

**BIORREATOR E LUZ NATURAL NA  
MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO**

**ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA**

**2006**

**ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA**

**BIORREATOR E LUZ NATURAL NA MICROPROPAGAÇÃO DO  
ABACAXIZEIRO**

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

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

**2006**

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

Silva, Adriano Bortolotti

Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro / Adriano Bortolotti Silva. -- Lavras : UFLA, 2006.

132 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Abacaxi. 2. Cultura de tecido. 3. Anatomia vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.77423

**ADRIANO BORTOLOTTI DA SILVA**

**BIORREATOR E LUZ NATURAL NA MICROPROPAGAÇÃO DO  
ABACAXIZEIRO**

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

APROVADA em 17 março de 2006

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Prof. Dr. José Darlan Ramos	UFLA
Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz	UFU
Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra	EMBRAPA/Florestas

Prof. Dr. Moacir Pasqual

UFLA

(Orientador)

**LAVRAS**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

Aos meus pais, Alaor (*In memoriam*) e Maria Helena,

pelo carinho eterno e apoio incondicional ,

Ao meu irmão, André Luiz, meu melhor amigo

Ao Prof. Moacir Pasqual, pelos ensinamentos.

**DEDICO**

À minha namorada, Lívia Gracielle,

Amo você!

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e à Virgem de Fátima, por guiar meus passos, iluminar meu caminho e abençoar minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade da realização da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Moacir Pasqual e Evaristo Mauro de Castro pela amizade, orientação e ensinamentos importantes para a minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Nilton Nagib Jorge Chalfun, José Darlan Ramos, Samuel Pereira de Carvalho, Ângela Maria de Castro e Marcio Ribeiro do Vale, pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do curso de Fitotecnia, Hermínio, Aparecida, Flávia, Ronaldo, Luciano e Fabinho, pelo companheirismo em todos os momentos.

A Lucas, Luzia e João Paulo, pelo apoio nos experimentos.

Aos meus amigos Vantuil e Antonio Claret, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, pelo convívio e ensinamentos.

À minha família.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1 .....	1
1 Introdução geral.....	1
2. Referencial teórico geral.....	3
2.1 Aspectos gerais da cultura.....	3
2.2 Biorreatores.....	5
2.2.1 Micropropagação em sistemas de cultivo líquido .....	8
2.2.2 Constituição básica dos biorreatores.....	9
2.2.3 Modelos de biorreatores.....	11
2.2.4 Fatores físicos e químicos que afetam a micropropagação em biorreatores.....	16
2.2.5 Aplicação de biorreatores na produção em larga escala de plantas.....	18
2.2.6 Vantagens e desvantagens dos biorreatores.....	20
2.3 Micropropagação fotoautotrófica.....	21
2.3.1 Uso de luz natural na micropropagação.....	23
2.3.2 Características anatômicas .....	25
3. Referências bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 2: Micropropagação de abacaxizeiro ( <i>A. comosus</i> L. Merr) por meio do emprego de biorreatores.....	39
1 Resumo.....	39
2 Abstract.....	40
3 Introdução.....	41
4 Material e métodos .....	42
5 Resultados e discussão.....	46
6 Conclusões.....	52

7 Agradecimentos.....	53
8 Referências bibliográficas.....	53
CAPÍTULO 3: Luz natural e anatomia foliar de abacaxizeiro ( <i>A. comosus</i> L. Merr) micropropagado.....	56
1 Resumo.....	56
2 Abstract.....	57
3 Introdução.....	58
4 Material e métodos .....	59
5 Resultados e discussão.....	63
6 Conclusões.....	77
7 Referências Bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 4: Aclimatização e anatomia foliar de abacaxizeiro ( <i>A.</i> <i>comosus</i> L. Merr) a partir do cultivo <i>in vitro</i> sob luz natural .....	82
1 Resumo.....	82
2 Abstract.....	83
3 Introdução.....	84
4 Material e métodos .....	85
5 Resultados e discussão.....	90
6 Conclusões.....	104
7 Referências bibliográficas.....	104
Anexo A.....	107
Anexo B .....	110
Anexo C.....	121

## RESUMO

SILVA, Adriano Bortolotti. **Biorretor e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

O alto custo das mudas micropropagadas é o principal fator de seu baixo índice de comercialização. O presente trabalho teve por objetivo avaliar novas tecnologias para a micropropagação de abacaxizeiro. O meio de cultura utilizado nos experimentos foi composto pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, 1 kg.cm<sup>-2</sup>, por 20 minutos. O regulador de crescimento utilizado para a multiplicação *in vitro* foi o BAP (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), em combinação com ANA (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) e, para o enraizamento, foram adicionados ao meio de cultura 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. O emprego de biorreatores foi eficiente para a propagação em larga escala de plântulas de abacaxizeiro em meio líquido, produzindo, em média, 19 brotos por explante e até 200 mudas aos 45 dias de cultivo em recipientes de 1.000 ml. O sistema de imersão temporária acionada a cada 2 horas é melhor do que os cultivos em biorreatores de imersão contínua. Outra alternativa tecnológica foi a micropropagação de abacaxizeiro em sistemas de cultivo com o emprego de luz natural, apresentando melhor crescimento *in vitro* em meio de enraizamento. As plântulas produzidas neste sistema foram mais altas, com melhor desenvolvimento radicular e maior massa seca quando comparadas a micropropagação convencional (luz artificial). Nas análises anatômicas foram observadas maior espessura e organização dos tecidos epidérmicos, aquífero e clorofiliano e folhas com maior frequência estomática, em comparação com a micropropagação convencional. O enraizamento *in vitro* sob luz natural também proporcionou melhor desempenho das plântulas durante o processo de aclimatização, tendo as mudas apresentado maior comprimento da parte aérea e do sistema radicular, bem como maior massa seca total. As análises anatômicas mostraram tecidos mais espessos e com melhor desempenho durante o cultivo *ex vitro*, sendo a alta intensidade luminosa durante a micropropagação sob luz natural responsável pela plasticidade observada no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e sua melhor resposta adaptativa durante a aclimatização.

---

\*Orientador: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-orientador: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA)

## ABSTRACT

SILVA, Adriano Bortolotti. **Bioreactors and natural light for pineapple micropropagation**. 2006. 132 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Commercial micropropagation is a restricted alternative because of the high costs of plantlets produced by this system. The objective of the present study was to evaluate news technologies for pineapple micropropagation. Culture medium used was composed by MS salts (Murashige & Skoog, 1962), with sucrose 30 g.L<sup>-1</sup>, pH adjusted to 5.8 before autoclaving at 121<sup>0</sup>C and 1 kg.cm<sup>-2</sup> for 20 min. Growth regulator BAP (1.0 mg. L<sup>-1</sup>) with ANA (0.25 mg.L<sup>-1</sup>) were used for multiplication phase and ANA 0.25 mg.L<sup>-1</sup> for *in vitro* rooting. Efficient mass propagation of pineapple plantlets was obtained with bioreactors, resulting in 19 shoots per explant and up to 190-200 plantlets in 1-Litre vessel after 45 days of culture. In the temporary immersion system, plantlets were immersed for 3 minutes every 2-h, with better results than the permanent immersion bioreactors. Natural light was another technique used to maintain *in vitro* micropropagated pineapple cultures, demonstrating better development during rooting phase. Plantlets cultured under natural light were taller, with a good rooting system growth and greater dry weight when compared with conventional micropropagation (artificial light). For the anatomical analysis, it was observed that the epidermis layer presented more thickness and the better organization. Also, chlorenchyma and water storage tissue showed better organization and higher stomata density when compared with conventional micropropagation. *In vitro* rooting under natural light provides better adaptability of plantlets in the acclimatization process with greater growth of aerial part, of roots and also the best dry weight accumulation. Leaves structures showed more thickness and better performance of *ex vitro* development, high irradiance provided by natural light was responsible for the plasticity obtained for the *in vitro* pineapple culture and also resulted in better responses in terms of adaptability after transference to the natural environment.

---

\* Adviser: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-adviser: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA)

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

As tecnologias de produção de mudas frutíferas vêm evoluindo muito devido às exigências fitossanitárias e aos padrões comerciais cada vez mais rígidos, fazendo com que a cadeia produtiva utilize tecnologias avançadas, treinamento de mão-de-obra e comercialização eficiente. Avanços tecnológicos, como a utilização de estufas e casas de vegetação, cultivares melhoradas, manejo de irrigação e adubação, substratos comerciais, controle automático de temperatura e umidade no ambiente de produção, permitiram melhor controle dos fatores de produção de mudas.

Além destas tecnologias, o emprego de técnicas de cultura de tecidos vegetais é viável para a produção de um grande número de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo, suprimindo assim, a necessidade dos fruticultores obterem mudas com qualidade comprovada. Entretanto, no caso do abacaxizeiro, as plantas advindas desse processo tecnológico ainda são muito caras e de difícil aquisição. Isso pode ser atribuído, basicamente, aos custos de produção no laboratório e à elevada densidade de plantio recomendada para a cultura, a qual gira em torno de 20 a 60 mil plantas por hectare.

Nesse sentido, os biorreatores são sistemas usados na micropropagação de plantas, podendo ser uma alternativa viável para a otimização do processo e a redução dos custos de produção. Este sistema permite a renovação do ar no ambiente *in vitro*, aumentando a produção de biomassa vegetal propagada com redução do tempo requerido para a propagação *in vitro*.

Outra alternativa é a micropropagação com o uso de luz natural durante as fases de multiplicação e enraizamento. O emprego de luz natural pode permitir economia de energia elétrica utilizada na sala de crescimento, além de

produzir plantas *in vitro* mais rústicas, diminuindo as perdas de mudas durante a fase de aclimatização.

Objetivou-se otimizar a propagação do abacaxizeiro com o uso de biorreatores e realizar estudos anatômicos e de crescimento *in vitro* nas fases de multiplicação, enraizamento e aclimatização da micropropagação sob luz natural.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

### 2.1 Aspectos gerais da cultura

O abacaxizeiro é originário da região compreendida entre 15<sup>0</sup> N e 30<sup>0</sup> S de latitude e 60<sup>0</sup> W de longitude, o que inclui as zonas central e sul do Brasil, o nordeste da Argentina e o Paraguai (Cunha & Cabral, 1999).

A Tailândia é o maior produtor mundial da fruta, com 1,9 milhão de toneladas, seguida das Filipinas com 1,7 milhão de toneladas. O Brasil está em terceiro lugar, com produção de 1,4 milhão de toneladas. Outros países, como a China, Colômbia e Indonésia, merecem destaque, apresentando um aumento da área plantada (FAO, 2005).

No Brasil, o abacaxizeiro é cultivado em quase todos os estados, e 81% da produção nacional concentram-se nos estados de Minas Gerais (19,90%), Paraíba (19,40%), Pará (17,50%), Bahia (8,3%), São Paulo (6,60%), Goiás (3,60%), Tocantins (2,90%) e Espírito Santo (2,80%) (IBGE, 2005). Mesmo se tratando de uma cultura de grande demanda no mercado mundial de frutas e de alta rentabilidade, o abacaxi apresenta baixo consumo per capita, com apenas 5,6 frutos por ano (Souza et al., 1999).

A produtividade brasileira é considerada baixa, 25 a 30 t/ha, quando comparada com a de outros países que apresentam produtividade de 50 a 60 t/ha. Isso ocorre devido a fatores como problemas fitossanitários, práticas culturais inadequadas e organização incipiente dos produtores (Oliveira, 1999).

O abacaxizeiro é uma monocotiledônea, herbácea da família *Bromeliaceae*, cujo gênero mais importante é o *Ananas*, no qual estão incluídos o abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr) e outras espécies que são utilizadas para a produção de fibras ou ornamentação. Sendo uma frutífera tropical, adapta-se melhor sob altitudes de até 100 m, onde apresenta o ciclo menor, maior

produção e melhor qualidade da fruta (Silva & Sanábio, 1996). A temperatura ideal para o cultivo está entre 21<sup>0</sup>C a 31<sup>0</sup>C. É uma planta exigente em luz, desenvolvendo-se bem em locais com insolação ótima de 2.500 a 3.000  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e com 6,8 a 8,2 horas de luz solar por dia (Cunha, 1999a).

É uma cultura que pode suportar períodos mais secos, devido à disposição de suas folhas em forma de canaleta, que podem captar e armazenar água em seu interior (Silva & Sanábio, 1996). No entanto, maiores rendimentos e frutos de qualidade são obtidos quando ela é bem suprida de água. Chuvas de 1.200 a 1.500 mm anuais, bem distribuídas, são adequadas para a cultura. Em regiões que apresentam períodos secos prolongados, a prática de irrigação torna-se, muitas vezes, indispensável (Cunha, 1999a).

As raízes atingem pouca profundidade no solo, onde 97% do sistema radicular de uma planta, de doze meses da cultivar Pérola, encontra-se na faixa de 0 a 20 cm (Inforzato et al., 1968). O sistema radicular é sensível ao encharcamento, podendo aparecer apodrecimento nas raízes das plantas. A cultura desenvolve-se melhor em solos de textura média e bem drenados.

O fruto é composto, do tipo sorose, formando de 100 a 200 frutinhos simples do tipo baga, inseridos sobre uma haste central, em disposição espiralada e intimamente soldados entre si. No ápice existe um tufo de folhas denominado coroa. A casca é formada pela união de brácteas e sépalas das flores que dão origem aos frutinhos (Medina, 1987).

As cultivares mais plantadas no mundo são classificadas nos grupos Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco e Pérola, de acordo com um conjunto de características comuns, tais como porte da planta, número de filhotes e rebentões, comprimento da folha, presença de espinhos na folha, cor das folhas, peso e forma dos frutos, formas dos frutinhos e sabor dos frutos (Py et al., 1984).

No Brasil, as cultivares mais plantadas são Pérola, Smooth Cayenne e o Jupi. A densidade de plantio é muita alta, podendo variar de 27.000 a 51.000 plantas por hectare (Cunha, 1999b).

A fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *Ananas*, é um dos principais fatores limitantes à cultura do abacaxizeiro, apesar de ocorrer no Brasil desde 1962 (Kimati & Tokeshi, 1964). Segundo Sampaio (1997), a doença provoca perdas em todo o país, estimadas de 30% a 40%, chegando, em algumas regiões, a índices superiores a 80%. Além das perdas em frutos, que apresentam má aparência devido às lesões, a doença pode afetar até 40% do material propagativo e de 15% a 20% das plantas antes de atingirem a frutificação.

As mudas contaminadas constituem o principal veículo de disseminação da praga. Depois de instalada a doença, a disseminação dentro das lavouras pode se dar pelo vento, pela chuva, pelos insetos e por outros agentes.

