tratamentos com fontes de silício apresentaram folhas mais eretas e com coloração verde mais escura. Essas características eram esperadas, uma vez que o silício é prontamente absorvido pelas plantas e depositado principalmente nas paredes das células da epiderme, onde confere maior resistência ao ataque de insetos, podendo também regular a perda de água (Korndörfer, 2006), sendo essa característica favorável às plantas cultivadas *in vitro*, por ocasião da aclimatização.

Quanto à coloração das folhas apresentarem-se mais verdes, pode-se supor que o uso de silício aumente os teores de clorofila nos tecidos do mesófilo foliar. Esse efeito já foi reportado por Braga et al. (2009) testando três fontes de silício no cultivo *in vitro* de morangueiro, onde verificaram que o uso de K_2SiO_3 promoveu aumento nos teores de clorofila, assim como Adatia & Besford (1986) observaram maiores níveis de clorofila e massa foliar em pepineiro quando utilizaram silicatos na propagação convencional dessa cultura.

Contrariamente aos resultados apresentados neste trabalho, Zhou (1995) verificou aumento no tamanho das folhas de *Phalaenopsis* cultivadas *in vitro* quando utilizou $CaSiO_3$ ao meio de cultura, reforçando assim a seletividade quanto a fontes específicas de silício para cada espécie. Essa diferença de resultados poderia ser explicada pelo fato de que o crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do desenvolvimento em meios de cultura otimizados para cada espécie e da perfeita interação de componentes essenciais como fontes de carbono e nutrientes minerais.

As folhas de abacaxizeiro micropropagadas utilizando fontes de silício ao meio apresentam limbo foliar com epidermes unisseriadas, estômatos apenas na superfície abaxial das folhas (hipostomática) (Figura 2B setas), parênquimas aquífero e clorofiliano desorganizados, sendo que, para o parênquima aquífero

de folhas dos tratamentos com silício apresentaram células menores e achatadas em relação à testemunha, observou-se também tricomas glandulares multicelulares captados (Figura 2A) e fibras ao longo do parênquima clorofiliano (Figura 1 e 2A).

Caracterizando paradermicamente essas folhas, verifica-se que os estômatos são do tipo tretracítico, estando presentes apenas na superfície abaxial das folhas, com presença de tricomas multicelulares glandulares captados (Figura 2A e 3B seta), tricomas não glandulares escamiformes achatados e multicelulares (Figura 2C).

Essas características também foram observadas por Batagin et al., (2009) trabalhando com abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’, onde verificaram a presença de tricomas glandulares e escamiformes nas folhas cultivadas *in vitro*, porém, Barboza et al., (2006) apenas descreveram a presença de tricomas glandulares no cultivar Pérola. A presença de tricomas na epiderme foliar de plantas *in vitro* pode ser uma adaptação morfológica que atua na restrição da perda de água, por meio da regulação da temperatura e reflexão da luz.

Houve diferenças estatísticas para todas as variáveis anatômicas avaliadas, com exceção para espessura da epiderme adaxial (Tabela 2). A adição de CaSiO_3 ao meio promoveu maior espessura da epiderme abaxial, maior espessura do parênquima clorofiliano foi observado em MS acrescido de silício, independente da fonte utilizada. Já o parênquima aquífero e mesófilo, o tratamento com K_2SiO_3 foi o que apresentou maior espessura.

Como observado no trabalho, maior parênquima clorofiliano foi detectado quando se utilizou uma fonte de silício ao meio. A especialização do tecido clorofiliano conduz à eficiência fotossintética da planta, onde a grande maioria dos cloroplastos é encontrada. A disposição dessas organelas na célula promove a máxima captação de luz.

Observou-se, no tratamento com K_2SiO_3 , maior espessamento do parênquima aquífero, essa característica é importante, já que o tecido armazena água, exercendo importante papel na economia de calor, evitando o colapso celular pelo murchamento e contribuindo para adaptação da planta a ambientes sujeitos a desidratação.

Essas características corroboram as afirmações de Barboza et al., (2006) e Batagin et al., (2009) uma vez que os autores ressaltam que o parênquima aquífero não exerce função bem definida em plantas *in vitro*, devido à condição heterotrófica e controlada a qual é submetida, entretando, esse tecido pode assumir importante função no momento da aclimatização, impedindo a desidratação nos primeiros dias após o transplântio.

Assim como apresentado neste trabalho, Silva (2007), no cultivo *in vitro* de gérbera, não observou diferenças significativas nas espessuras das epidermes, quando se utilizaram fontes de silício ao meio de cultura. Porém, para espessura dos tecidos do mesófilo, o autor verificou aumento na espessura desses tecidos utilizando K_2SiO_3 , corroborando com os resultados obtidos com abacaxi ‘Gomo de Mel’.

Diferenças estatísticas foram observadas para análise paradérmica da folha, onde brotos do tratamento com K_2SiO_3 apresentam folhas com maior número de estômatos, assim como maior diâmetro polar e relação diâmetro polar/equatorial, no entanto, os diâmetros equatoriais não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Observou-se a presença de cera epicuticular na epiderme abaxial nas folhas de propágulos submetidos aos tratamentos com silício (Figura 3 B1 e C1).

A presença de ceras em plantas cultivadas *in vitro* geralmente é muito delgada, principalmente pela deficiência de luz nas salas de crescimento. A cera epicuticular é um polímero complexo com importantes funções nas células epidérmicas, dentre elas destacam-se a proteção contra a perda de água e por se

tratar de uma camada brilhante e refletora, além de atuar também na proteção contra o excesso de luminosidade (Alquini et al, 2006). A presença de uma camada mais espessa de cera em plantas cultivadas *in vitro* é importante, pois as funções apresentadas acima são fundamentais para a planta durante o processo de aclimatização, onde se observa que a morte das plantas se deve principalmente à perda excessiva de água devido à alta temperatura e luminosidade na casa de vegetação.

Resultados semelhantes foram observados em morangueiro por Braga et al. (2009), onde maior deposição de cera epicuticular foi observada quando se utilizaram fontes de silício no meio de cultura.

Avaliando diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos, é possível observar que a relação DP/ DE fornece um bom indicativo do formato dos estômatos, na medida em que, quanto maior esta relação, mais elipsóide é o formato estomático, e têm-se nesta variável resposta um forte indicativo da funcionalidade dos estômatos. Verificou-se então maior relação DP/DE, quando se utilizou K_2SiO_3 ao meio, o que indica maior funcionalidade desses estômatos. Assim como a deposição de cera na epideme é importante no controle de perda de água, a funcionalidade dos estômatos também é fator determinante no controle da transpiração.

Com os resultados apresentados acima, pode-se julgar que a adição de silício ao meio de cultura é benéfica, principalmente quanto às características anatômicas, onde os fatores que regulam a perda de água na planta são favorecidos quando se utilizam fontes de silício ao meio.

6 CONCLUSÕES

A presença de silicato de potássio ao meio de cultura promove aumento no número de brotos e na massa seca em abacaxizeiro micropropagado.

Adição de silicato de potássio proporciona maior espessura do mesofilo foliar, porém, não é eficiente quanto ao aumento das epidermes.

Maior número de estômatos e relação diâmetro polar e equatorial dos mesmos é obtido quando se adiciona silicato de potássio ao meio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATIA, M.H.; BESFORD, R.T. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. **Annals of Botany**, London, v.58, n.3, p.343-351, Mar. 1986.

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOERGER, M.R.T.; COSTA, C.G; BARROS, C.F. Epiderme In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. p.87-108.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88p.

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

BATAGIN, K.D.; ALMEIDA, C.V.; TANAKA, F.A.O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv. IAC “Gomo de Mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições luminosas. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v.23, n.1, p. 85-92, jan./jun. 2009.

BRAGA, F.T.; NUNES, C.F.; FAVERO, A.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; CASTRO, E.M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.2, p.128-132, fev. 2009.

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

GOMES, F.B.; MORAES, J.C.; SANTOS, C.D. dos; ANTUNES, C.S. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.37, n.2, p.185-190, mar./abr. 2008.

KORNDÖRFER, G.H. Elementos benéficos. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, cap.14, p.355-370.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo: I, comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-252, jan./jun. 1961.