A principal forma de controle é o emprego de mudas sadias, produzidas por técnicas laboratoriais utilizando-se a cultura de meristemas (Reinhardt & Cunha, 1999). Outra alternativa importante seria o emprego de cultivares melhoradas resistentes à doença, como a 'Imperial'. O abacaxi 'Imperial' é um híbrido resultante do cruzamento do 'Perolera' com 'Smooth Cayenne', obtido em 1998 pela Embrapa Mandioca e Fruticultura de Cruz das Almas, Bahia, sendo recomendado para o mercado *in natura* e industrialização.

## **2.2 Biorreatores**

Os biorreatores são sistemas usados na propagação clonal de diversas espécies e na produção de metabólitos secundários de plantas medicinais, os quais são os principais campos de pesquisa da cultura de tecidos vegetais (Damiano, 1980; Fujita & Tabata, 1987; Sagawa & Kunisaki, 1989).

Historicamente, os biorreatores são mais conhecidos por fermentadores e estão relacionados com o crescimento e a multiplicação de células e microorganismos para a produção de alcalóides, antibióticos, entre outros derivados do metabolismo secundário (Barrueto Cid et al., 2002). Os biorreatores podem estar relacionados também aos processos aeróbicos, utilizados na exploração industrial de microorganismos como *Bacillus thuringiensis*, *Penicillium roquefortii* e *Pseudomonas syringae* (Primrose, 1987).

Os fermentadores, por serem utilizados em escala industrial, apresentavam alta capacidade de volume, podendo chegar em torno dos 20.000 litros de líquido nutritivo. Esses sistemas ainda dispunham de um aparato tecnológico avançado com sistemas de injeção de diversos gases (oxigênio, nitrogênio e gás carbônico, entre outros), agitação mecânica do líquido, reposição automatizada de nutrientes no meio nutritivo e sistema de luz artificial para o melhor desenvolvimento do material inoculado no líquido de cultura (Takayama, 1991). Os fermentadores dispõem, para melhor controle ambiental do crescimento de células e microorganismos, de monitoramento do pH, temperatura, crescimento de espuma, condutividade elétrica e sensores do teor oxigênio dissolvido no meio de cultura (Paek et al., 2001). Na realidade, os fermentadores são equipamentos de bioengenharia com sistemas de automação que apresentam alto investimento inicial, o que inviabilizava o seu emprego em sistemas de propagação em larga escala de plantas (Barrueto Cid et al., 2002).

A micropropagação de plantas, algumas vezes, apresenta alto custo de produção, o que torna as mudas produzidas nestes sistemas caras e de difícil aquisição pelos produtores rurais. Estes custos de produção são devido à mão-de-obra, que chega a 40% ou 60% dos custos de produção (Barrueto Cid et al., 2002). A metodologia convencional de micropropagação baseia-se em cultivos em pequenos frascos, com número reduzido de plântulas por frasco e uso de meio gelificado, o que acarreta intensa manipulação das culturas e envolve, com

isso, grande contingente de mão-de-obra especializada (Teixeira, 2002). Portanto, novo enfoque do processo tecnológico tornou-se necessário, principalmente com vistas à redução de custos na produção de mudas *in vitro*. Sistemas de automação para a produção de material clonal *in vitro* poderiam ser uma alternativa interessante, então, vislumbrou-se a possibilidade razoável de aproximação da micropropagação com os fermentadores (Preil & Beck, 1991; Ziv, 1992), utilizados basicamente no processo de extração de substâncias do metabolismo secundário de microrganismos.

A propagação de plantas por meio de fermentadores com fins industriais é impensável, devido ao seu alto custo e, por isso, foram feitas modificações para seu emprego na propagação *in vitro* (Barrueto Cid et al., 2002). Recentemente, os biorreatores começaram a ser utilizados para cultivo de células, tecidos, gemas e plântulas, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala.

O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para a propagação vegetal foi feito por Takayama & Misawa (1981) para micropropagação de begônia, a partir de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*, de forma similar aos cultivos convencionais. Após este primeiro trabalho, foram adaptados procedimentos para uma série de espécies vegetais (Akita & Takayama, 1994; Noriega & Söndhal, 1993).

Os biorreatores também podem ser usados na produção de embriões somáticos (Denchev et al., 1992; Tautorus et al., 1992) e sementes sintéticas (Attre et al., 1994; Onishi et al., 1994), além da obtenção de metabólitos secundários em plantas medicinais (Lee et al., 1999; Massot et al., 2000).

### 2.2.1 Micropropagação em sistemas de cultivo líquido

A micropropagação convencional apresenta tendência de requerer grande número de recipientes pequenos, meio sólido e repicagens manuais do material vegetal em câmara de fluxo laminar. É necessária a transferência periódica das plântulas para novo meio de cultura, após 4 a 6 semanas de cultivo, devido à exaustão do meio nutritivo e ao crescimento e a proliferação dos tecidos, os quais são rapidamente limitados pelo volume dos frascos (Maene & Debergh, 1985). O ágar adicionado ao meio de cultivo na propagação *in vitro* convencional pode limitar a automação no biorretor, além do trabalho necessário no processo de limpeza, distribuição de meio de cultura e manuseio de grande número de recipientes (Maene & Debergh, 1985). Isso resulta em altos custos de produção, geralmente limitando a utilização comercial da micropropagação para produtos com alto valor unitário, tais como ornamentais, plantas folhosas e frutas selecionadas (Simonton et al., 1991; Sluis & Walker, 1985).

Adaptação de biorreatores com meio líquido para micropropagação pode ser uma alternativa benéfica devido à facilidade da produção em escala (Preil, 1991), a capacidade de prevenir desordens fisiológicas de hiperidricidade nos brotos e folhas (Ziv, 1999) e, como resultado, tem-se a redução dos custos de produção (Paek et al., 2001). Entretanto, poucos biorreatores são usados na propagação comercial de plantas, devido à falta de experimentos e à complexa interação entre a fisiologia das plântulas cultivadas, nestas condições e o próprio equipamento que possibilita aeração do material vegetal *in vitro*. Além disso, somente um pequeno grupo de pesquisadores possui recursos para a aquisição de biorreatores.

Os meios líquidos são ideais na micropropagação, por evitarem o emprego de agentes solidificantes do meio de cultura (como o ágar) e proporcionarem a possibilidade de automação do processo (Debergh, 1988 e

Aitken-Christie, 1991). Os sistemas de cultivo líquido podem providenciar muito mais uniformidade nas condições de cultivo; o meio pode ser facilmente removido sem a necessidade de se trocar o recipiente; a esterilização é possível através de filtragem e a limpeza, após um período de cultivo, pode ser muito mais fácil. Em comparação com o cultivo em meio sólido, maiores recipientes podem ser usados e as repicagens podem ser reduzidas (Etienne & Berthouly, 2002).

Muitas espécies têm apresentado melhor performance em meio líquido do que sólido, por exemplo, maior número de brotos de pessegueiro (Hammerschlag, 1982) e maior número de embriões somáticos em trigo e algodão (Gawell & Robacker, 1990; Jones & Petolino, 1988). A embriogênese somática pode ser menos trabalhosa quando se utilizam biorreatores (Ziv, 1999).

De acordo com Aitken-Christie & Jones (1987), o pré-requisito para a automação da micropropagação seria um sistema de cultivo no qual os brotos ou embriões somáticos possam ser produzidos em algum recipiente por um longo período sem a necessidade de repicagem, devendo possibilitar a regular ou completa colheita das brotações ou embriões somáticos para aclimatização e obtenção da planta.

### **2.2.2 Constituição básica dos biorreatores**

A função básica de um biorreator é promover ótima condição de crescimento, devido ao controle de fatores físicos e químicos do ambiente do cultivo, para a produção de tecidos vegetais em cultivos líquidos (Paek et al., 2001).

Os biorreatores tradicionais apresentam os seguintes componentes: frasco de cultivo, motor elétrico conectado a um eixo que se estende até o

interior do frasco, bomba compressora de ar, sensores de temperatura, pH e oxigênio (Takayama & Akita, 1994).

Projetos de biorreatores foram primeiramente desenvolvidos para necessidades específicas de cultivo em suspensão embriogênica ou organogênica. O melhor projeto de biorreator deve ser desenvolvido sistematicamente para o crescimento e proliferação de diferentes espécies (Son et al., 1999).

Basicamente, existem dois tipos de biorreatores: os convencionais, que são aqueles que se desenvolveram a partir de modificações dos fermentadores utilizados no processo industrial e os biorreatores de imersão temporária. Geralmente, os biorreatores de imersão temporária (também conhecidos como sistemas de imersão temporária) são de mais simples manuseio que os biorreatores convencionais (Etienne & Berthouly, 2002).

A diferença básica entre os dois equipamentos é que, no biorreator convencional (também conhecido como de imersão permanente), o material vegetal fica em contato permanente com o líquido de cultivo, enquanto que nos sistemas de imersão temporária os explantes somente entram em contato com o meio nutritivo de tempos em tempos, ou seja, algumas vezes ao dia. Ambos os equipamentos apresentam sistemas de injeção de ar no meio de cultivo líquido e, de acordo com cada modelo, podem possuir reciclagem automática de nutrientes, agitadores, temporizadores e monitoramento de diversos parâmetros (pH, espuma, condutividade elétrica e teor de oxigênio dissolvido).

A aeração do meio de cultura é feita de diferentes formas, sendo a mais comum a injeção de fluxo de ar a uma determinada pressão, combinada ou não com o movimento de uma hélice no interior do frasco de cultivo (Takayama & Akita, 1994). O ar que entra no sistema é esterilizado ao ser forçado a passar através de uma membrana com poros de 0,22 a 0,44 micras de diâmetro.

O tamanho dos frascos utilizados pode variar bastante, podendo, geralmente, apresentar volumes de 0,5 a 20 litros de capacidade, enquanto os maiores podem atingir 300 litros. Entretanto, a maioria está entre 1 a 4 litros (Takayma & Akita, 1994).

### **2.2.3 Modelos de biorreatores**

Existem diversos modelos de biorreatores que podem ser empregados no cultivo de tecidos vegetais. Ainda não há um consenso sobre quais situações ou qual seria o melhor equipamento para o crescimento de material vegetal. Entretanto, vários equipamentos têm sido desenvolvidos com resultados promissores. A seguir, são apresentados equipamentos encontrados em revisão de literatura, dentre os quais alguns podem ser utilizados comercialmente, enquanto outros estão mais voltados a estudos envolvendo fisiologia vegetal. São eles:

**Biorreator do tipo borbulhamento** (*air driven bioreactor*) – este biorreator apresenta uma constituição básica simples. A homogeneização do meio, bem como a aeração, são feitos via borbulhamento de ar no fundo do frasco. Podendo ser de dois tipos: aeração simples ou coluna de bolha.

**Biorreator de aeração simples e coluna de bolha** (*bubble column bioreactor*) – a relação altura/diâmetro de 1 a 2 define o biorreator de aeração simples e se a relação é 3 ou acima de, o biorreator é do tipo coluna de bolha. Esses modelos de biorreatores apresentam bons resultados no cultivo de hastes caulinares, bulbos e tubérculos (Takayama & Misawa, 1981; Takayma et al., 1991).

**Biorreator do tipo levantamento de ar** (*air lift bioreactor*) – os biorreatores de coluna de bolha e de levantamento de ar são estruturalmente semelhantes. Entretanto o de levantamento de bolha (Figura 1 A) permite a circulação do líquido nutritivo de forma hidrodinâmica. Neste biorreator, a circulação do líquido e a sua mistura são determinadas pela taxa de fluxo de ar, portanto, existe um controle da velocidade da circulação do líquido, que é feito por um medidor de ar (Paek et al., 2001). O meio de cultura nesse tipo de biorreator é movido de baixo para cima, dentro de um tubo situado verticalmente no interior do frasco pelas bolhas de ar produzidas no fundo do frasco de cultivo (Teixeira, 2002).

A desvantagem dos biorreatores de coluna e levantamento de ar é a formação de espuma, devido ao emprego de grandes volumes de ar dentro do sistema. Então, existe uma tendência das células serem jogadas para fora da solução pelas bolhas de ar. O problema de espuma apareceu recentemente em todos os cultivos de células de plantas, mas, alguns casos podem ser piores que outros (Paek et al., 2001). Para evitar o problema, agentes antiespumantes, tais como produtos à base de silicone, podem ser usados, mas, é recomendado verificar seus efeitos no crescimento do cultivo, viabilidade celular e produção de metabólicos secundários (Leathers et al., 1995; Lee, 1997, citado por Paek et al., 2001). Este problema também pode ser resolvido projetando-se colunas com o topo mais largo que a base (Paek et al., 2001).

Outro problema seria a evaporação do meio de cultura e, para contorná-lo, uma coluna com água esterilizada deve ser introduzida antes da coluna de cultivo. Pela incorporação da coluna de água, a evaporação foi reduzida em 90% e, como consequência, o período de cultivo pôde ser estendido (Lee, 1999, citado por Paek et al., 2001).

**Biorretor do tipo balão de bolha** (*balloon-type bubble bioreactor*) – este modelo (Figura 1B) foi desenvolvido para superar os problemas do biorretor do tipo coluna de bolha. Na base deste modelo, foi feito um tubo em forma de Y para permitir a inoculação do material vegetal. No balão, devido ao emprego de um tubo concêntrico para a elevação das células da parte mais alta do recipiente para a parte mais baixa, havendo redução da formação de espuma. E Na extremidade superior do aparelho, uma abertura possibilita a fácil retirada do material vegetal cultivado. Em adição, ainda têm-se medidores de pH e de oxigênio dissolvido. O modelo possui tanques acoplados ao recipiente de cultivo, contendo diferentes gases, como oxigênio, nitrogênio e gás carbônico, os quais permitem o estudo do enriquecimento desses fatores no meio de cultivo. Este modelo foi apresentado por ser um biorretor seguro para o cultivo de células e promoção do crescimento celular (Seon et al., 1998).

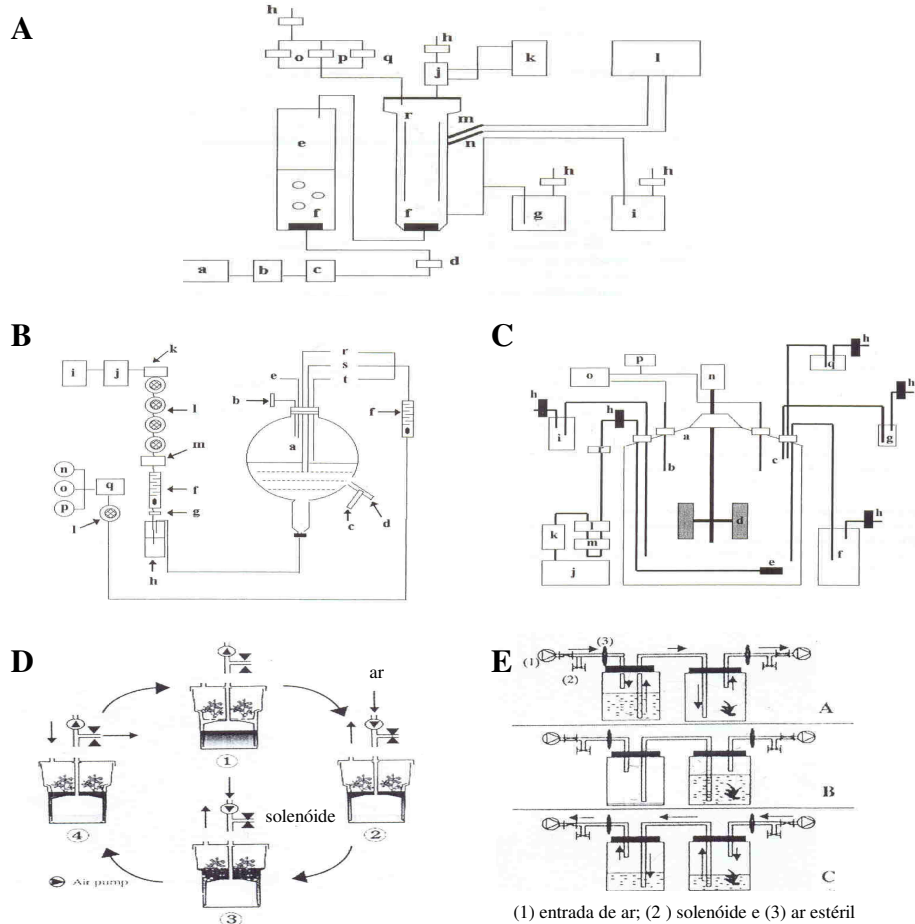
**Biorreatores de tanque de agitação** (*Stirred tank bioreactor*) – trata-se de um dos mais populares biorreatores em escala industrial (Figura 1C), sendo o meio de cultura agitado mecanicamente. Ele apresenta vantagens na mistura efetiva da cultura e de dispersar as bolhas de ar, o que previne células agregadas e proporciona maior oxigenação (Hooker & Lee, 1990). Diferentemente dos biorreatores de coluna e balão de bolha, este apresenta um mecanismo separado para agitação, composto de hélices. Entretanto, este equipamento pode ser estressante para materiais vegetais sensíveis à agitação mecânica.

**Biorreatores de imersão temporária** (*temporary immersion systems*) – em todos os modelos descritos anteriormente, o material em cultivo permanece imerso continuamente no meio de cultura. Essa imersão pode causar problemas de hiperhidricidade dos tecidos, órgãos e plântulas (Etienne & Berthouly, 2002). Diferentes sistemas têm sido descritos desde Alvard et al. (1993) e incluem os

mais recentes sistemas de imersão temporária. Eles são relativamente simples e de fácil utilização, possibilitando o contato entre todas as partes dos explantes com o meio líquido, juntamente com a renovação da atmosfera do cultivo pela ventilação forçada promovida por compressor de ar (Etienne & Berthouly, 2002).

O sistema operacional, geralmente, apresenta dois recipientes conectados, um contendo o material vegetal e o outro o meio nutritivo. Em um primeiro momento, é aplicada uma pressão positiva de ar no interior do frasco com meio de cultura, fazendo com que o líquido seja transferido para o frasco que contém os explantes. Depois de determinado período, o líquido retorna à sua posição original. Este processo é controlado por temporizadores, os quais acionam válvulas solenóides de acordo com a uma programação prévia fazendo com que o ar entre no sistema. Com isso, é possível determinar a frequência (número de imersões por dia) e também a duração de cada imersão. Estes dois fatores são, provavelmente, os mais importantes para determinar crescimento otimizado dos tecidos e células vegetais. Duas variantes deste sistema têm sido desenvolvidas e comercializadas: o sistema automático de imersão temporária - RITA® (*recipient for automated temporary system*) e sistema de frascos gêmeos - BIT® (*twin flasks system*).

No sistema RITA® (Teisson & Alvard, 1995), o frasco de 1 litro apresenta dois compartimentos, um superior, com os explantes e outro inferior, contendo meio de cultura. A pressão é aplicada nos compartimentos inferiores e faz com que o líquido atinja o compartimento superior (Figura 1D). As plantas ficam imersas em meio nutritivo de acordo com o tempo de aplicação de pressão. Durante o período de imersão, o ar é borbulhado através do meio e agita delicadamente os tecidos, renovando a atmosfera do recipiente e o excesso de pressão é eliminado por meio de saídas na parte superior do aparelho.



**FIGURA 1.** Modelos de biorreatores: **A** – biorreator ‘air lift’; a) compressor de ar; b) filtro; c) medidor de pressão; d) filtro de membrana; e) coluna de água; f) difusor de ar; g) reservatório de meio; h) filtro de membrana; i) dispositivo para amostra; j) circulador de água; k) caixa de controle; l) medidor de pH; m) oxigênio dissolvido; n) antiespumante; o) ácido; p) base; q) tubo draga. **B** – Biorreator ‘balloon-type’; a) balão; b) saída de ar; c) inoculação; d) dispositivo para amostra; e) suporte de troca de meio; f) medidor de pressão; g) filtro de membrana; h) coluna de água; i) compressor de ar; j) reservatório de ar; k) ar frio; l) sistema de filtros; m) ar seco; n) tanque de O<sub>2</sub>; o) tanque de CO<sub>2</sub>; p) tanque de N<sub>2</sub>; q) misturador de ar; r) medidor de O<sub>2</sub> dissolvido; s) misturador de ar; t) medidor de PH. **C** – biorreator ‘tanque de agitação’; a) recipiente para 50 litros; b) medidor de O<sub>2</sub> dissolvido; c) medidor de pH; d) agitador; e) difusor de ar; f) pote para amostra; j) compressor de ar; k) sistema de filtragem; l) sistema de refrigeração; m) sistema de aquecimento; n) motor; o) controlador; p) computador; q) antiespumante; r) medidor de pressão. **D** – biorreator de imersão temporária ‘RITA®’. **E** – biorreator de imersão temporária ‘BIT®’. Fonte: Etienne & Bertouly (2002) e Paek et al.( 2001).

No sistema BIT ® (Escalona et al., 1999), vários frascos são conectados dois a dois, horizontalmente. A pressão de ar entra no frasco contendo o meio de cultura, fazendo com que o líquido chegue ao outro frasco contendo os explantes (Figura 1 E). O tempo de imersão pode variar e o ar promove borbulhamento do líquido e renovação da atmosfera do frasco.

Após a imersão, pelo controle de válvulas solenóides, o ar entra nos frascos contendo os explantes, fazendo com que o líquido retorne à posição anterior.

O BIT e o RITA não permitem a renovação do meio de cultura. Este problema pode ser solucionado com sistema automatizado de cultivo de planta (*automated plant culture system, APCS*), modelo desenvolvido por Tisserat & Vandercook (1985), possibilitando o cultivo do material por tempo indeterminado.

#### **2.2.4 Fatores físicos e químicos que afetam a micropropagação em biorreatores**

Os biorreatores são equipamentos que podem apresentar características diversas, como capacidade variada de volume dos recipientes, diferentes mecanismos de funcionamento, sistemas automatizados e monitoramento por sensores. A seguir, são listados alguns fatores físicos e químicos que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e células vegetais.

**pH do meio de cultura** – a avaliação do pH pode ser necessária, principalmente quando os biorreatores são empregados em cultivos de longo período. Em suspensões celulares, pequenas mudanças de pH indicam alterações fisiológicas e químicas do cultivo. Um aumento na concentração de amônio leva ao aumento do pH, enquanto sua utilização pelo material vegetal pode diminuir o seu valor.

Quando existe enriquecimento de oxigênio no ambiente de cultivo, por exemplo, podem haver alterações de 0,2 unidades de pH, dependendo do volume do recipiente (Paek et al., 2001). O monitoramento do pH pode melhorar o desempenho da cultura em biorreatores e aumentar a repetibilidade do processo.

**Oxigênio dissolvido (DO)** – a concentração de DO no biorreator pode ser medida por equipamento esterilizado acoplado ao biorreator. A concentração de DO em meio líquido indica o montante de oxigênio disponível para a cultura. O oxigênio no meio pode ser consumido rapidamente em cultivos com grandes densidades de plântulas ou células (Paek et al., 2001). Quando os biorreatores estão com bons níveis de oxigenação, não existe a detecção da enzima álcool desidrogenase (ADH).

Em alguns sistemas, como os biorreatores de coluna, pode haver expressão significativa de ADH. Quando o DO cai, certamente, a respiração celular é prejudicada. Então, processos fermentativos começam e o ácido láctico produzido causa queda do pH citoplasmático. Com a queda do pH citoplasmático, há um desvio na rota da fermentação láctica para a fermentação etílica. Isso requer aumento da ADH, a fim de manter a energia necessária para o crescimento *in vitro* (Drew, 1997).

**Suprimento de CO<sub>2</sub>** – A concentração de CO<sub>2</sub> também pode influenciar o pH do meio. Altas taxas de aeração resultam na rápida remoção de gases, como o CO<sub>2</sub> e o etileno, levando o crescimento da cultura ao máximo (Paek et al., 2001). O enriquecimento do sistema com CO<sub>2</sub> pode levar ao cultivo fotoautotrófico, melhorando o crescimento *in vitro* e reduzindo as perdas durante a aclimatização. Kozai (1991a,b) sugere que é possível o fotoautotrofismo se o ambiente for favorável.

Densidade do inóculo – Geralmente, maior número de explantes sobrevive melhor e cresce mais rapidamente em biorreatores. Altas densidades de inóculo 20% a 30%(v/v) asseguram crescimento significativo de células (Son et al., 1999). A densidade tem efeito no aumento de biomassa e pode variar com o tipo de cultura, espécie de plantas e período de cultura (Paek et al., 2001).

**Tempo de imersão** – em sistemas de imersão temporária, está claro que o tempo de imersão e a sua frequência são muito importantes, determinando a absorção de nutrientes e controlando a hiperhidricidade das plântulas (Etienne & Berthouly, 2002). A variação do tempo de imersão e sua frequência devem ser determinadas de acordo com as exigências de cada cultivo.

**Volume dos frascos** – os biorreatores, normalmente, utilizam frascos de maior volume do que os empregados na micropropagação convencional. Efeitos positivos na utilização de frascos maiores têm sido observados desde o relato de Monette (1983), obtendo maiores brotos de videira em frascos maiores. Harris & Mason (1983) afirmam que o maior volume do frasco proporciona a utilização de maior quantidade de meio de cultura, prevenindo deficiências de certos constituintes do meio. Para Etienne & Berthouly (2002), maior volume de meio pode ter efeito positivo na proliferação e no crescimento de plântulas *in vitro*.

### **2.2.5 Aplicação de biorreatores na produção em larga escala de plantas**

**Proliferação de brotações** – a produção de plântulas *in vitro* em larga escala pode se tornar um dos principais empregos dos biorreatores em laboratórios comerciais. O cultivo de explantes vegetais em biorreatores tem mostrado incremento na proliferação de brotos, quando comparado ao processo

convencional. Atualmente, existe tendência de que os sistemas de imersão temporária apresentem maiores taxas de multiplicação em plantas.

Um dos primeiros relatos da eficiência da imersão temporária foi o de Harris & Mason (1983) que cultivaram explantes de videira em um modelo de biorreator composto por dois Erlenmeyers conectados, os quais mudavam de posição a intervalos predeterminados de tal forma que, em uma posição, os explantes eram submersos pelo meio de cultura e, na outra posição, se encontravam não submersos. Após 90 dias de cultivo, a produção de brotos chegou a ser sete vezes superior ao rendimento obtido, no mesmo período, em ágar. Lorenzo et al. (1998) demonstraram, em sistema de frascos gêmeos, que a imersão temporária promoveu a formação de brotos e seu crescimento. A taxa de multiplicação foi de 23,9 brotos em 30 dias, sendo seis vezes superior ao protocolo convencional para cana-de-açúcar. Escalona et al. (1999) usaram o mesmo biorreator para abacaxizeiro e mostraram que a imersão temporária estimulou a multiplicação e a massa seca dos brotos. Mais de 5.000 brotações foram obtidas a partir de um único recipiente, aumentando a taxa de multiplicação em 300% a 400% em relação ao convencional.

**Produção de bulbilhos** – em um biorreator de aeração simples foram produzidos 634 bulbilhos de lírio a partir de 250 escamas, tendo 70 deles excedido 0,3g e estes floriram durante o primeiro ano de cultivo em solo (Takayma & Misawa, 1983). Takahashi et al. (1992) relataram o cultivo bulbos de lírio em um biorreator de 2.000 litros. Paek et al. (2001) obtiveram crescimento dos bulbos de lírio 10 vezes superior em biorreator de imersão contínua de 8 litros, biorreator do tipo coluna e biorreator do tipo balão, quando comparados com um biorreator com agitação mecânica do meio de cultura.

**Microtuberização** – microtubérculos de batata podem ser propagados efetivamente em biorreatores de imersão permanente (4 litros), sendo produzidos 400 tubérculos (Akita & Takayma, 1988). Em sistemas de imersão temporária (modelo irmãos gêmeos), foi observada, por Akita & Takayma (1994), a produção de até 960 tubérculos em 10 semanas de cultivo. Teisson & Alvard (1999), trabalhando com o sistema RITA®, obtiveram 3 microtubérculos por gema, após 10 semanas de cultivo.

**Embriogênese somática** – Escalant et al. (1994) mostraram que, em bananeira, após dois meses de cultivo, em sistema de imersão temporária, houve a formação de três vezes mais embriões somáticos do que os cultivados em meio sólido. Em seringueira, existe aumento da produção de embriões somáticos em quatro vezes, em sistema de imersão temporária, quando comparado com a metodologia convencional (Etienne et al., 1997b). Em *C. arábica*, foi relatada a produção de 15 a 50 mil embriões somáticos, em biorreator de imersão temporária, por grama de inóculo (Etienne et al., 1997a).

## **2.2.6 Vantagens e desvantagens dos biorreatores**

Os biorreatores apresentam potencial para aumento significativo no crescimento do material vegetal *in vitro*, por promoverem maior disponibilidade de ar no sistema, podendo ser utilizado na micropropagação de diversas espécies de interesse comercial.