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

SANGSTER, A.G.; HODSON, M.J.; TUBB, H.J. Silicon on deposition in higher plants. In: SILICON IN AGRICULTURE CONFERENCE, 1999, Flórida. **Abstracts...** Florida: University of Florida, 1999.

SILVA, D.P. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de gébera**. 2007. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, 2001. 19p. (Circular Técnica, 24).

WRANG, S.S.; KIN, K.; HESS, W.M. Variation of silica bodies in leaf epidermal long cells within and seventeen species of *Oryza* (Poaceae). **American Journal Botany**, Columbus, v.85, n.4, p.461-466, Apr. 1998.

ZHOU, T.S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v.75, n.6, p.605-607, June 1995.

ANEXOS

TABELA 1 Número de brotos (NB), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS) da parte aérea de abacaxizeiro micropropagado em diferentes fontes de silício.

Tratamentos	NB	MF (g ⁻¹)	MS (g ⁻¹)
MS	4,6b [*]	1,31a	0,06b
Ca ₂ SiO ₃ + MS	4,9b	1,41a	0,055b
K ₂ SiO ₃ + MS	9,7a	2,2a	0,104a

^{*} Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 2 Espessura dos tecidos do limbo foliar⁽¹⁾ de abacaxizeiro micropropagado em diferentes fontes de silício.

Fontes de Silício	EpAb (µm)	PClor (µm)	PAqui (µm)	EpAd (µm)	Mesofilo (µm)
MS	23,55a ^{*(2)}	208,08b	159,01b	22,99a	367,09c
CaSiO ₃ + MS	28,57a	256,38a	169,04b	27,46a	425,42b
K ₂ SiO ₃ +MS	17,64b	229,41a	245,59a	22,99a	475,01a

⁽¹⁾EpAb= epiderme abaxial; PClo= parênquima clorofiliano; PAqui= parênquima aquífero e EpAd= epiderme adaxial. ^{*(2)} Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3 Número de estômatos (NE), diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) e razão diâmetro polar e equatorial (DP/DE) de estômatos de abacaxizeiro micropropagado em diferentes fontes de silício.

Fonte de Silício	NE (mm ²)	DP (µm)	DE (µm)	Razão DP/DE (µm)
MS	110b	25,52ab	22,06a	1,16ab
CaSiO ₃ +MS	119b	23,14b	21,14a	1,09b
K ₂ SiO ₃ +MS	158a	28,76a	23,49a	1,22a

^{*(1)} Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

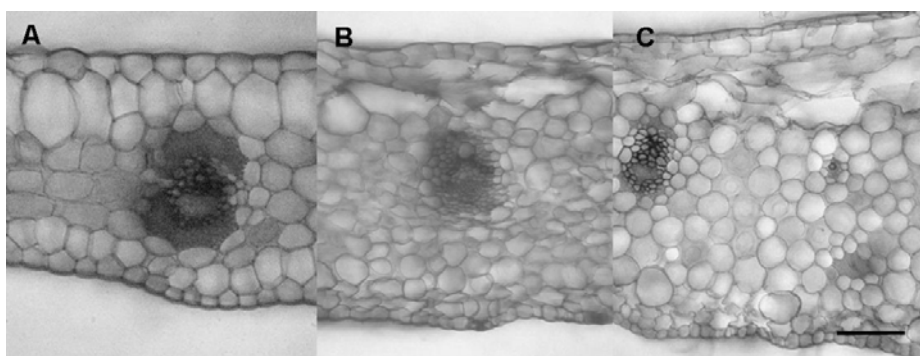


FIGURA 1 Fotomicrografias de secções transversais de folhas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* sob diferentes fontes de silício. MS (A), CaSiO₃ (B), K₂SiO₃ (C). Barra = 40µm.

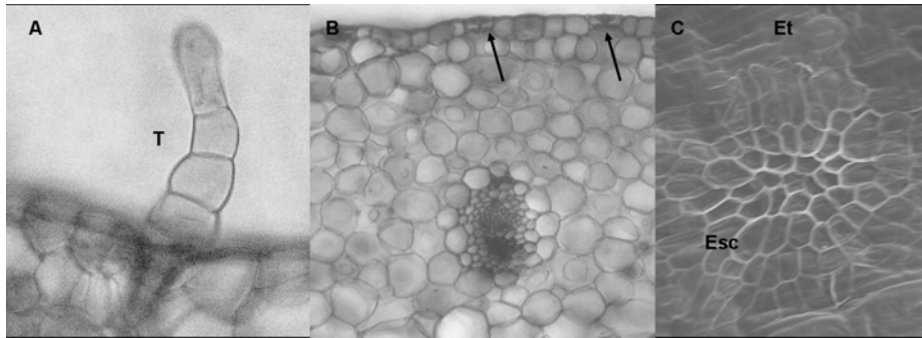


FIGURA 2 Fotomicrografias (A e B) e eletromicrografia (C) de folhas de abacaxizeiro. Tricoma multicelular (A); estômatos na epiderme abaxial (B) e tricomas escamiformes (C). T = tricomas, Esc = tricomas escamiformes e Et = estômatos.

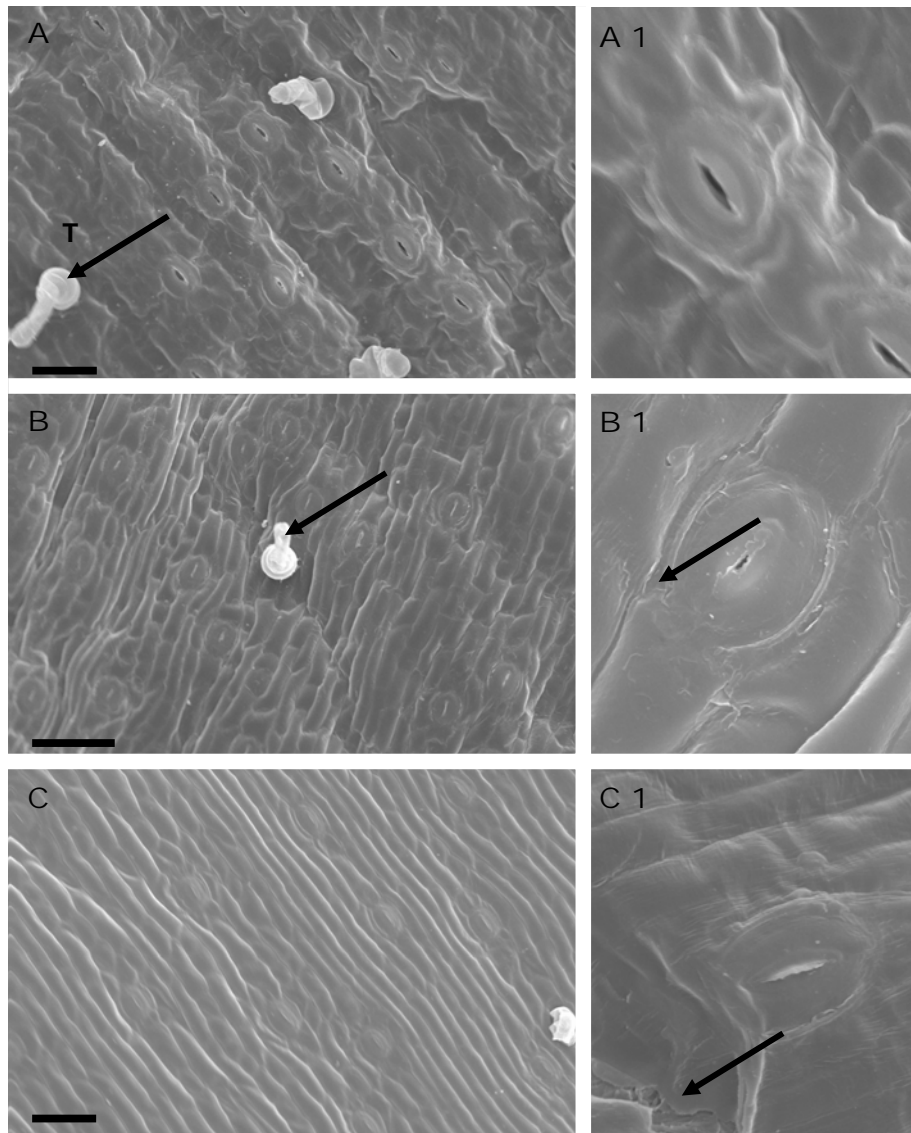


FIGURA 3 Eletromicrografias de folhas de abacaxizeiro submetidas a diferentes fontes de silício no cultivo *in vitro*: MS (A e A1), CaSiO_3 (B e B1) e K_2SiO_3 (C e C1). T = tricomas. Barra= 20 μm .