A possibilidade do período de cultivo ser, em alguns modelos, virtualmente ilimitado, controle ambiental dos fatores físicos e químicos do processo produtivo e a possível redução dos custos são grandes benefícios do sistema.

Entretanto, alto investimento na aquisição dos equipamentos, manutenção e treinamento de pessoal são aspectos negativos do sistema. A ocorrência de contaminações leva a custos e perda de tempo que podem ser desvantajosas (Leathers et al., 1995).

### **2.3 Micropropagação fotoautotrófica**

O conceito da micropropagação fotoautotrófica é ainda recente e está relacionado com o fornecimento de condições ambientais adequadas para que os tecidos vegetais cultivados *in vitro* possam realizar fotossíntese, fazendo com que as plantas micropropagadas apresentem crescimento fotoautotrófico sustentável. No intuito de atingir esse objetivo, torna-se necessário o aumento da disponibilidade de CO<sub>2</sub>, o aumento dos níveis de radiação e a redução da umidade relativa nos recipientes de cultivo, conferindo às plantas capacidade de crescimento e multiplicação em meio sem suprimentos orgânicos (Borkowska, 2001; Fischer & Alfermann, 1995; Kanechi et al., 1998; Khan et al., 2003; Seko & Nishimura, 1996).

Algumas técnicas e metodologias têm sido desenvolvidas para fornecer as condições que promovam o aumento na capacidade fotossintética do material micropropagado. As principais são: a) permitir que ocorram trocas gasosas nas tampas dos recipientes de cultivo pelo uso de filtros permeáveis e, até mesmo, chumaços de algodão têm sido utilizados (Kozai & Nguien, 2003). Quando isso ocorre em ambientes com concentrações normais de CO<sub>2</sub>, este sistema é denominado de ventilação natural (Cui et al., 2000) e, se o ambiente for enriquecido com CO<sub>2</sub>, é chamado de sistema de ventilação forçada (Kanechi et al., 1998; Khan et al., 2003); b) a substituição de lâmpadas fluorescentes utilizadas, comumente, em salas de crescimento, por lâmpadas que forneçam maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), como

as lâmpadas de halogênio (Kozai et al., 1997) e utilização de luz natural (Kodym & Zapata-Arias, 1998).

Kozai et al. (1987) demonstraram que houve incremento significativo de *Limonium* em ambiente enriquecido com 950 ppm de CO<sub>2</sub>, sugerindo crescimento fotoautotrófico. Em *Cymbidium* cultivado *in vitro*, houve maior taxa fotossintética em ambiente enriquecido com 2.000 ppm de CO<sub>2</sub> e 200 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> do que em 35 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> na mesma concentração de CO<sub>2</sub> (Kozai et al., 1987), ficando claro que a interação luz e CO<sub>2</sub> é muito importante neste sistema de cultivo.

Aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no interior do recipiente pode aumentar o ponto de saturação de fotossíntese pela luz e torna as plantas fotossinteticamente mais adaptadas a regimes de luz mais altos (Nguyen et al., 1999).

Na maioria das vezes, plantas *in vitro* têm crescido com sucesso se supridas adequadamente com luz e CO<sub>2</sub> na ausência de sacarose. Provavelmente, a sacarose não é um fator limitante para o crescimento das espécies micropropagadas em condições fotoautotróficas (Cui et al., 2000). Entretanto, algumas espécies podem apresentar baixo desenvolvimento, com a exclusão total da sacarose do meio de cultivo, tendo baixa multiplicação e enraizamento (Vyas & Purohit, 2003). Assim, nessas espécies, a taxa de fotossíntese deve ser reduzida devido à utilização de sacarose mesmo com CO<sub>2</sub> e luz adequados (Kanechi et al., 1998), o que torna estes cultivos fotomixotróficos.

Plântulas de arroz cultivadas *in vitro* em meio de cultura desprovido de sacarose, com enriquecimento de CO<sub>2</sub>, apresentavam hiperhidricidade, de forma que suas brotações continham anormalidades anatômicas, incluindo estômatos pouco desenvolvidos (Seko & Nishimura, 1996). Provavelmente, a ausência de sacarose (composto utilizado em maiores concentrações no meio de cultivo), causa aumento no potencial hídrico do meio de cultura e disponibilizou mais

água para os explantes, sendo este o principal fator contribuinte para esta anomalia fisiológica. Debergh (1988) afirma que a redução, ou até mesmo a eliminação da sacarose do meio de enraizamento, deve ser utilizada com a finalidade de facilitar a passagem das plantas para o estágio autotrófico no transplântio para a fase de aclimatização.

Kozai & Iwanami (1988), citados por Kozai (1991b), mostraram que, em cravo cultivado em ambiente enriquecido com CO<sub>2</sub>, a taxa fotossintética aumentou com as maiores concentrações de CO<sub>2</sub> e que este aumento foi muito superior no primeiro dia do tratamento do que no 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias de cultivo e *in vitro*. Neste trabalho também houve queda na concentração de sacarose do meio de cultura e aumento da glicose e frutose no recipiente de cultivo, havendo queda muito maior dos açúcares totais nos tratamentos em que houve enriquecimento com CO<sub>2</sub>, após 30 dias de cultivo. Isto faz com que haja aumento na pressão osmótica do meio de cultura, devido à hidrólise da sacarose em monossacarídeos, até mesmo com queda na concentração de açúcar em torno de 20% (Pieters et al., 1987, citados por Kozai, 1991 b). Os efeitos do aumento da pressão osmótica ou os do potencial hídrico nas plantas devem ser mais estudados no futuro.

### **2.3.1 Uso de luz natural na micropropagação**

As lâmpadas fluorescentes brancas frias são a principal fonte de luz utilizada em salas de crescimento nos trabalhos científicos de cultura de tecidos, sendo citadas em 90% dos casos (Kodym & Zapata-Arias, 1998). Os gastos com iluminação são responsáveis por 65% dos custos em energia elétrica (Standaert de Metsenaerae, 1991) e constituem um dos mais elevados componentes do custo de produção, com exceção para os gastos com a mão-de-obra (Dooley, 1991).

A utilização de luz natural pode representar menor gasto com luz artificial, além de redução nos custos de manutenção, requerendo instalações mais simplificadas (Kodym & Zapata-Azarias, 1998). Entretanto, a disponibilidade de luz pode variar com as condições climáticas, como estações do ano e hora do dia. Este fator pode ser limitante em algumas regiões, principalmente aquelas com baixa intensidade luminosa e grande mudança climática durante o ano, como em áreas de clima temperado.

A irradiância pode afetar diretamente o desenvolvimento das plantas *in vitro*, apresentando efeito sobre a lamina foliar e modificando características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lichtenthaler et al., 1981; Terry et al., 1983, citados por Lee et al., 1988). O fator luz também influencia a fotossíntese, a concentração de clorofila e a estrutura dos cloroplastos em plantas cultivadas *in vitro*, entretanto, isso não causa limitação durante o processo de aclimatização (Lee et al., 1988). Provavelmente, maiores limitações de sobrevivência e adaptação a um novo ambiente das plântulas transplantadas estão relacionadas com a perda excessiva de água causada pelo baixo desenvolvimento de cera epicuticular com extensos espaços intercelulares no mesofilo (Wetzstein & Sommer, 1982) e também a estômatos com reduzida funcionalidade (Wetzstein & Sommer, 1983).

O estresse hídrico tem sido relatado como a principal causa de choque no transplante, tendo como resultado a perda excessiva de água pelas plântulas (Brainerd & Fuchigami, 1981). A alta umidade relativa do recipiente de cultivo (próxima de 100%) e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura e no funcionamento dos tecidos, causando a baixa capacidade das mudas produzidas *in vitro* de controlar a perda de água quando submetidas às condições do ambiente natural, com aumento da demanda evaporativa (Fuchigami et al., 1981; Preece & Sutter, 1991).

As plantas cultivadas em sistemas fotoautotróficos apresentam melhores características morfoanatômicas (Adelberg et al., 1999) como melhor desenvolvimento do sistema radicular, maior diferenciação do parênquima paliçádico, cutículas mais espessas, redução na densidade de estômatos e melhor funcionamento destes (Serret et al., 1996; Dimassi-Theroui & Bosabalidis, 1996; Khan et al., 2003).

### **2.3.2 Características anatômicas**

As desordens estruturais e funcionais das folhas de plantas são o resultado dos complexos fatores ambientais encontrados no ambiente de cultivo *in vitro*. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987). As modificações manifestadas nas folhas de plantas micropropagadas afetam os principais processos executados por estas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984).

As plantas micropropagadas apresentam folhas com aspectos diferenciados, quando comparadas com plantas que cresceram em ambientes naturais, tais como pouca cera cuticular e estômatos pouco funcionais, reduzida diferenciação do mesofilo com grandes espaços intercelulares, além de uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea, o que pode limitar os processos de aclimatização (Brainerd et al., 1981; Grout & Aston 1978; Pierik, 1990; Wetzstein & Sommer, 1983).

Donnelly & Vidaver (1984), trabalhando com anatomia foliar de framboesa, observaram que as folhas *in vitro* apresentavam-se menores, mais finas e com células paliçádicas e células do mesofilo menos compactas em relação às plantas crescendo em ambiente natural.

Comparando a anatomia de bétula branca desenvolvida *in vitro* com material mantido em casa de vegetação, Smith et al. (1986) verificaram que as células paliádicas em corte transversal tomavam 38% do total da espessura nas plantas em casa de vegetação, porém, somente 21% nas dos materiais *in vitro*.

Lee et al. (1985), trabalhando com *Liquidambar*, mostraram que diferenças no fluxo quântico podem modificar o desenvolvimento *in vitro*. A elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessas *in vitro*, com diferenciação do tecido paliádico no mesófilo. A anatomia foliar destas plântulas apresentou-se mais próxima de folhas de mudas em aclimatização do que o material *in vitro* crescendo em baixa irradiância.

A estrutura e o funcionamento do estômato têm sido implicados pela falta de controle da entrada e saída de água mostrada pelas plantas micropropagadas quando removidas do meio de cultura. Em todas as espécies observadas, os estômatos estavam totalmente abertos quando em cultivos *in vitro*. A densidade estomática *in vitro*, medida por número de estômatos por mm<sup>2</sup>, foi maior em macieira (Blanke & Belcher, 1989) e roseira (Capellades et al., 1990) mas, menor em ameixeira (Brained et al., 1981), quando comparadas com plantas que cresceram em casa de vegetação.

A morfologia e a densidade dos estômatos podem ser alteradas *in vitro* por mudanças das condições ambientais. Em roseiras que cresceram em condições *in vitro*, o aumento na irradiância de 25 para 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e decréscimo da umidade relativa de 100% para 75%, resultou em estômatos muito similares àqueles formados em plantas em casa de vegetação. Os estômatos foram mais elípticos e em menor número (Capellades et al., 1990).

O tempo de fechamento dos estômatos durante a transferência das plantas *in vitro* para casa de vegetação pode ser determinante para a sua sobrevivência durante a aclimatização. Esse tempo pode ser variável de acordo com a espécie e as condições *in vitro*. Na verdade, a maioria dos estômatos fecha

entre 12 e 24 horas após a retirada da planta do meio de cultura. Shackel et al. (1990) calcularam que a perda de água após 24 horas supera duas ou três vezes o peso inicial das plantas. Esses dados revelam que a demanda transpiratória pode resultar em severo estresse hídrico por meio da resposta de fechamento de estômatos à baixa umidade relativa.

Embora seja certo que a alteração do ambiente de cultivo possa favorecer a capacidade fotoautotrófica, a dificuldade tem sido determinar qual o grau de fotoautotrofia atingida pela planta em determinada condição de cultivo, principalmente em função das metodologias disponíveis para esses estudos (Serret et al., 1996). Além disso, uma única característica da planta ou único fator ambiental não podem expressar um processo tão complexo (Deccetti, 2004).

É evidente que qualquer metodologia que cause a aproximação da micropropagação convencional, em relação aos sistemas fotoautotróficos, pode trazer benefícios interessantes, como economia do processo e proporcionar plantas produzidas *in vitro* mais rústicas e resistentes aos estresses do processo de aclimatização.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELBERG, J.; FUJIWARA, K.; KIRDMANEE, C.; KOZAI, T. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 95-104, 1999.
- AITKEN-CHRISTIE, J. Automation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. J. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrech, Netherlands, 1991. p. 363-388.
- AITKEN-CHRISTIE, J.; JONES, J. Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 185-196, 1987.

AKITA, M.; TAKAYAMA, S. Mass propagation of potato tubers using jar fermentador techniques. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 230, p. 55-61, 1988.

AKITA, M.; TAKAYAMA, S. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid médium surface level control. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 3/4, p. 184-187, Jan. 1994.

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Compararison of methods of liquid médium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 55-60, Jan. 1993.

ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K., FOWKE, L. C. Production of vigorous, dessiccation tolerant White spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) synthetic seeds in bioreactor. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 11, p. 601-606, Aug. 1994.

BARRUETO CID, P.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. **Biorreatores de imersão permanente Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 25, p. 50-53, mar. abr. 2002.

BLANKE, M. M.; BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 85-89, 1989.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropageted strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 195-206, July 2001.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J.; KWIATKOWSKI, C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environment. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 173-175, Apr. 1981.

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

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. 3, p. 219-226, 2000.

CUNHA, G. A. P. Aspectos agroclimáticos. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999a. p. 53-66.

CUNHA, G. A. P. Implantação da cultura. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999b. p. 139-167.

CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 17-51.

DAMIANO, C. Planning and building a tissue culture laboratory. In: CONFERENCE ON NURSERY PRODUCTION OF FRUITS PLANTS THROUGH TISSUE CULTURE APPLICATIONS AND FEASIBILITY, 1980, Beltsville. **Proceedings...** Beltsville: USDA, 1980. p. 93-101.

DEBERGH, P. Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. In: KOZAI, T. (Ed). **Horiticulturae in high technology era. International Symposium on high technology in protected cultivation**. Tóquio, 1988. p. 45-47.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, Gebloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DENCHEV, P. D.; KUKLIN, A. I.; SCRAGG, A. H. Somatic embryo production in bioreactors. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 99-109, Oct. 1992.

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 Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1996.

DOOLEY, J. H. Influence of lighting spectra on plant tissue. In: METTING OF AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS, 1991, Chicago. **Proceedings...** Chicago: [S. n. ], 1991.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

DREW, M. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 233-250, 1997.

ESCALANT, J-V; TEISSON, C; CÔTE, F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). In **Vitro Cell Development Biology Plant**, Marlboro, v. 30, n. 4, p. 181-186, Oct. 1994.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DANQUITA, M.; GONZALES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 9, p. 743-748, May 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 215-231, June 2002.

ETIENNE, H.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; COTE, F.; BERTHOULY, M. L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON CAFFÉ, 17., 1997, Nairobi. 1997. **Proceedings...** Nairobi: ASIC, 1997a. p. 457-465.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M., MICHAUX-FERRIERE, N.; CARRON, M. P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Mull. (Arg. Using) the temporary immersion technique. In **Vitro Cell Development Biology**, Marlboro, v. 33, p. 81-87, 1997.

FAO. Site: **FAO** (2005). Disponível em:  
<<http://apps.fao.org/lim500/nphwrap.pl>>. Production. Crops.  
PrimaryDomain= SUA. > Acesso em: dez. 2005.

FISCHER, U.; ALFERMANN, A. W. Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in bioreactor: influence of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 19-28, July 1995.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration of water loss in aseptically cultured plum. **Journal of the american society of horticultural science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, July 1981.

FUJITA, Y.; TABATA, M. Secondary metabolites from plant cells. Pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: GREEN, C. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. New York: Alan R. Liss, 1987. p. 169-185.

GAWEL, N. J.; ROBACKER, C. D. Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 201-204, Dec. 1990.

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. **Annals of Botany**, London, v. 42, n. 180, p. 993-995, 1978.

HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro. **Hortscience**, Alexandria, v. 17, n. 1, p. 85-86, Feb. 1982.

HARRIS, R. E.; MASON, E. B. Two machines for in vitro propagation plants in liquid media. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 63, n. 1, p. 311-316, 1983.

HOOKER, B. S.; LEE, J. M. Cultivation of plant cells in a stirred vessel: effect of impeller design. **Biotechnology Bioeng**, New York, v. 35, n. 3, p. 296-304, Feb. 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção Agrícola**. 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: dez. 2005.

INFORZATO, R.; GIACOMELLI, E. J.; ROCHELLE, L. A. Sistema radicular do abacaxizeiro aos 4, 8, 12 meses, plantado no início da estação seca em solo latossolo vermelho escuro-orto. **Bragantia**, Campinas, v. 27, n. 11, p. 135-41, mar. 1968.

JONES, A. M.; PETOLINO, J. F. Effects of support médium om embryo and plant prodction from culture anthers of soft-red winter wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 243-261, 1988.

KANECHI, M.; OCHI, M.; ABE, M.; INAGAKI, M. N.; MAEKAWA, S. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of Cauliflower plantlets cultured in vitro photoautotrophically and photomixotrophically. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, Mar. 1998.

KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose em abacaxi. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 39, n. 3, p. 131-133, set. 1964.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as na alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata*)cv. Grande Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Cculture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1998.

KOZAI, T. Autotrophic micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 17, High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer-Verlag, 1991a. p. 313-343.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Plant Cell Desenvolpment Biology Plant**, Marlboro, v. 27, p. 141-154, 1991b.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants throught *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, 49-56, 1997.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of wood and tropical plants. In: JAIN, S. M.; ISHII, K (Ed.). **Micropropagation of wood trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 757-781.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photons fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. In: SYMPOSIUM ON PLANT MICROPROPAGATION IN HORTICULTURAL INDUSTRIES, 1987, Arlon. **Anais...** Arlon: [S. n. ], 1987.

LEATHERS, R. R.; SMITH, M. A. L.; AITKEN-CHRISTIE, J. Automation of bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1987-214.

LEE, K. T.; SUZUKI, T.; YAMAKAWA, T.; KODAMA T.; IGARASHI, Y.; SHIMOMURA, K. Production of tropane alkaloids by transformed root cultures of *Atropa belladonna* in stirred bioreactors with a stainless steel net. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 7/8, p. 567-571, Mar. 1999.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. reports improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, n. 3, p. 637-641, July 1985.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the american society of horticultural science**, Alexandria, v. 113, n 1, p. 167-171, Jan. 1988.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 197-200, 1998.

MAENE, L.; DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. **Plant Cell tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 23-33, 1985.

- MASSOT, B.; MILESI, S.; GONTIER, E.; BOURGAUD, F.; GUCKERT, A. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 11-19, 2000.
- MEDINA, J. C. Abacaxi. 1: cultura. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Frutas tropicais 2: abacaxi**. Campinas, 1987. p. 1-132.
- MONETTE, P. L. Influence of size of culture vessel on in vitro proliferation of grape in liquid médium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 327-332, 1983.
- NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; NGUYEN, U. V. Effects of sucrose concentration, supporting material and nuber of air exchanges of the vessel on the growth of in vitro coffe plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 51-57, 1999.
- NORIEGA, C.; SÖNDHAL, M. R. . Arabic coffe micropropagation throug somatic embryogenesis via bioreactors. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIM ON CAFFE, 15., 1993, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: ASIC, 1993. p. 73-81. Biotechnologie.
- OLIVEIRA, S. L. de. Apresentação. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 15.
- ONISHI, N.; SAKAMOTO, Y.; HIROSAWA, T. Synthetic seeds as na applications of mass production of somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 137-145, 1994.
- PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of biorreactores for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cell Developmental Biology – Plant**, Wallingffprd, v. 37, n. 2, Mar./Apr. 2001.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-prensa, 1990. 326 p.
- PREECE, E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 72-93.

PREIL, W. Application of bioreactors in plant propagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 425-445.

PRIMROSE, S. B. **Modern biotechnology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 176 p.

PY, C.; LACOUÉILHE, J. J.; TEISSON, C. **L'ananas: as culture e ses produits**. Paris: Maisonneuve e Larose, 1984. p. 21-35.

REINHARDT, D. H. R. C.; CUNHA, G. A. P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 105-138.

SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J. T. Micropropagation of floricultural crops. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BAJAJ Y. P. S. (Ed.). **Handbook of plant cell culture 5**. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 22-56.

SAMPAIO, A. C. A importância do roguing na cultura do abacaxizeiro. **Informativo SBF**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 14, 1997.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effects of CO<sub>2</sub> and light on survival and growth in vitro on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 257-264, Sept. 1996.

SEON, J. H.; YOO, K. W.; CUI, Y. Y.; KIM, M. H.; LEE, S. S.; SON, S. H. PAEK, K. Y. Application of bioreactor for the production of saponin by adventitious roots cultures in *Panax ginseng*. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed.). **Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 329-332.

SERRET, M. D.; RRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. Development of photoautotrophic and photoinhibition of *Gardênia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 1-16, Apr. 1996.

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

SILVA, C. R. de R. e.; SANÁBIO, D. **Cultura do abacaxizeiro informações básicas**. Lavras – MG. : UFLA, 1996. (Boletim técnico, 9).

SIMONTON, W.; ROBACKER, C.; KRUEGER, S. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 211-218, Nov. 1991.

SLUIS, C. J.; WALKER, K. A. Commercialization of plant tissue culture propagation. **International Association Plant Tissue Culture**, Newsl, v. 47, p. 2-12, 1985.

SMITH, M. A. L.; PALTA, J. P.; McCWN, B. H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown asian White birch. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 11, n. 3, p. 437-442, May 1986.

SON, S.; CHOI, S.; KWON, S. R.; LEE, Y. H.; PAEK, K. Y. Large-scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. **Journal of Plant Biotechnology**, Sewon, v. 1, p. 1-8, 1999.

SOUZA, J. da S.; CARDOSO, C. E. L.; TORRES FILHO, P. Situação da cultura no mundo e no Brasil e importância econômica. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 403-428.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation – technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

TAKAHASHI, S.; MATSUBARA, H.; YAMAGATA, H.; MORIMOTO, T. Micropropagation of virus free bulblets of *Lirium longiflorum* by tank culture. 1. Development of liquid culture method and large scale propagation. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 319, p. 83-88, 1992.

TAKAYAMA, S. Plant propagation through shake and bioreactors culture techniques. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry 17 – High-tech and micropropagation I**. Berlin Heidelberg Springer-verlag, 1991. p. 495-515.

TAKAYMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 147-156, Nov. 1994.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 3, p. 461-467, May 1981.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. The mass propagation of lilum in vitro through stimulation of multiple adventitious bulbsacale formation and through shake culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, n. 1, p. 224-228, Jan. 1983.

TAKAYAMA, S.; SWEDLUND, B.; MIWA, U. Automated propagation of micro-bulbs of lilies. In: VASIL, I. K. (Ed). **Cell cultures and somatic cell genetics 8**. New york: Academic Press, 1991. p. 111-131.

TAUTORUS, T. E.; LULSDORF, M. M.; DUNSTAN, D. I. Bioreactor culture of *Picea glauca-engelmanni* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters. **Applied Microbiology Biotechnology**, New york, v. 38, n. 1, p. 46-51, Oct. 1992.

TEISSON, C.; ALVARD, C. A new concept of plant in vitro cultivation liquid médium: temporary immersion. In: TERZI, M. (Ed.). **Current issues in plant molecular and celular biology**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 105-110.

TEISSON, C.; ALVARD, D. *In vitro* production of potato microtubers in liquid médium using temporary immersion. **Potato Research**, Wageningen, v. 42, n. 3/4, p. 499-504, 1999.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Uberlandia, v. 4, n. 24, p. 36-41, jan./fev. 2002.

TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C. E. Development of na automated plant culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 107-117, 1985.

VYAS, S.; PUROHIT, S. D. In vitro growth and shoot multiplication of *Wrightia tomentosa* Roem et Schult in a controlled carbon dioxide environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 283-286, Dec. 2003.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidacea) during acclimatization. **American Journal of botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, Oct. 1982.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of in vitro cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 475-480, May 1983.

ZIV, M. In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERRSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

ZIV, M. Morphogenic control of plants micropropagated in bioreactor cultures and its possible impact on acclimatization. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 319, p. 119-124, 1992.

ZIV, M. Organogenic plant regeneration in bioreactors. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed.). **Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 673-676.

## CAPÍTULO 2

### 1 RESUMO

SILVA, Adriano Bortolotti. **Micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) por meio do emprego de biorreatores**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Propagação em larga escala de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) foi testada a partir de técnicas de cultivo em biorreatores. Quatro métodos de cultivo (sólido, líquido, imersão contínua e temporária em biorreatores) foram comparados. O meio de multiplicação foi composto pelos sais do MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. O meio sólido continha 5 ou 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120<sup>o</sup>C, por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25±1<sup>o</sup>C, sob luz branca fria (40 µmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), com 16 horas de fotoperíodo. Os biorreatores apresentavam recipientes com 1 litro de capacidade, o fluxo de ar foi esterilizado por uma membrana de filtro de 0,22 µm. Três tempos de aeração (biorreator de imersão contínua) ou frequência de imersão a cada 2, 4 e 8 horas por 3 minutos, foram usados. Sistemas de imersão temporária, com as plântulas imersas a cada 2 horas por 3 minutos, proporcionaram aumento na taxa de multiplicação, na altura e na massa seca, após 45 dias de cultivo. Neste sistema foram produzidas 190 a 200 plantas por frasco de 1 litro. O sistema de imersão temporária é mais eficiente para a propagação em larga escala de abacaxizeiro do que os outros métodos.

---

Orientador: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-orientador: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA).

## 2 ABSTRACT

SILVA, Adriano Bortolotti. **Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in a bioreactor system.** 2006. 132 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Mass propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) using bioreactor technique was tested. Four *in vitro* culture methods (solid, liquid, continuous and temporary immersion system in bioreactors) were compared. The shooting medium consisted of MS salts supplemented with 1.0 mg. L<sup>-1</sup> BAP and 0.25 mg. L<sup>-1</sup> NAA. Solid medium contained 5 or 6 g. L<sup>-1</sup> agar. The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving at 120°C and 1kg.cm<sup>-2</sup> during 20 min. Cultures were incubated at 24±1°C under cool white fluorescent tubes (40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) with a 16-h photoperiod. The bioreactor system consisted of 1-Litre containers, airflow was sterilized by passage through 0.22-µm membrane filters. Three aeration times (continuous immersion system) or immersion frequency every 2, 4 and 8-h for 3 min, were used. Temporary immersion system, with plantlets immersed for 3 min every 2-h increased the multiplication rate, height and dry weight of the plantlets after 45 days in culture. Up to 190-200 plantlets were produced in 1-Litre vessel in the temporary system bioreactor. Temporary immersion system was more efficient for mass propagation of pineapple when compared with other methods.

---

Adviser: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-adviser: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA).

### 3 INTRODUÇÃO

A produção de mudas de abacaxizeiro em larga escala e livres de patógenos tem sido um dos principais fatores limitantes para o eficiente desenvolvimento da cultura. Os métodos utilizados na propagação convencional de abacaxizeiro apresentam baixo rendimento de mudas e podem disseminar a fusariose (*Fusarium subglutinans* f. sp. *Ananas*), doença responsável por grandes perdas de produtividade no campo. As técnicas de cultura de tecidos têm apresentado vantagens em relação ao método convencional, como, por exemplo, a produção de mudas livres de fitopatógenos (Reinhardt & Cunha, 1999).

A micropropagação comercial de abacaxizeiro envolve o cultivo seqüencial em meio líquido de plântulas (micropropagação convencional) advindas de cultura de meristemas e gemas axilares (Danquita & Benega, 1997). Entretanto, o emprego comercial desta técnica é reduzido devido aos altos custos de produção, principalmente aqueles relacionados com mão-de-obra e perdas durante o processo de aclimatização (Kitto, 1997).

O cultivo de plântulas em meio líquido possibilita a automação do processo de micropropagação e, conseqüentemente, a redução dos custos relativos à mão-de-obra (Aitken-Christie, 1991; Debergh, 1988; Tisserat, 1991). Várias pesquisas utilizando sistemas de automação, principalmente o uso de biorreatores, para a micropropagação em meio líquido, têm sido relatadas (Aitken-Christie, 1991; Escalona et al., 1999; Paek et al., 2001; Tisserat, 1991). O emprego de biorreatores em cultivo líquido permite a micropropagação em larga escala (Preil, 1991), a prevenção de distúrbios fisiológicos dos brotos e a hiperidricidade (Ziv, 1999). Ainda existe a possibilidade de usar computadores no controle de sistemas de biorreatores, apresentando, dessa forma, várias vantagens sobre a micropropagação convencional em termos de automação e redução de trabalho (Levin et al., 1988; Preil et al., 1988).

Os sistemas de cultivo em biorreatores podem ser divididos em contínuos ou temporários. No sistema contínuo, os explantes ficam sempre em contato com o meio de cultura, em contrapartida, no sistema temporário, o material vegetal entra em contato com o meio de cultura de tempos em tempos, de acordo com programação prédefinida (Alvard et al., 1993 e George, 1996).