CAPITULO 5

CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE ABACAXIZEIRO 'GOMO DE MEL' ENRAIZADO *IN VITRO* SOB LUZ NATURAL E SUBSTRATO VERMICULITA

1 RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da vermiculita, ágar, luz artificial e da luz natural no enraizamento *in vitro* de brotos e aclimatização de propágulos de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’, bem como caracterizar anatomicamente essas plantas. Foram utilizados brotos com 2 cm de comprimento cultivados em meio MS acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, testaram-se dois suportes físicos: 6g.L⁻¹ de ágar e 15 g.L⁻¹ de vermiculita para o enraizamento dos brotos em dois ambientes: sala de crescimento a 25±1 °C, 45 W.m⁻².s⁻¹ durante 16 horas e casa de vegetação com radiação de 115,08 W.m⁻².s⁻¹ e 33 °C (luz natural). Após 60 dias, foram avaliados comprimento de parte aérea, massa fresca e seca de parte aérea e raízes. Avaliou-se também espessuras dos tecidos do limbo foliar, além de número de estômatos e diâmetro polar e equatorial dos mesmos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados mostraram-se significativos para interação entre suportes físicos e ambientes para todas as variáveis analisadas. O uso do substrato vermiculita em luz artificial apresentou melhores resultados para todas as variáveis. Para as características anatômicas, maiores espessuras dos tecidos do limbo foliar foram verificados quando se utilizou vermiculita e luz natural, sendo que, para o uso de ágar, também houve aumento das espessuras somente quando utilizou-se o ambiente de luz natural. Quanto ao número de estômatos/mm² não houve diferença significativa para os tratamentos, maior diâmetro polar e equatorial foi observado em estômatos de folhas cultivadas em luz artificial e vermiculita e luz natural e vermiculita respectivamente.

2 ABSTRACT

It was aimed to evaluate the effect of the vermiculite, agar, artificial light and natural light in the in vitro rooting of shoots and acclimatization of pineapple 'Gomo de Mel' propagules, as well as, to characterize these plants anatomically. It was used shoots with 2 cm of length cultivated in MS medium added with 30g.L⁻¹ of sucrose. Two physical supports were tested: 6g.L⁻¹ of agar and 15 g.L⁻¹ of vermiculite for the shoot rooting in two environments: growth room 25±1 °C, 45 W.m⁻².s⁻¹ during 16 hours and greenhouse with 115,08 radiation of W.m⁻².s⁻¹ and 33 °C (natural light). After 60 days, it was evaluated the aerial part length, fresh and dry mass of aerial part and roots. It was also evaluated the thicknesses of foliar limb tissues, the number and polar and equatorial diameter of the stomatas. The experiment was installed in a randomized completely design. The results showed significance in the interaction between physical supports and environment for all analyzed variables. The use of the vermiculite substrate in artificial light presented better results in all variables. For the anatomical characteristics, bigger thicknesses of the foliar limb tissues was verified when it was used vermiculite and natural light, being that, for the agar use, it also increased the thicknesses only when the environment of natural light was used. Deal with the number of stomatas/mm² it did not have significant difference between treatments, greater polar and equatorial diameter was observed in stomatas of leaves cultivated in artificial light and vermiculite and natural light and vermiculite respectively.

3 INTRODUÇÃO

Uma das principais limitações à expansão do uso micropropagação é o elevado custo das mudas. Dentre os fatores que oneram a produção de mudas micropropagadas está o gasto com energia elétrica em salas de crescimento.

Uma alternativa para esse fator seria o cultivo *in vitro* em ambiente de luz natural. Essa tecnologia não é muito adotada por não estarem esclarecidos seus efeitos sobre as culturas que, convencionalmente, são condicionadas em luz artificial, com intensidades luminosas inferiores e com fotoperíodo e temperatura controlada (Erig & Schuch, 2005).

No método convencional de micropropagação, a etapa de enraizamento *in vitro* é realizada em meio nutritivo contendo ágar, porém, o sistema radicular emitido em meio com esse suporte é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e com poucos pêlos radiculares (Hoffmann et al., 2001), o que reduz a capacidade de absorção de água e nutrientes durante o processo de aclimatização. O ágar também é considerado um dos componentes que elevam o custo de produção no cultivo *in vitro* (Apter et al., 1993; Leite (2002).

Diversos trabalhos citam o uso de suportes alternativos para enraizamento de brotos em sistemas intensivos de micropropagação (Martínez-Hernández et al., 2006; Leite et al., 2002; Hoffmann et al., 2001). Esses autores citam vermiculita, perlita ou espumas de poliuretano embebidos com meio líquido como alternativas de baixo custo, além de conferirem melhores resultados que o ágar.

Assim, o presente trabalho objetivou caracterizar a anatomia foliar de brotos enraizados *in vitro* sob luz natural e vermiculita e aclimatização de propágulos de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado de abacaxi já se encontrava estabelecido *in vitro*, o mesmo foi subcultivado em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido, suplementado com adição de 30g L⁻¹ de sacarose para posterior utilização no experimento.

Para o enraizamento *in vitro* dos brotos, foram utilizados como suportes físicos: 1) ágar 6 g.L⁻¹ e 2) vermiculita 15 g.L⁻¹, adicionados ao meio de cultura MS líquido para o tratamento vermiculita e sólido para o ágar, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos. .

Os frascos com capacidade para 200 mL⁻¹ foram fechados com tampas de polipropileno e vedados com parafilme. As culturas foram mantidas em duas condições ambientais: 1) sala de crescimento (luz artificial) a 25±2°C, irradiância de 45 W.m⁻² fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W e fotoperíodo de 16 horas e 2) casa de vegetação (luz natural), a radiação e temperatura dentro da casa de vegetação foi avaliada utilizando sensor de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 12 horas (das 06:00 às 18:00 horas). Os dados da caracterização do comportamento diurno da radiação solar e da temperatura estão apresentados abaixo (Figura 1 A e B).

Decorridos 60 dias da instalação do experimento foi avaliado o comprimento da parte aérea, massa fresca e seca da parte aérea e raízes.

Brotos enraizados nos tratamentos anteriores passaram por lavagem de suas raízes em água corrente para completa retirada do ágar e vermiculita, os mesmos foram transferidos para bandejas de polietileno com 24 células, contendo o substrato comercial Plantmax[®] e mantidas em casa de vegetação, com nebulização intermitente durante 30 dias de aclimatização, avaliando-se: taxa de sobrevivência, comprimento da parte aérea, massa fresca e seca da parte aérea e raízes.

As características anatômicas das folhas cultivadas *in vitro*, das folhas decorrentes do processo de aclimatização e folhas de transição, foram realizadas seguindo o protocolo de Kraus e Arduin (1997), onde se avaliou: espessura das epidermes adaxial e abaxial, parênquimas aquífero e clorofiliano. As variáveis

paradérmicas, número de estômatos/mm² e diâmetro polar e equatorial, foram realizadas segundo técnica de Laboriau et al., (1961).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, com quatro tratamentos e dez repetições, cada uma composta por um frasco contendo cinco brotos. Para o processo de aclimatização foram utilizadas 4 repetições por tratamento com 4 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram efeito significativo dos tratamentos para todas as variáveis analisadas e para a interação dos suportes físicos e condições ambientais. O uso de vermiculita em luz artificial (sala de crescimento convencional) apresentou melhores resultados para todas as variáveis (Tabela 1). Mesmo o ambiente de luz artificial proporcionando esses resultados, plantas oriundas do enraizamento em luz natural (casa de vegetação) apresentaram maior vigor e folhas mais carnosas, o que sugere uma adaptação ao ambiente de maior irradiância. Brotos enraizados em condições de luz artificial sofreram processo de estiolamento, devido à baixa irradiância da sala de crescimento, o que favoreceu maior comprimento e massa fresca da parte aérea.

Plantas enraizadas em meio contendo vermiculita apresentaram raízes mais rústicas, com mais ramificações e presença de pêlos absorventes, o que pode contribuir para o processo de aclimatização, por possibilitar maior área de contato das raízes com o substrato, facilitando a absorção de água e nutrientes.