A propagação em larga escala por meio do uso de biorreatores tem sido relatada com sucesso em várias espécies, como bananeira (Alvard et al., 1993), cana-de-açúcar (Lorenzo et al., 1998), orquídea (Lee, 1999, citado por Paek et al., 2001) e abacaxizeiro (Escalona et al., 1999), apresentando taxa de multiplicação muito superior quando comparada com a micropropagação convencional.

O presente trabalho teve por objetivo comparar o comportamento *in vitro* do abacaxizeiro cultivado em diferentes sistemas de micropropagação.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

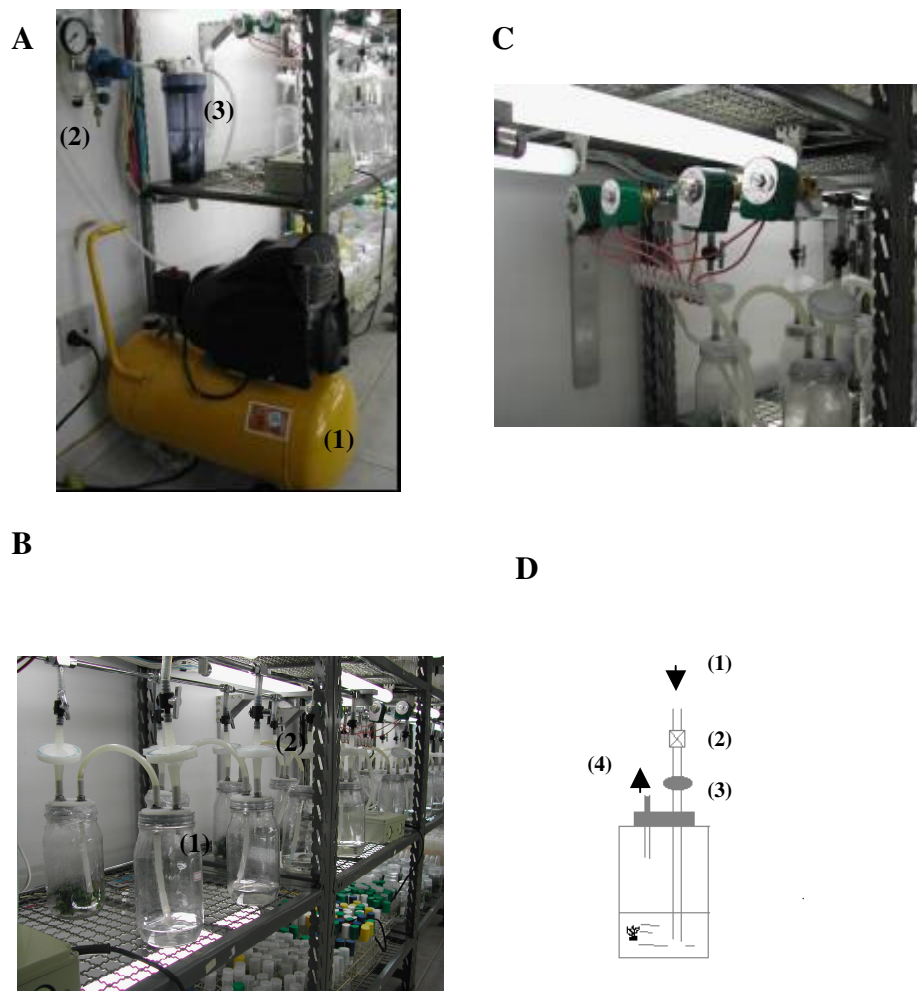
##### **Material vegetal**

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr cv. Imperial) foram obtidas a partir do estabelecimento *in vitro* de gemas axilares em meio líquido contendo os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA, acrescido de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e com pH ajustado para 5,8. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, por 60 dias, com lâmpadas brancas frias proporcionando  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com 16 horas de fotoperíodo a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **Descrição dos biorreatores**

O sistema do biorreator é constituído por dois frascos conectados por tubos de silicone; um dos frascos serve para reserva do meio de cultura e no outro ocorre o crescimento das plântulas, modelo similar ao sistema de frascos gêmeos-BIT® (Escalona et al., 1999), desenvolvido pela EMBRAPA/Cenargen (Figura 1 A, B, C), por Teixeira (2002). Num primeiro momento, a pressão de ar vinda de um compressor, esterilizado por uma membrana de 0,22- $\mu\text{m}$ , entra no frasco contendo o meio de cultura, fazendo com que o líquido chegue ao outro frasco contendo os explantes. Após um determinado tempo de imersão, ocorre a reversão do processo, fazendo com que o meio nutritivo retorne para seu frasco. A frequência e o tempo de imersão são controlados por ‘timers’ eletrônicos e válvulas solenóides, como descrito por Escalona et al. (1999). O tempo de imersão pode variar e o ar ainda promove borbulhamento do líquido e renovação da atmosfera do frasco. Este modelo constitui-se no sistema de imersão temporária.

Para a imersão contínua, foi feita uma adaptação no modelo desenvolvido pela EMBRAPA, desconectando os tubos de silicone que uniam os dois frascos gêmeos. Como cada um dos recipientes apresenta dois orifícios, um foi utilizado para entrada de ar, esterilizado por uma membrana de 0,22- $\mu\text{m}$ , enquanto o outro foi usado para saída de excesso de pressão (Figura 1 D). A entrada de ar no frasco promove a renovação da atmosfera e o borbulhamento do meio de cultura.



**FIGURA 1.** Descrição do biorreator: A – (1) compressor, (2) medidor de pressão, (3) coluna de água; B – (1) frascos gêmeos, (2) membrana 0,22- $\mu\text{m}$ ; C – válvulas solenóides; D – (1) entrada de ar, (2) válvula solenóide, (3) membrana 0,22- $\mu\text{m}$ , (4) saída de ar. UFLA, Lavras, MG, 2006.

### **Comparação entre os diferentes métodos de cultivo**

Os métodos de cultivo *in vitro* constaram: da micropropagação convencional em meio sólido (5 e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar) e em meio líquido, e da micropropagação em biorreatores de imersão contínua e temporária. Os explantes constituíram-se de plântulas mantidas *in vitro*, advindas de cultura de gemas axilares, apresentando 3,0 cm de comprimento. As plântulas foram cultivadas em meio composto pelos sais do meio MS, suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e com pH ajustado para 5,8.

Para a micropropagação convencional, em meio sólido, e líquido foram utilizados recipientes com volume de 250 ml. No cultivo em meio sólido, as plântulas cresceram nas concentrações de 5 e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Em cada recipiente contendo 30 ml de meio de cultura foram inoculados três explantes. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1 kg.cm<sup>-1</sup>, por 20 minutos.

No cultivo em biorreatores, o material vegetal foi mantido em recipientes com volume de 1.000 ml, sendo inoculados 10 explantes em 300 ml de meio de cultura. Para a imersão contínua, a aeração foi realizada em diferentes tempos: a cada 2, 4 e 8 horas, por períodos de 3 minutos. No sistema de imersão temporária, as plântulas foram imersas a cada 2, 4 e 8 horas, por períodos de 3 minutos.

### **Descrição dos tratamentos**

Os tratamentos constaram da micropropagação convencional em meio sólido, com 5 ou 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e em meio líquido (na ausência de ágar) e na micropropagação em biorreatores de imersão temporária (imersão a cada 2, 4, e 8 horas) e contínua (com aeração a cada 2, 4, 8 horas). Apresentando três tratamentos em micropropagação convencional e seis tratamentos em biorreatores, totalizando-se nove tratamentos.

### **Avaliações**

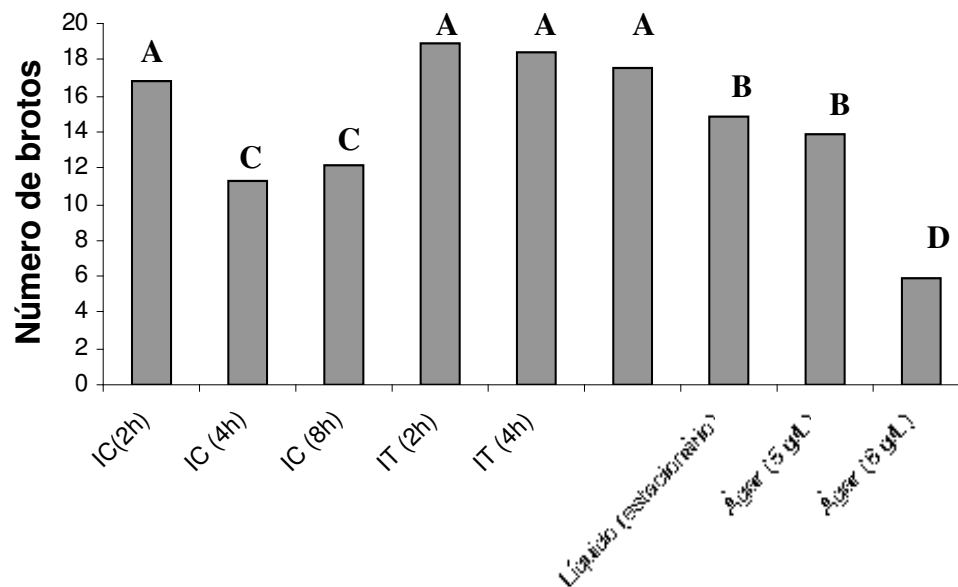
Após 45 dias de cultivo, foram realizadas avaliações nos seguintes parâmetros: número de brotos, brotações superiores a 1,0 cm, comprimento das plântulas, massa fresca e seca. O massa seca foi medida após a secagem em estufa por 5 dias a 50° C.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constando de quatro repetições e nove tratamentos. O programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado para realização das análises de variâncias (ANAVA), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

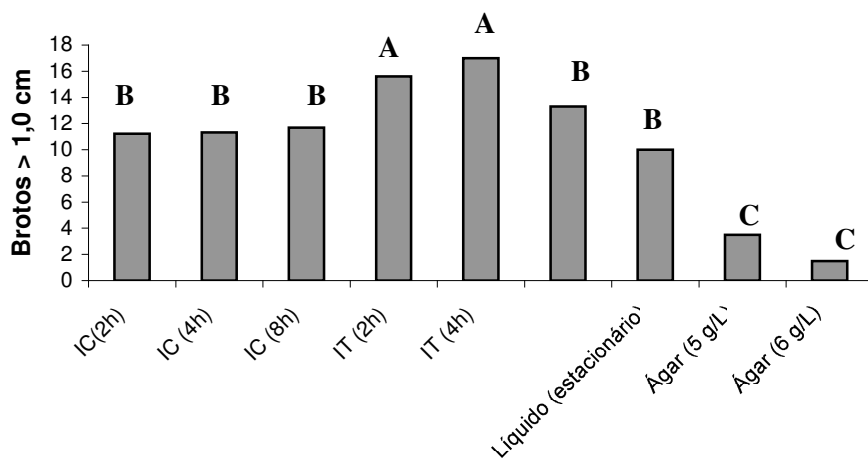
As análises de variância para todas as características avaliadas foram significativas, a 1% de probabilidade (Anexo A). O número de brotos foi afetado diretamente pelos métodos de cultivo. A imersão temporária a cada 2, 4, 8 horas e a imersão contínua a cada 2 horas apresentaram os melhores resultados, produzindo em torno de 19 brotações/explante (Figura 2 e 8 B), enquanto que o cultivo em meio sólido com 6 g.L<sup>-1</sup> apresentou o pior desempenho (Figuras 2 e 8 A). Os sistemas de cultivo em biorreatores podem apresentar proliferação de brotações em larga escala, possibilitando a automação do processo de micropropagação e reduzindo o trabalho (Preil, 1991; Paek et al., 2001; Tisserat, 1991).



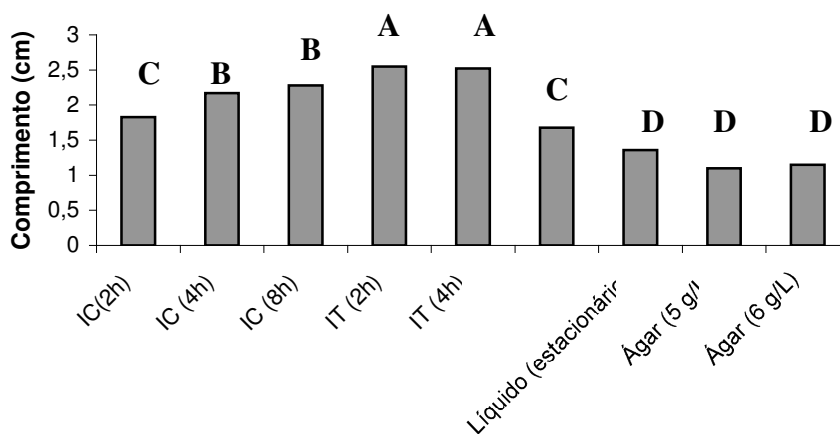
**FIGURA 2.** Número de brotos de abacaxizeiro crescendo em diferentes métodos de cultivos *in vitro*. Biorreatores: IC – imersão contínua e IT – imersão temporária; micropropagação convencional: meio líquido e meio sólido (ágar). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O emprego de sistemas de automação proporcionou taxas de multiplicação de 136% até 316 % superiores, quando comparadas aos sistemas de micropropagação convencional. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Escalona et al. (1999), os quais obtiveram altas taxas de multiplicação com o abacaxizeiro ‘Smmoth Cayenne’. Entretanto, o emprego da imersão contínua, que proporcionou razoável número de brotos, pode dobrar capacidade do biorreator – por usar somente um frasco de cultivo - quando comparado aos sistemas de imersão temporária, no qual utilizam-se dois frascos para o cultivo.

O sistema de imersão temporária, programado para funcionar a cada 2 ou 4 horas, apresentou os melhores resultados para as variáveis brotos maiores que 1,0 cm e comprimento das brotações, atingindo 17 brotos e 2,5 cm, respectivamente (Figuras 3 e 4).



**FIGURA 3.** Número de brotos de abacaxizeiro maiores que 1,0 cm, crescendo em diferentes métodos de cultivos *in vitro*. Biorreatores: IC – imersão contínua e IT – imersão temporária; micropropagação convencional: meio líquido e meio sólido (ágar). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.