O uso de suportes físicos alternativos ao ágar é relatado em vários trabalhos. Hoffmann et al. (2001) avaliaram três substratos: ágar, Plantmax[®] + ágar e vermiculita + ágar, em dois porta-enxertos de macieira. Os autores

observaram que, tanto para indução de enraizamento, quanto para o desenvolvimento das raízes adventícias, o uso apenas de ágar apresentou maiores taxas de enraizamento, resultados contrários aos obtidos neste trabalho.

Resultados similares foram obtidos no cultivo *in vitro* de duas cultivares de *Citrus* tolerantes ao vírus da tristeza por Martínez-Hernández et al. (2006). Os autores observaram que, para germinação, multiplicação e enraizamento *in vitro*, o uso de substratos alternativos (vermiculita, tezontle e agrolita) não apresentaram diferenças significativas, o que permitiu comprovar que a substituição ao ágar é viável, podendo utilizar substratos inertes nas etapas da micropropagação. Da mesma forma, Faria et al. (2006) avaliaram o uso de ágar, espuma picada, esfagno e areia grossa na propagação *in vitro* de orquídea (*Oncidium baueri*) e observaram que espuma picada apresentou melhores resultados para todas as variáveis estudadas.

Quanto ao ambiente de luz, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram observados por Silva et al. (2008) que avaliaram o uso da luz natural no enraizamento *in vitro* e aclimatização do abacaxi cv. Imperial e observaram que a luz artificial promoveu maior comprimento de raízes em relação à luz natural. Os resultados apresentados podem estar relacionados com a função das auxinas no enraizamento, este grupo de fitohormônios é fotodegradado e o aumento da radiação no ambiente de casa de vegetação pode reduzir sua concentração endógena e promover menor crescimento e desenvolvimento dessas raízes.

Os cortes transversais das folhas oriundas do enraizamento *in vitro* utilizando vermiculita e ágar como suporte e luz natural e artificial como fonte de irradiação apresentaram somente uma camada de epiderme em ambas faces abaxial e adaxial, sendo, portanto, unisseriadas. A presença de estômatos foi verificada apenas na face abaxial da epiderme (hipoestomáticas), presença de dois tipos de tricomas: glandulares e tectores, parênquima aquífero espesso e

bem desenvolvido, parênquima clorofiliano com células arredondadas, apontando a presença de amido em seu interior e fibras ao longo desse tecido (Figura 2).

O uso da luz natural como ambiente de incubação promoveu maior deposição de cera epicuticular nas epidermes das folhas (Figura 2 D). Sabe-se que as principais funções da cutícula são a proteção contra a perda de água e proteção contra o excesso de luminosidade por se tratar de uma camada brilhante e refletora. A permeabilidade da água através da cutícula é influenciada principalmente pela estrutura e quantidade de ceras epicuticulares. Pouca deposição de cera epicuticular sobre a superfície das folhas das plantas cultivadas *in vitro* também tem sido considerada como um fator responsável pela perda excessiva de água, levando ao insucesso no processo de aclimatização (Hazarika, 2006).

Observaram-se diferenças significativas para todas as variáveis analisadas, exceto para espessura da epiderme abaxial (Tabela 2). Maiores espessuras dos tecidos do mesófilo foliar foram verificadas quando se utilizou vermiculita e luz natural, sendo que, para o uso de ágar, houve também aumento das espessuras somente no ambiente de luz natural, demonstrando a adaptação dos tecidos às condições de alta irradiância.

O aumento na espessura dos tecidos que compõem o limbo constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz e evidenciam a plasticidade adaptativa da planta (Lee et al., 2000). A capacidade de alterar a estrutura da folha em resposta ao ambiente, principalmente ao nível de irradiância, tem sido comumente observada em diversas espécies (kiwi, banana e abacaxi), cultivadas *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997; Rocha, 2007; Silva et al., 2008).

Quanto às características paradérmicas, houve interação significativa entre os fatores para número de estômatos, diâmetro polar e razão diâmetro polar

e equatorial. Apenas para variável diâmetro equatorial não houve interação significativa, porém analisando isolamente os fatores observaram diferenças significativas entre eles (Tabela 3).

Para número de estômatos/mm², luz natural como ambiente de cultivo e ágar como suporte apresentaram a maior média. Maior diâmetro polar foi observado em estômatos provenientes de ambiente de luz artificial de vermiculita, já em relação ao diâmetro equatorial maior média desse diâmetro foi obtido em ambiente de luz natural e suporte vermiculita. Quanto à variável razão diâmetro polar/equatorial, maior razão foi verificada em luz artificial e ágar.

Alguns autores descrevem que, apesar da variabilidade estomática ser um fenômeno relacionado principalmente à umidade relativa dentro dos frascos, a intensidade luminosa pode ter implicações nesse processo (Dignart et al., 2009). Assim, de acordo com os resultados apresentados, pode-se notar que as maiores densidades estomáticas estão geralmente associadas à alta irradiância.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com Braga et al., (2009) e Dignart et al., (2009) que, trabalhando respectivamente com crisântemo e orquídea, verificaram maior número de estômatos em folhas cultivadas *in vitro* em condições de casa de vegetação.

Por outro lado, resultados contrários foram observados para diâmetro polar e equatorial neste trabalho, no qual maiores diâmetros foram detectados em estômatos cujas folhas provinham de ambiente de luz artificial. Braga et al., (2009) e Dignart et al., (2009) observaram maiores diâmetros trabalhando com ambiente de luz natural.

Na etapa de aclimatização, registrou-se 100% de sobrevivência para todos os tratamentos. Para todas as variáveis analisadas, plantas oriundas dos tratamentos *in vitro* com ágar e luz artificial registraram os melhores resultados (Tabela 3).

Observou-se que plantas aclimatizadas após 30 dias apresentaram tecidos mais desenvolvidos e organizados. Folhas provenientes do ambiente de sala de crescimento e ágar apresentam células do parênquima aquífero maiores e alongadas em relação aos demais tratamentos, verificou-se também a presença de camada delgada de cera para esse tratamento (Figura 3A). Para os tratamentos onde se utilizou como suporte físico a vermiculita e luz natural, verificou-se maior deposição de cera epicuticular (Figura 3C seta). Maior espessura da epiderme adaxial de folhas aclimatizadas foi observada no tratamento *in vitro* com ágar e luz natural, já a epiderme adaxial, o tratamento vermiculita e luz artificial, apresentou maior espessura. Parênquima clorofilano foi mais espesso em folhas aclimatizadas do tratamento ágar e luz artificial, já o aquífero a luz natural também com ágar apresentou maior espessura. (Tabela 4).

Folhas novas produzidas durante o período de aclimatização são denominadas folhas de transição. Essas folhas podem conferir maior capacidade fotossintética, conseqüentemente aquisição de fotoautotrofia e de regulação hídrica às plantas, devido à maior organização dos tecidos, maior deposição de cera, além de não apresentarem nenhum tecido proveniente do cultivo *in vitro*, estando, portanto, adaptados às condições de alta irradiância e temperatura (Figura 3 A1, B1, C1 e D1). Para espessura da epiderme adaxial, abaxial e parênquima aquífero, o uso de luz natural e ágar como tratamento *in vitro* proporcionou a maior espessura, para parênquima clorofilano, luz natural e vermiculita promoveram maior espessura (Tabela 5).

6 CONCLUSÕES

A vermiculita, como suporte físico alternativo ao ágar e ambiente de luz artificial (sala de crescimento), promove maior crescimento *in vitro* de brotos de abacaxizeiro.

Luz natural (casa de vegetação) proporciona maiores espessuras dos tecidos do limbo foliar.

Maior número de estômatos foi obtido em folhas desenvolvidas em ambiente de luz artificial e suporte vermiculita.

Luz artificial promove maior razão diâmetro polar/equatorial dos estômatos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APTER, R.C.; MCWILLIAMS, E.L.; DAVIES JÚNIOR, F.T. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*): I, comparative morphology. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n. 6, p. 902-905, Nov. 1993.

BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de; DIGNART, S.L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J.M.P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. rage: características morfofisiológicas. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, mar./abr. 2009.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. 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 Cultured**, Dordrecht, v.47, n.2, p.127-134, May 1997.