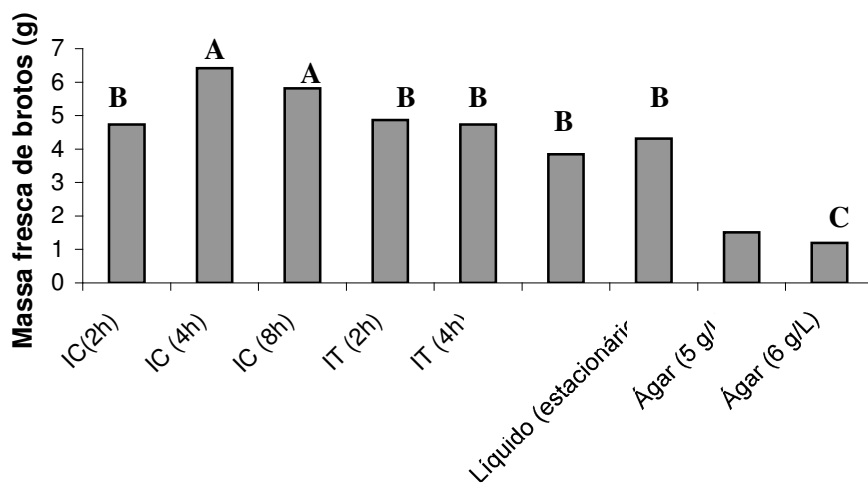
**FIGURA 4.** Comprimento de brotos de abacaxizeiro crescendo em diferentes métodos de cultivos *in vitro*. Biorreatores: IC – imersão contínua e IT – imersão temporária; micropropagação convencional: meio líquido e meio sólido (ágar). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A produção de brotos maiores do que no sistema convencional de micropropagação pode proporcionar maior sobrevivência das mudas durante o processo de aclimatização de abacaxizeiro (Escalona et al., 1999).

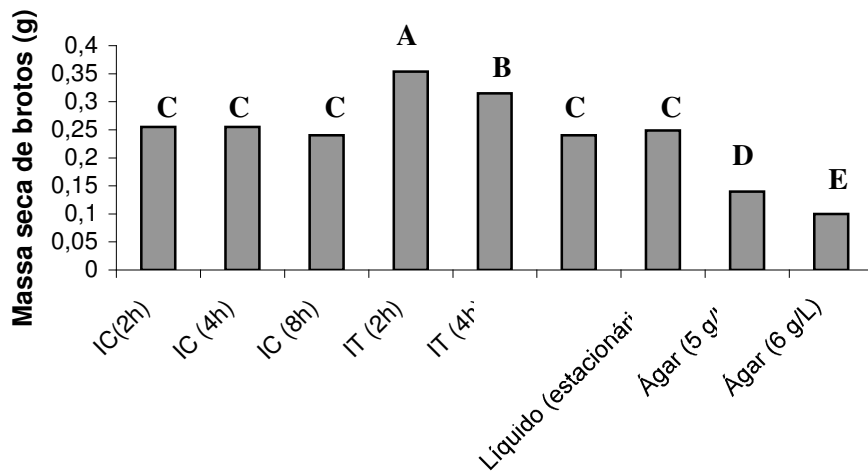
Os métodos de micropropagação convencional apresentaram baixo crescimento de plântulas (Figuras 3 e 4) e a pouca possibilidade de trocas gasosas nestes sistemas pode estar relacionada diretamente com este resultado. O volume dos frascos também interfere no crescimento das plântulas; geralmente, recipientes com volumes maiores, como no caso dos biorreatores, proporcionam melhor crescimento e multiplicação do cultivo *in vitro* (Etienne & Bertholy, 2002; Harris & Mason, 1983; Monette, 1983).

As plântulas crescendo em meio líquido em condições de imersão contínua, com aeração a cada 4 e 8 horas, apresentaram as maiores massas frescas de brotos (Figura 5). O contato contínuo dos explantes com meio de cultura pode ter promovido maior absorção de água neste sistema. Esta exposição continuada ao meio líquido pode promover distúrbios fisiológicos, como a hiperidricidade (Debergh et al., 1981; Ziv et al., 1983). O cultivo em sistemas temporários pode prevenir estas desordens pelo contato intermitente do meio de cultura com o material vegetal (Aitken-Christie & Jones, 1987).

Para massa seca de brotos (Figura 6), melhor resposta foi obtida com sistema de imersão temporária operando a cada duas horas, apresentado incremento de 100 a 250 mg, quando comparado aos sistemas de micropropagação convencional. O sistema de imersão temporária proporciona brotações mais pesadas para cana-de-açúcar, *Amelanchier x grandiflora* Rehd. ‘Princess Diana’ e abacaxizeiro (Escalona et al., 1999; Krueger et al., 1991; Lorenzo et al., 1998). Os sistemas de imersão, provavelmente, são mais apropriados para o crescimento de plântulas em cultivo líquido em biorreatores (Etienne & Bertholy, 2002; Paek et al., 2001).



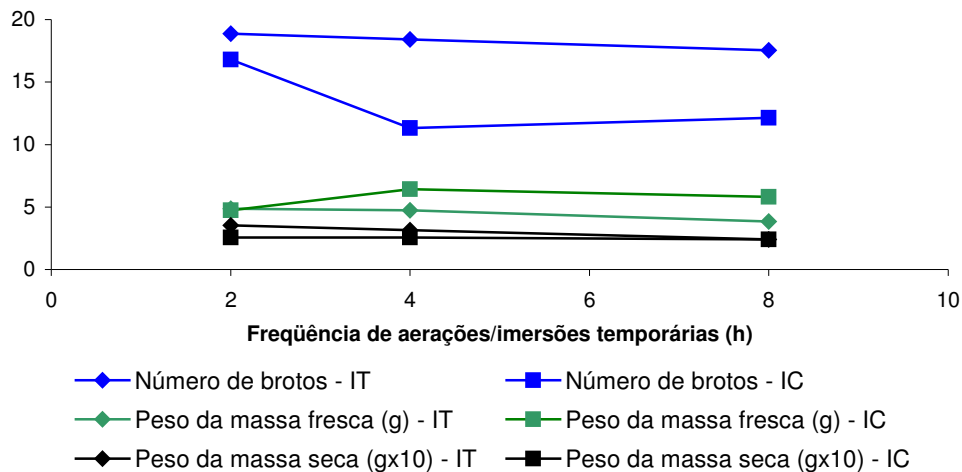
**FIGURA 5.** Massa fresca de brotos de abacaxizeiro crescendo em diferentes métodos de cultivos *in vitro*. Biorreatores: IC – imersão contínua e IT – imersão temporária; micropropagação convencional: meio líquido e meio sólido (ágar). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.



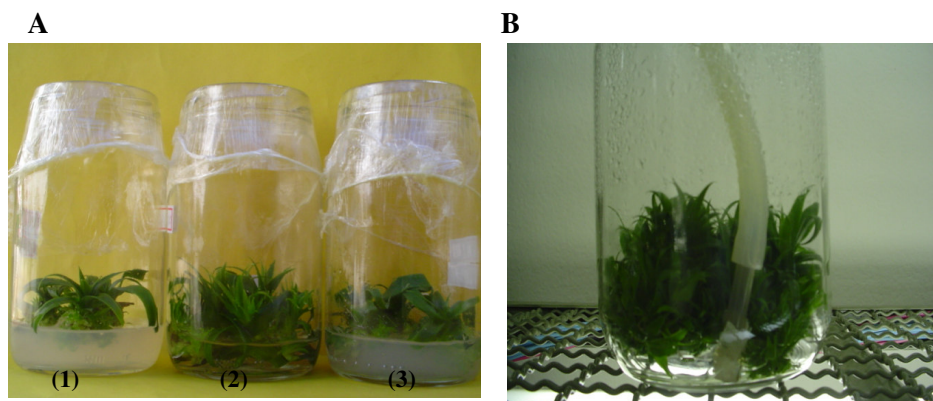
**FIGURA 6.** Massa seca de brotos de abacaxizeiro crescendo em diferentes métodos de cultivos *in vitro*. Biorreatores: IC – imersão contínua e IT – imersão temporária; micropropagação convencional: meio líquido e meio sólido (ágar). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A imersão temporária pode contornar os problemas com o crescimento de plântulas em contato permanente com meio líquido de cultivo, como, por exemplo, hiperiridicidade e asfixia (Etienne & Bertholy, 2002; Tisserat et al., 1993).

A frequência de aerações e imersões temporárias afetou diretamente o crescimento do cultivo em biorreatores (Figura 7). Os efeitos dessa frequência pareceram ser mais limitantes para a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro em biorreatores de imersão contínua, havendo tendência de queda dos números de brotos com a queda da frequência de aerações de 12 vezes por dia, para 6 e 3 vezes. A imersão contínua promoveu maior massa fresca de brotações, principalmente em menores frequências da renovação do ar nos recipientes de cultivo. Os sistemas de imersão temporária acionados a cada 2 horas promoveram brotações com maior massa seca, 47% superiores aos demais cultivos em biorreatores.



**FIGURA 7.** Frequência das aerações/imersões temporárias no número de brotos, massa fresca e seca de abacaxizeiro cultivados em diferentes biorreatores. UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 8.** A – Micropropagação convencional, (1) ágar 6 g.L<sup>-1</sup>, (2) meio líquido, (3) ágar 6g.L<sup>-1</sup>; B – Sistema de imersão temporária, com em média, 200 brotações por recipiente, cultivados por 45 dias. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Etienne & Berthouly (2002) afirmaram que em sistemas de imersão temporária, o tempo e a frequência das imersões são muito importantes e podem variar muito entre espécies diferentes.

A produção de mudas em biorreatores de imersão temporária pode reduzir os custos de produção das plantas micropropagadas de abacaxizeiro, permitindo maior acesso dos fruticultores. A redução dos custos pode ser notada no menor emprego de frascos, redução na manipulação do material, redução dos trabalhos de repicagem e aumento nas taxas de multiplicação (Chu, 1995). Escalona et al. (1999), trabalhando com micropropagação de abacaxizeiro em sistemas de imersão temporária, obtiveram 20% de redução nos custos de produção.

## 6 CONCLUSÃO

O emprego de biorreator de imersão temporária é eficiente para amicropropagação de abacaxizeiro em sistemas de cultivo líquido.

## 7 AGRADECIMENTOS

Agradecemos, de maneira especial, ao Pesquisador da EMBRAPA (Recursos Genéticos e Biotecnologia) Dr. João Batista Teixeira, por todo o suporte proporcionado na elaboração e condução do experimento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J. Automation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. J. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrech, Netherlands, 1991. p. 363-388.

AITKEN-CHRISTIE, J.; JONES, J. Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 185-196, 1987.

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Compararison of methods of liquid médium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 55-60, Jan. 1993.

CHU, I. Economic analysis of automated micropropagation. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T; SMITH, M. A. L. (Ed.). **Automation and enviromental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 19-27.

DANQUITA, M.; BENEGAS, R. Brief review of tissue culture of pineapple. **Pinepple News**, v. 3, p. 7-9, 1997.

DEBERGH, P. Improving mass propagation of in vitro plantlets. In: KOZAI, T. (Ed). **Horitculturae in high techonology era: international symposium on high techonology in protected cultivation**. Tóquio, 1988. p. 45-47.

DEBERGH, P.; HARBAOOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 53, n. 2, p. 181-187, Feb. 1981.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DANQUITA, M.; GONZALES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 9, p. 743-748, May 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 215-231, June 2002.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. Edington: Exegetics, 1993/1996. p. 810-814.

HARRIS, R. E.; MASON, E. B. Two machines for *in vitro* propagation plants in liquid media. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 63, n. 1, p. 311-316, 1983.

KITTO, S. L. Commercial micropropagation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1012-1014, Dec. 1997.

KRUEGER, S.; ROBACKER, C.; SIMONTON, W. Culture of *Amelanchier x grandiflora* in programmable micropropagation apparatus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 219-226, Nov. 1991.

LEVIN, R.; GABA, V.; TA., B.; AIRSCH, S.; DENOLA, D. Automated tissue culture for mass propagation. **Bio/Technology**, New York, v. 6, n. 9, p. 1035-1040, Sept. 1988.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 197-200, 1998.

MONETTE, P. L. Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 327-332, 1983.

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

PAEK, K. Y.; HAHAN, E. J.; SON, S. H. Application of biorreatores for large-scale micropropagation systems of plants. **In Vitro Cell Developmental Biology – Plant**, Wallingford, v. 37, n. 2, Mar./Apr. 2001.

PREIL, W. Application of bioreators in plant propagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 425-445.

PREIL, W.; FLOREK, P., WIX, U; BECK, A. Towards mass propagation by use of bioreactors. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 226, p. 99-105, 1988.

REINHARDT, D. H. R. C.; CUNHA, G. A. P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 105-138.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 24, p 36-41, jan./fev. 2002.

TISSERAT, B. Autmated systems. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry 17, high-tech and micropropagation**. Berlin: Spriger-Verlag, 1991. p. 419-431.

TISSERAT, B.; JONES, D.; GALLETTA, P. D. Construction and use of na inexpensive in vitro ultrasonic misting system. **HortTchnology**, Alexandria, v. 3, n. 1, p. 75-79, 1993.

ZIV, M. Organoigenic plant regeneration in bioreactors. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed.). **Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 673-676.

ZIV, M.; MEIR G.; HALEVY, A. H. Factors influencing the production of hardened glaucos carnation plantlets in vito. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 55-65, 1983.

## CAPÍTULO 3

### 1 RESUMO

SILVA, Adriano Bortolotti. **Luz natural e anatomia foliar de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagado**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O sistema de micropropagação sob luz solar é uma forma alternativa de recurso luminoso para o cultivo *in vitro* de abacaxizeiro. O emprego da luz natural é uma forma de modificar as estruturas foliares e de reduzir os custos da cultura de tecidos. Brotações de *Ananas comosus* L Merr cv. Imperial foram cultivadas em diferentes ambientes (sob luz artificial e natural). Plântulas cresceram em meio de multiplicação (MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e enraizamento *in vitro* (MS + 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA). Alta taxa de brotação, em meio de multiplicação, foi obtida em sala de crescimento com condições ambientais controladas de constante densidade de fótons fotossinteticamente ativo (DFFFA) de 40 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 1<sup>o</sup>C e 16 horas de fotoperíodo. Entretanto, melhor crescimento da parte aérea, sistema radicular e massa seca foi obtida, em meio de enraizamento, em cultivo incubado em ambiente não controlado com luz natural em casa de vegetação (DFFFA flutuando acima de 150 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, temperatura entre 20<sup>o</sup>C e 31<sup>o</sup>C). Análises na anatomia foliar indicaram que luz natural proporcionou maior espessura e organização dos tecidos epidérmicos e do parênquima clorofiliano e alta frequência estomática, quando comparada com a micropropagação convencional.