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

FARIA, R.T.; DALIO, R.J.D.; UNEMOTO, L.K.; SILVA, G.L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Revista Acta Scientific Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, jan./jun. 2006.

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, n.1, p.105-120, June 2006.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; VIEIRA, S.S.N. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.11, p.1371-1379, nov. 2001.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo: I, comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-252, jan./jun. 1961.

LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. 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, v.87, n.4, p.447-455, Apr. 2000.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.L.; FORTES, G.R.L. Use of vermiculite as a substrate and effect of light on *in vitro* rooting of pears, cv. Bartlett and clone oh x f97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.977-982, set./out. 2002.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, M.J., LÓPEZ, A.A.; OSORIO-ACOSTA, F.; LÓPEZ, F.G.; MOCTEZUMA, H.L.; ROSAS, M.M. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al ágar. **Interciência**, Caracas, v.31, n.8, p.616-619, jul. 2006.

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

ROCHA, H.S.; SILVA, C.R.R.; ARAÚJO, A.G.; SILVA, A.B. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata anã (AAB)': intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell culture and Micropropagation**, Lavras, v.3, n.1, p. 10-17, 2007.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A. de.; BRAGA, F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr). **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p.839-843, nov. 2008.

ANEXOS

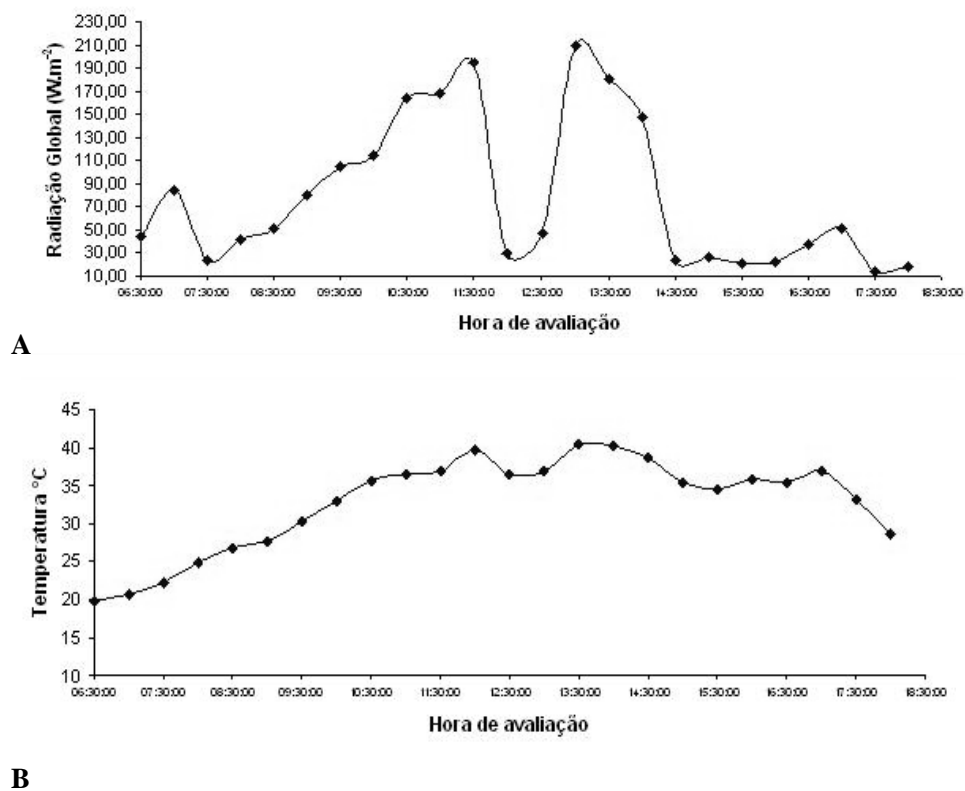


FIGURA 1 Comportamento diurno radiação solar (A) e da temperatura (B) na casa de vegetação (luz natural).

TABELA 1 Massa fresca de parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa seca de parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e comprimento de parte aérea (CPA), de abacaxizeiro enraizado *in vitro* sob condições de luz natural e suporte alternativo.

	MFA (g ⁻¹)		MFR (g ⁻¹)	
	Vermiculita	Ágar	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	3,63 aA	2,01 bA	0,55 aA	0,18 bB
Luz Natural	1,49 aB	2,16 aA	0,09 bB	0,37 aA
	MSA (g ⁻¹)		MSR (g ⁻¹)	
	Vermiculita	Ágar	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	0,21 aA	0,14 bA	0,044 aA	0,015bB
Luz Natural	0,12 bB	0,19 aA	0,007 bB	0,025 aA
CPA (cm)				
	Vermiculita	Ágar		
Luz Artificial	14,9 aA	10,34 bA		
Luz Natural	5,05 bA	8,49 aB		

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 2 Espessura dos tecidos do limbo foliar⁽¹⁾ de abacaxizeiro enraizados *in vitro* sob condições de luz natural e suporte alternativo.

Epiderme Abaxial (µm)	
Luz Artificial	20,21 a
Luz Natural	19,20 a
Vermiculita	21,10 a
Ágar	18,88 a
Parênquima Clorofiliano (µm)	

	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	177,15 aB	162,68 bA
Luz Natural	358,87 aA	167,06 bA
Parênquima Aquifero (μm)		
	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	186,01 aB	137,65 bA
Luz Natural	257,99 aA	128,30 bA
Epiderme Abaxial (μm)		
	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	20,83 aB	18,78 aA
Luz Natural	27,41 aA	19,27 bA

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3 Número de estômatos (NE), diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) e razão diâmetro polar e equatorial (DP/DE) de estômatos de abacaxizeiro enraizados *in vitro* sob condições de luz natural e suporte alternativo.

	NE (mm^2)			
	Vermiculita		Ágar	
Luz Artificial	43,50 aA		36,95 aA	
Luz Natural	36,95 aA		45,51 aA	
	Razão DP/DE (μm)		Diâmetro Polar (μm)	
	Vermiculita	Ágar	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	1,003 aA	1,062 aA	36,41 aA	32,02 bB
Luz Natural	0,792 bB	1,007 aA	30,79 bB	35,58 aA
Diâmetro Equatorial (μm)				

Luz Artificial	33,47 b
Luz Natural	37,30 a
Vermiculita	37,84 a
Ágar	33,14 b

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 Massa fresca de parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa seca de parte aérea (MSA), massa seca de raízes (MSR) e comprimento de parte aérea (CPA), de abacaxizeiro aclimatizado.

	MFA (g⁻¹)	MFR (g⁻¹)	MSA (g⁻¹)	MSR (g⁻¹)	CPA (cm)
Luz Artificial	4,48b	1,01a	0,46a	0,086a	11,64b
Luz Natural	6,35a	0,45b	0,33b	0,044b	13,23a
Vermiculita	3,63b	0,57b	0,27b	0,05a	10,91b
Ágar	7,19a	0,88a	0,52a	0,07a	13,97a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

TABELA 5 Espessura dos tecidos do limbo foliar⁽¹⁾ de abacaxizeiro aclimatizados.

	EpAba (µm)	PClor (µm)	EpAda (µm)
Luz Artificial	4,55 a	132,90 a	7,84 a
Luz Natural	4,43 a	86,52 a	6,59 a
Vermiculita	4,29 a	99,19 b	7,22 a
Ágar	4,69 a	120,23 a	7,21 a
PAqui (µm)			

	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	81,46 aA	62,01 bB
Luz Natural	65,87 bB	89,31 aA

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EpAba=epiderme abaxial, PClor=parênquima clorofiliano, EpAda=epiderme adaxial, PAqui=parênquima aquífero.

TABELA 6 Número de estômatos (NE), diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) e razão diâmetro polar e equatorial (DP/DE) de estômatos aclimatizados.

NE (mm²)				
	Vermiculita		Ágar	
Luz Artificial	37,61 aA		41,79 aA	
Luz Natural	43,58 aA		38,20 aA	
Diâmetro Polar (µm) Diâmetro Equatorial (µm)				
	Vermiculita	Ágar	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	35,33 bA	39,91 aA	29,92 aB	31,66 aA
Luz Natural	37,55 aA	35,53 aB	32,59 aA	31,03 aA
Razão DP/DE (µm)				
Luz Artificial	1,22 a			
Luz Natural	1,15 a			
Vermiculita	1,17 a			
Ágar	1,20 a			

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 7 Espessura dos tecidos do limbo foliar⁽¹⁾ de folhas de transição de abacaxizeiro aclimatizados.

	EpAba (μm)	EpAda (μm)
Luz Artificial	6,14 a	8,17 b
Luz Natural	7,11 a	9,35 a
Vermiculita	6,25 a	7,96 b
Ágar	7,00 a	9,56 a
PClor (μm)		
	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	100,00 bB	114,99 aA
Luz Natural	153,37 aA	120,74 bA
PAqui (μm)		
	Vermiculita	Ágar
Luz Artificial	60,40 aA	52,98 aB
Luz Natural	60,38 bA	96,44 aA

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EpAba=epiderme abaxial, PClor=parênquima clorofiliano, EpAda=epiderme adaxial, PAqui=parênquima aquífero.

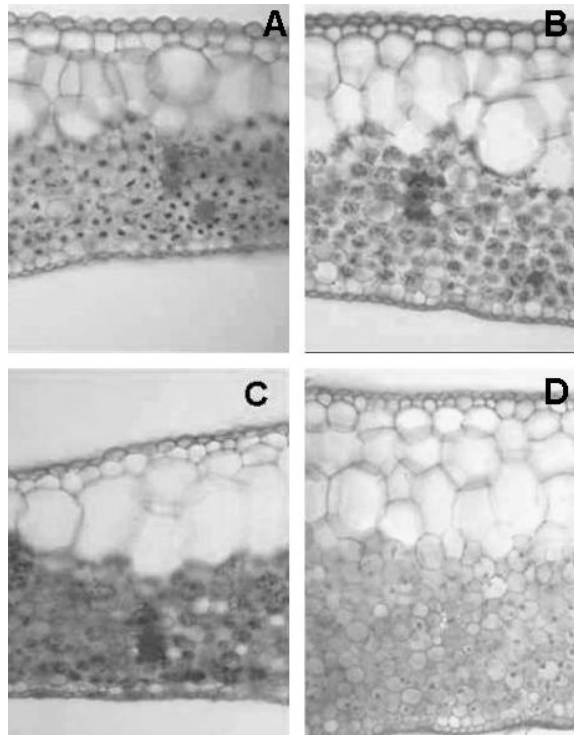


FIGURA 2 Fotomicrografias de secções transversais de folhas de abacaxizeiro enraizadas *in vitro* com diferentes substratos e luz natural. (A) ágar e luz artificial, (B) ágar e luz natural, (C) vermiculita e luz artificial e (D) vermiculita e luz natural.

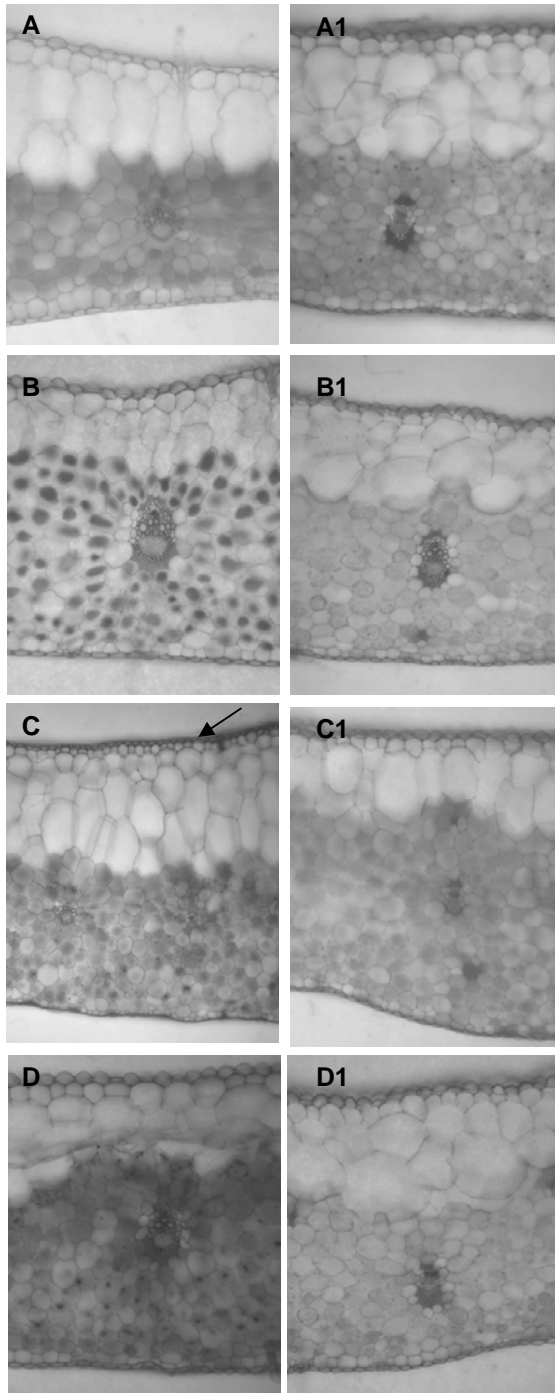


FIGURA 3 Fotomicrografias de secções transversais de folhas de abacaxizeiro aclimatizadas. (A) ágar e luz natural, (A1) ágar e luz natural – folha de transição, (B) ágar e luz artificial, (B1) ágar e luz artificial – folha de transição, (C) vermiculita e luz natural, (C1) vermiculita e luz natural – folha de transição, (D) vermiculita e luz artificial e (D1) vermiculita e luz artificial – folha de transição.

CAPITULO 6

CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE ABACAXIZEIRO 'GOMO DE MEL', ACLIMATIZADOS EM DIFERENTES SUBSTRATOS

1 RESUMO

Objetivou-se determinar um substrato adequado para aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ e a sua caracterização anatômica e biométrica durante este processo. O enraizamento dos brotos foi realizado em meio MS acrescido de 30g.L^{-1} de sacarose e 6g.L^{-1} de ágar. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante 16 horas. Após 60 dias, brotos enraizados foram removidos dos frascos e distribuídos em tubetes contendo os seguintes tratamentos: 1) A+X+H (areia, xaxim e húmus) (1:1:1); 2) substrato comercial Plantmax[®]; 3) vermiculita e 4) combinação 1:1 de Plantamax[®] + Vermiculita. As características anatômicas foram avaliadas nas plântulas ainda *in vitro* e aos 7; 15; 30 e 60 dias de aclimatização. As folhas de transição também foram caracterizadas. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições com cinco plantas. Maiores comprimentos da parte aérea, massa fresca e seca da parte aérea e raízes foram observados com o uso de areia + xaxim + húmus. Para número de folhas, massa fresca de raízes e massa seca de parte aérea não houve diferença entre os substratos. Quanto às características anatômicas, o substrato vermiculita no período de 60 dias de aclimatização promoveu as maiores espessuras dos tecidos que compõem o limbo foliar.

2 ABSTRACT

This work aimed to determine a right substrate for acclimatization of pineapple ‘Gomo de mel’ plantlets and its anatomical and biometric characterization during this process. Rooting of the shoots was done in MS medium added with 30g.L^{-1} of sucrose and 6g.L^{-1} of agar. Cultures were

maintained in growth room $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ during 16 hours. After 60 days, the rooted shoots were removed from the bottles and distributed in tubes containing the following treatments: 1) A+X+H (sand, fern tree fiber and humus) (1: 1: 1); 2) commercial substrate Plantmax®; 3) vermiculite and 4) 1:1 combination of Plantmax ® + Vermiculite. The anatomical characteristics were evaluated when the seedlings were still *in vitro* and in the 7th; 15th; 30th and 60th days of acclimatization. The transition leaves were also characterized. The experiment was installed in a randomized completely design, with four treatments and four replications containing five plants. Greater lengths of the aerial part, fresh and dry mass of the aerial part and roots were observed with the use of sand + fern tree fiber + humus. Leaf number, fresh mass of roots and dry mass of aerial part did not show differences between substrates. Deal with the anatomical characteristics, the vermiculite substrate in the 60 days period of acclimatization promoted the biggest thicknesses of the limb tissues.

3 INTRODUÇÃO

O processo de aclimatização envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para casa de vegetação. Esta passagem é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação (Torres et al., 2001). Plantas que se desenvolveram heterotroficamente *in vitro* sob condições de alta umidade passam a condições autotróficas de moderada ou baixa umidade durante a aclimatização.

Devido à grande diferença entre os dois ambientes é necessário que plantas micropropagadas passem por esse período de aclimatização antes da transferência para condições de campo (Moreira et al., 2007).

Alguns fatores do processo de aclimatização estão diretamente relacionados, dentre os mais importantes estão a manutenção da umidade

relativa alta dentro da casa de vegetação, as condições de sombreamento, o uso de recipientes e adequado substrato.

O substrato de transplântio deve ter boa capacidade de retenção de umidade e não compactar excessivamente, comprometendo a drenagem e a aeração radicular. Quimicamente ele deve ser de preferência inerte, para permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes de acordo com a necessidade da espécie (Souza Júnior et al., 2001).

O estresse hídrico das plantas é geralmente o maior problema durante o processo de aclimatização. Uma planta, embora aparentemente perfeita *in vitro*, apresenta deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, induzindo uma rápida perda de água (Barboza et al., 2006).

Os estômatos nesses casos não são funcionais e respondem muito lentamente ao estresse hídrico, a cera epicuticular é delgada ou inexistente, a conexão vascular entre caule e raízes adventícias é precária para atender a demanda evapotranspiratória (Torres et al., 2001). Portanto, torna-se importante caracterizar anatomicamente uma planta tanto em condições *in vitro* como durante o processo de aclimatização, bem como escolher adequadamente o substrato, para que possa atender essa demanda hídrica da planta transplantada.

O objetivo deste trabalho foi determinar um substrato adequado para aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ por meio da caracterização anatômica e biométrica das mesmas durante este processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado de abacaxi encontrava-se já estabelecido *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) líquido, suplementado com adição de 30g L⁻¹ de sacarose e 2 mg.L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina).

Foram selecionados brotos com aproximadamente 2cm de altura e cultivados em meio MS, acrescido de 6,0 g.L⁻¹ de ágar para enraizamento. Estes foram mantidos por 60 dias em sala de crescimento a 25±1 °C e 36µmol.m⁻².s⁻¹ durante 16 horas.

Os brotos enraizados foram removidos dos frascos, suas raízes lavadas em água corrente para retirada do meio de cultura e distribuídos em tubetes (5cm de diâmetro x 24,5cm de altura) contendo os seguintes substratos: 1) A+X+H (areia , xaxim e húmus) (1:1:1); 2) substrato comercial Plantmax[®] ; 3) vermiculita e 4) combinação 1:1 de Plantamax[®] + Vermiculita.

Os tubetes contendo as plantas foram levados para casa de vegetação com nebulização intermitente e protegido com sombrite 50%. As avaliações fitotécnicas foram realizadas após 60 dias, avaliando-se: taxa de sobrevivência, número de folhas, comprimento de parte aérea, massa fresca e seca da parte aérea e das raízes.

A caracterização anatômica foi realizada através das espessuras das epidermes adaxial e abaxial, parênquima aquífero e clorofiliano. Estas avaliações foram realizadas nas plantas ainda *in vitro* e aos 7; 15; 30 e 60 dias após a aclimatização. As folhas de transição também foram caracterizadas. Para isso, utilizou-se a metodologia descrita por Kraus e Arduin (1997).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições com cinco plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância onde as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sisvar 5.0 (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de sobrevivência das plantas para os tratamentos Plantmax, Vermiculita e Plantmax + Vermiculita foi de 100%, porém, para o tratamento

A+X+H, apenas 60% das plantas sobreviveram, as plantas desse tratamento morreram devido à contaminação supostamente presente neste substrato causando nas folhas como podridão e amarelecimento, levando as mesmas a murchar e conseqüente morte.

No entanto, maior número de folhas foi observado em plantas aclimatizadas no tratamento A+X+H com 20 folhas, não diferindo dos demais tratamentos. O mesmo foi observado para massa fresca das raízes e massa seca da parte aérea, onde melhores resultados foram obtidos com o substrato A+X+H também não diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 1).

Para comprimento e massa fresca da parte aérea, o substrato A+X+H apresentou melhores resultados com 9,55cm e 4,31g⁻¹ respectivamente, diferindo dos demais substratos. Já para massa seca de raízes, o substrato Plantmax + Vermiculica foi superior em relação aos demais com 0,124g⁻¹.

Mudas de abacaxizeiro micropropagadas tem um período de seis a oito meses de aclimatização, a escolha correta do substrato e uma adequada adubação durante esse processo pode favorecer o crescimento e desenvolvimento das mudas, podendo antecipar o transplântio para o campo (Teixeira et al., 2001). Algumas variáveis analisadas permitem em muitos casos definir o momento certo para realizar essa transferência da casa de vegetação para o campo, dentre elas, a altura da muda, o número de folhas e raízes são importantes parâmetros para designar essa mudança.

Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, Souza Júnior et al., (2001) verificaram que o uso de A+X+H e Plantmax foram substratos eficientes na aclimatização de plantas de abacaxi cv. Pérola micropropagadas.

Quanto às características anatômicas, folhas de abacaxizeiro na fase *in vitro* apresentam epidermes unisseriadas, estômatos apenas na superfície abaxial das folhas (hipoestomática), parênquimas aquífero e clorofiliano pouco

desenvolvidos e desorganizados, tricomas glandulares e tectores e fibras ao longo do parênquima clorofiliano (Figura 1).

Folhas de abacaxizeiro ainda *in vitro* apresentaram um parênquima aquíífero constituído por células pequenas e achatadas. As células do parênquima clorofilado apresentam formato arredondado. Observou-se também que a cutícula é pouco desenvolvida nas faces adaxial e abaxial da epiderme (Figura 3). A presença de tricomas nas folhas de abacaxizeiro tanto na fase *in vitro* quanto durante o processo de aclimatização é uma característica que também foi observada por Barboza et al., (2006) e Silva et al., (2008). Tais estruturas podem representar uma adaptação morfológica que atua de modo a restringir a perda de água pelas folhas, por meio da regulação da temperatura, pela reflexão da luz que chega às folhas, e pode, ainda, secretar substâncias que protegem as folhas contra parasitas e predadores (Larcher, 2000).

Observou-se que, no sétimo dia de aclimatização, o parênquima aquíífero de folhas oriundas dos tratamentos com substrato Plantmax, Plantmax+Vermiculita e A+X+H, apresentam-se pouco desenvolvidos e com células pequenas e achatadas, assim como nas folhas *in vitro*. Verificou-se também que, para todos os tratamentos, houve pouca diferenciação dos tecidos até o décimo quinto dia, demonstrando que maior diferenciação ocorrerá somente a partir do trigésimo dia de aclimatização. Observou também maior deposição de cera na epiderme das folhas a partir desse período. Essas folhas podem ser denominadas primordiais *in vitro*, por assumirem características intermediárias entre folhas crescidas durante o processo *in vitro* e o processo de aclimatização (Soares, 2005).

Por outro lado, folhas de transição são folhas novas produzidas durante o período de aclimatização. Segundo Dignart et al., (2009), essas folhas podem conferir maior capacidade fotossintética, conseqüentemente aquisição de fotoautotrofia e de regulação hídrica às plantas. Foram observadas diferenças

marcantes com relação a essas folhas, onde os tecidos do mesófilo apresentaram uniformes para todos os tratamentos com maior espessura do parênquima clorofiliano em relação ao aquífero, confirmando maior capacidade fotossintética, vasos de xilema e floema mais desenvolvidos e também maior deposição de cera epicuticular, conferindo assim maior proteção e controle na perda de água.

Quanto às espessuras dos tecidos que compõem o limbo foliar, foram observadas diferenças estatísticas para as fontes de variação substrato, tempo de aclimatização e para interação substrato e tempo de aclimatização (Tabela 2).

Plantas com 60 dias de aclimatização em substrato vermiculita mostraram as maiores espessuras para todos os tecidos do limbo foliar. Os resultados apresentados quanto ao tempo de aclimatização eram esperados, uma vez que houve aumento crescente das espessuras dos tecidos no decorrer do período de aclimatização.

Mesmo com o substrato areia+xaxim+húmus apresentando as maiores médias para as análises de crescimento, neste trabalho recomendamos como substrato para aclimatização de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’ a vermiculita. Pela taxa de mortalidade apresentada no substrato areia+xaxim+humos, por folhas desenvolvidas em substrato vermiculita apresentarem as maiores espessuras de seus tecidos e por esse substrato ser uma alternativa de baixo custo em relação aos demais substratos utilizados.

6 CONCLUSÕES

O uso do substrato areia combinada a xaxim e húmus promove maior número de folhas, comprimento, massa fresca e seca de parte aérea.

Maior espessura dos tecidos do limbo foliar, quando se utiliza o substrato vermiculita.

Recomenda-se para o cultivar 'Gomo de Mel' o uso do substrato vermiculita para aclimatização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

FERREIRA, D.F. **Sisvar 5.0**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima. 2000. 531p.

MOREIRA, M.A.; CARVALHO, J.G.; FRAGUAS, C.B.; PASQUAL, M. Respostas à adubação NPK de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola em fase de aclimatização. **Plant Cell Culture and Micropropagation**. Lavras, v.3, n.1, p.17-22, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantrarum**, Copenhagem, v.15, n.3, p.473-497, July 1962.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de.; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A. de.; BRAGA; F.T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananás comosus* L. Merr). **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p.839-843, nov. 2008.

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 121p.Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

SOUZA JÚNIOR, E.E.; BARBOZA, S.B.S.C.; SOUZA, L.A.C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147-151, jul./dez. 2001.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.1, n.3, p.42-47, nov./dez. 2001.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, 2001. 19p. (Circular Técnica, 24).

ANEXOS

TABELA 1 Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), massa fresca de parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa seca de parte aérea (MSA) e massa seca de raízes (MSR), de abacaxizeiros aclimatizados com diferentes substratos.

Substrato	NF	CPA	MFA	MFR	MSA	MSR
		(cm)	(g⁻¹)	(g⁻¹)	(g⁻¹)	(g⁻¹)
A+X+H	19,8a*	9,55a	4,31a	1,18a	0,33a	0,088a
Plantmax [®]	17,1a	6,92b	3,27b	1,29a	0,26a	0,089a
Vermiculita	17,6a	6,10b	2,85b	0,82a	0,22a	0,055b
Plantmax [®] + Vermiculita	18,8a	6,75b	3,12b	1,54a	0,26a	0,124a

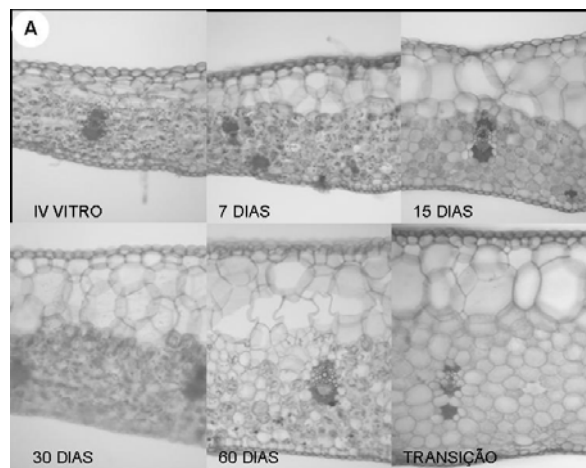
*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

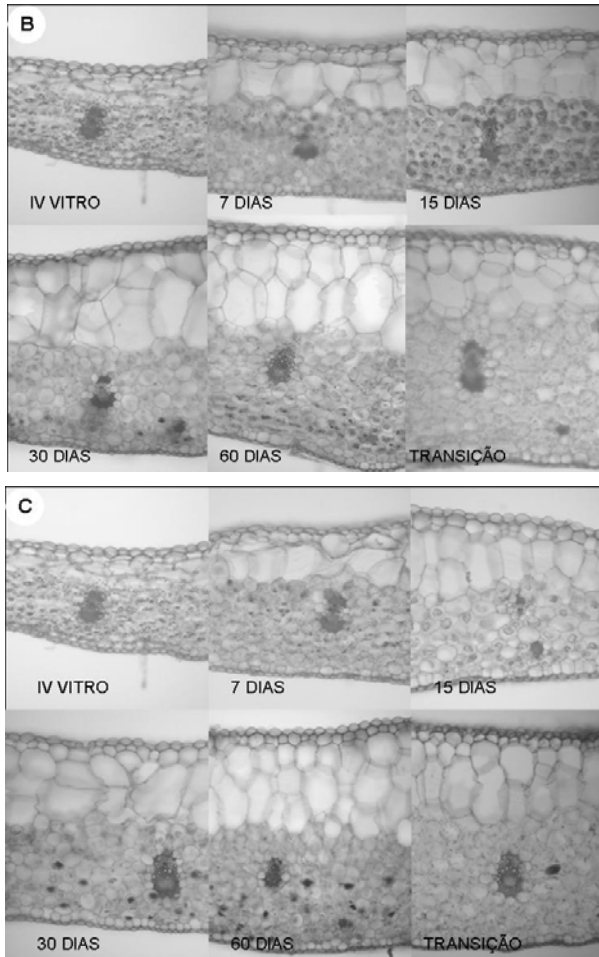
TABELA 2 Epiderme abaxial e adaxial, parênquima clorofiliano e aquífero de folhas de abacaxizeiro desenvolvidas em diferentes substratos e tempo de aclimatização.

Substrato	Tempo de aclimatização (dias)					
	EPIDERME ABAXIAL (µm)					
	0	7	15	30	60	Transição
A+X+H	25,21aB	18,74ab	22,76aB	18,81aB	28,37bA	24,37aB
Plan + Verm	25,21aB	16,61aC	24,15aB	19,84aC	38,28bA	24,35bA
Plantmax	25,21aA	16,90aB	24,94aA	15,46aB	19,37cA	16,88bB
Vermiculita	25,21aB	17,84aC	15,76bC	19,86cA	39,96aA	19,63bB
	EPIDERME ADAXIAL (µm)					
A+X+H	16,16aB	22,36aAB	20,25abB	16,93aB	28,30bA	21,80aAB
Plan + Verm	16,16aC	17,89abC	21,36aBC	19,62aBC	33,63bA	25,27aB

Plantmax	16,16aB	16,14abB	14,87bB	15,76aB	14,75cB	23,27aA
Vermiculita	16,16aBC	14,63bC	17,11abBC	18,51aBC	48,03aA	22,17aB
PARÊNQUIMA CLOROFILIANO (µm)						
A+X+H	146,78aC	144,60bC	158,34bC	152,77bC	308,36bA	258,13bB
Plan + Verm	146,78aD	174,75aC	185,19aC	190,09aC	322,90bA	258,63bB
Plantmax	146,78aD	136,20bD	155,30bD	184,30aC	220,76cB	297,99aA
Vermiculita	146,78aD	167,76aD	151,85bD	190,47aC	432,36aA	291,48aB
PARÊNQUIMA AQUÍFERO (µm)						
A+X+H	103,92aD	112,46bD	186,55aB	150,62bC	314,32bA	159,95aC
Plan + Verm	103,92aD	132,79aD	188,55aB	185,67bB	317,68bA	171,27aBC
Plantmax	103,92aCD	74,01bD	142,37cBC	186,75aA	134,56aA	168,90aAB
Vermiculita	103,92aC	134,32aV	146,26bBC	210,66aB	383,84aA	136,37aC

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.





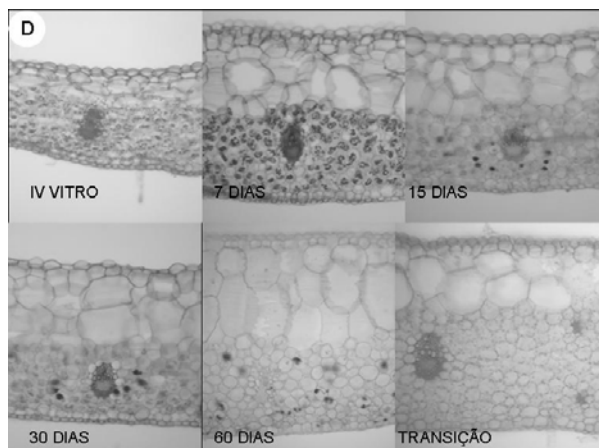


FIGURA 1 Fotomicrografias de secções transversais de folhas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* e aclimatizadas com diferentes substratos e analisada no período de 7; 15; 30 e 60 dias e folhas de transição. (A) Plantmax, (B) Vermiculita, (C) Plantmax + Vermiculita e (D) A+X+H.