---

Orientador: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-orientador: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA).

## 2 ABSTRACT

SILVA, Adriano Bortolotti. **Natural light and leaf anatomy of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* L. Merr)**. 2006. 132 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Micropropagation systems using sunlight as an alternative light source for *in vitro* pineapple culture are proposed. Natural light is studied as a way of altering leaf structure and reducing tissue culture costs. Shoot tips of *Ananas comosus* L. Merr 'Imperial' were cultured in different environments (natural and artificial light). Plantlets were cultivated in multiplication medium (MS + 1.0 mg/L + 0.25 mg/L NAA) and rooting medium (MS + 0.25 mg/L NAA). The highest multiplication rates were achieved in a growth chamber providing controlled conditions of constant photosynthetic photon flux densities (PPFD) of 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with temperatures ranging from  $25 \pm 2$  °C and a 16-h photoperiod. However, better growth of aerial part, root system and dry weight were obtained with rooting medium and with cultures incubated in a non-controlled natural light greenhouse (PPFD of up to 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and temperatures ranging between 20 and 31 °C). Leaf structure analysis of the explants under natural light evidenced greater thickness and organization of epidermis and chlorenchyma tissue and high stomata density when compared with conventional micropropagation.

---

Adviser: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-adviser: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA).

### 3 INTRODUÇÃO

Novas técnicas para tornar mais eficiente a propagação *in vitro* têm sido desenvolvidas. Laboratórios têm usado sofisticados meios para regulação ambiental da temperatura, umidade, luminosidade, ventilação natural ou forçada (Cui et al., 2000; Kanechi et al., 1998; Khan et al., 2003), que proporcionam algumas vantagens para o crescimento das culturas em sistemas de micropropagação. Contudo, inovações tecnológicas nem sempre estão disponíveis e sua adoção pode representar aumento nos custos de produção das mudas nestes sistemas.

As lâmpadas fluorescentes, bastante comuns em salas de crescimento de laboratórios, são citadas em 90% dos trabalhos com pesquisas em cultura de tecidos, como a principal fonte de luz utilizada (Dooley, 1991). O custo referente à iluminação em sala de crescimento pode atingir 65% do total de gastos com energia elétrica (Standaert de Metsenaere, 1991). Este fator apresenta um dos maiores custos na produção de mudas em laboratório, sendo superado apenas pelos gastos com mão-de-obra (Doolley, 1991).

O emprego de luz natural pode ser uma forma de aproximar a micropropagação convencional e o sistema de micropropagação fotoautotrófica, ou seja, possibilitando que as plântulas cultivadas *in vitro* possam aumentar sua taxa fotossintética pela maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Kodym & Zapata-Arias, 1998; Kozai et al., 1997).

A alta irradiância pode afetar diretamente o desenvolvimento das plantas *in vitro*, apresentando efeito sobre a lamina foliar e modificando características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lichtenthaler et al., 1981; Terry et al., 1983, citados por Lee et al., 1988). O fator luz também influencia a fotossíntese, a

concentração de clorofila e a estrutura dos cloroplastos em plantas cultivadas *in vitro* (Lee et al., 1988).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do emprego da luz natural e artificial na anatomia e no crescimento *in vitro* de mudas de abacaxizeiro.

#### 4 MATERIAL E METODOS

O trabalho foi realizado na Biofábrica da Campo – Cia de Promoção Agrícola, localizada no Centro de Mandioca e Fruticultura da EMBRAPA, Cruz das Almas, Bahia.

##### **Material vegetal**

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr cv. Imperial) foram obtidas a partir do estabelecimento *in vitro* de gemas axilares em meio líquido contendo os sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com pH ajustado para 5,8. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias, com lâmpadas brancas frias proporcionando uma intensidade luminosa de 40 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, com 16 horas diárias de fotoperíodo a 25 ± 1°C.

##### **Meio de cultura**

Plântulas produzidas na etapa anterior, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, foram transferidas para dois meios de cultura diferentes. O meio de multiplicação foi constituído pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Para o

enraizamento, o meio foi composto pelos sais do MS, acrescido de 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Tanto para o meio de multiplicação como para o enraizamento, usaram-se duas concentrações de sacarose (15 e 30 g.L<sup>-1</sup>). Foram adicionados 30 ml de meio de cultura em frascos de 250 ml. Os meios de cultura foram solidificados com 1,4 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121° C e 1 kg.cm<sup>-1</sup>, por 20 minutos. Após a inoculação, os recipientes foram vedados com filme de PVC, com 10 microns.

### **Descrição ambiental do cultivo em luz artificial e natural**

As culturas foram mantidas tanto em luz natural como artificial. As condições de luz artificial foram mantidas em sala de crescimento com luz branca fria proporcionando densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, com 16 horas de fotoperíodo, a 24 ± 1°C. O cultivo sob luz natural foi mantido em estufa modelo PADFAN, coberta com Sombrite® 50% e revestidas por plástico agrícola. A DFFFA foi medida fora e dentro da estufa (Tabela 1), com IRGA (modelo ADC-LCA., Hodd., UK).

A temperatura máxima, na estufa, variou entre 27°C a 31,5°C., sendo controlada por sistema de ventilação forçada. O experimento foi instalado nos meses de janeiro e fevereiro, em pleno verão brasileiro.

**TABELA 1.** Irradiância, em DFFFA ( $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), dentro e fora da estufa utilizada no cultivo de plântulas sob luz natural. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Mês	Horário (h)	Fora da estufa ( $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Dentro da estufa ( $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
Janeiro	8	415	59
	9	560	71
	10	2.700	317
	11	1.224	148
	12	1.040	115
	14	2.365	166
	15	2.140	180
	16	1.720	120
Fevereiro	8	1.370	95
	9	1.212	94
	10	2.012	222
	11	2.875	441
	12	2.140	210
	14	1.600	70
	15	2.412	165
	16	1.862	68
	17	1.370	94

Dados obtidos em dia claro dos meses de janeiro e fevereiro, no Centro de Mandioca e Fruticultura da EMBRAPA, Cruz das Almas, Bahia.

### **Características anatômicas**

As plântulas utilizadas nos estudos anatômicos foram coletadas e conservadas em álcool 70° GL. Os cortes das seções foliares foram realizados à mão livre. As seções transversais, foram clarificadas em solução a 1% de hipoclorito de sódio e, em seguida, lavadas em água destilada e coradas com o corante azul de astra-safranina. As lâminas foram montadas em glicerina 50%, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). A partir das seções transversais, com o auxílio de ocular micrométrica, foram realizadas medições da espessura dos tecidos no terço mediano de cada folha.

Os cortes paradérmicos foram realizados na face abaxial, na região mediana das folhas e a safranina hidroalcoólica 1% foi usada como corante na montagem das lâminas. A frequência estomática foi obtida por meio do emprego de câmara clara, em microscópio OLYMPUS CBB, de acordo com a técnica de Laboriau et al. (1961). O diâmetros polar e equatorial do estômato foram obtidos com emprego de ocular micrométrica. As fotomicrografias foram realizadas utilizando-se um fotomicroscópio OLYMPUS BX – 60.

### **Avaliações**

Após 60 dias de cultivo, foram realizadas avaliações com base nas seguintes características: número de brotos, brotações superiores a 1,0 cm, comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular e massa seca total. A massa seca foi medida após a secagem em estufa, por 10 dias, a 50° C. As características anatômicas foram analisadas em termos de espessura da epiderme da face adaxial, parênquima aquífero e clorofiliano, epiderme da face abaxial, espessura total, número de feixes vasculares, número de estômatos, diâmetros polar e equatorial de estômatos.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

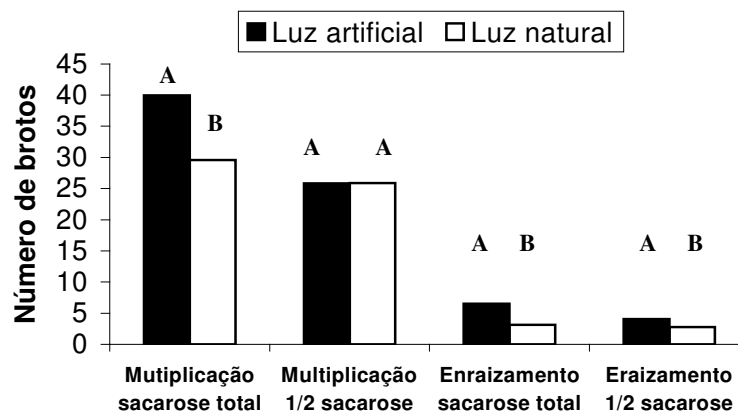
O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de luz (artificial e natural), meio (multiplicação e enraizamento) e sacarose (total e metade), compondo um 2x2x2, totalizando 8 tratamentos com 4 repetições para as variáveis fitotécnicas e 5 repetições para as características anatômicas. O programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado para a realização das análises de variâncias (ANAVA), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Crescimento *in vitro***

O número de brotações foi afetado diretamente pelo fator luz (Anexo B). Altas taxas de multiplicação foram obtidas em meio de cultura de multiplicação suplementado com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose em luz artificial, atingindo 40 brotações, em média. Nas mesmas condições, a luz natural promoveu queda de 60% no número de brotos (Figuras 1 e 3A).

Em meio de multiplicação suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, não houve diferença entre o crescimento das plântulas em ambiente de luz artificial e natural. Entretanto, comparando-se o ambiente com luz natural em meio de cultura de multiplicação, concluiu-se que a redução da concentração da sacarose não promoveu queda significativa no número de brotações (Figuras 1 e 3B). Isso evidencia que, em condições de alta irradiância, não é necessário o emprego de altas concentrações de sacarose, porém, em condições de luz artificial, o fator sacarose é mais limitante.



**FIGURA 1.** Número de brotos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em função da luz, concentração de sacarose e meios de cultura. Sacarose total ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 1/2 sacarose ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Como já era esperado, a multiplicação em meio de cultura contendo somente auxinas seria baixo, apresentando de 2 a 4 brotos por explante. Esta multiplicação pode ser explicada pelo balanço hormonal endógeno das plântulas. A luz natural promoveu maior taxa de multiplicação de bananeira ‘Grande Naine’ *in vitro* (Kodym & Zapata-Arias, 1998), porém, este desempenho, em número de brotos, não foi observado neste trabalho com abacaxizeiro.

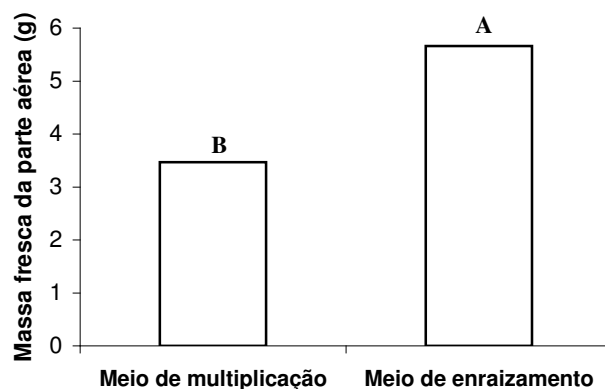
A altura das plântulas foi influenciada pela interação tanto dos fatores luz e sacarose como luz e meios de cultura (Anexo B). A luz natural produziu plântulas mais altas em qualquer dosagem de sacarose e, principalmente, em meio de enraizamento (Tabela 2 e Figura 3 CD). BAP apresenta efeito conhecido de nanismo em plântulas crescendo *in vitro*, sendo necessário uma fase de cultivo na ausência desse regulador ou com auxinas, antes da aclimatização, para o enraizamento das brotações. A altura das plantas *in vitro* de abacaxizeiro está relacionada diretamente com a sua sobrevivência *ex vitro* e plântulas mais altas sobrevivem mais na aclimatização (Escalona et al., 1999).

**TABELA 2** Altura das plântulas de abacaxizeiro crescendo em função de luz, sacarose e meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>ALTURA (cm)</b>				
<b>Luz</b>	<b>Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/2 Sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Meio multiplicação</b>	<b>Meio enraizamento</b>
<b>Artificial</b>	<b>2,79 Bb</b>	<b>2,55 Bb</b>	<b>1,30 Ab</b>	<b>5,04 Ba</b>
<b>Natural</b>	<b>3,72 Aa</b>	<b>3,85 Aa</b>	<b>0,80 Bb</b>	<b>6,80 Aa</b>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a de 5% probabilidade.

O meio de enraizamento proporcionou formação de plântulas muito mais pesadas que no meio de multiplicação (Figura 2). As plântulas crescendo sob luz artificial com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram maior massa fresca da parte aérea. Novamente, não houve diferença quanto ao emprego das diferentes concentrações de sacarose no cultivo de plântulas sob luz natural (Tabela 3).



**FIGURA 2.** Massa fresca da parte aérea de plântulas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* em função dos tipos de meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

**TABELA 3** Massa fresca da parte aérea de plântulas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* em função dos tipos de meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2006.

<b>MASSA FRESCA DA PARTE AÉREA (g)</b>		
<b>Luz</b>	<b>Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/2 Sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Artificial</b>	<b>5,81 Aa</b>	<b>3,60 Bb</b>
<b>Natural</b>	<b>4,46 Ba</b>	<b>4,37 Aa</b>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Maior comprimento do sistema radicular foi observado com o emprego de meio de enraizamento com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, atingindo 2,93 cm (Tabela 4). Massa fresca do sistema radicular apresentou o melhor desempenho em condições de luz natural, em meio de enraizamento e com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 5). A redução ou, até mesmo, a eliminação completa da sacarose do meio de enraizamento devem ser utilizadas com a finalidade de facilitar a passagem das plântulas do estágio heterotrófico para o autotrófico na fase de aclimatização (Debergh, 1988).

**TABELA 4.** Comprimento do sistema radicular das plântulas de abacaxizeiro em função de sacarose e meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2006.

<b>COMPRIMENTO DO SISTEMA RADICULAR (cm)</b>		
<b>Meio</b>	<b>Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/2 Sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Multiplicação</b>	<b>0,22 Ba</b>	<b>0,19 Ba</b>
<b>Enraizamento</b>	<b>1,68 Ab</b>	<b>2,93 Aa</b>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

**TABELA 5.** Massa fresca do sistema radicular das plântulas de abacaxizeiro crescendo em função de luz, sacarose e meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2006

<b>MASSA FRESCA DO SISTEMA RADICULAR (g)</b>				
<b>Meio</b>	<b>Luz artificial</b>	<b>Luz natural</b>	<b>Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1/2 Sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Multiplicação</b>	<b>0,049 Ba</b>	<b>0,054 Ba</b>	<b>0,05 Ba</b>	<b>0,05 Ba</b>
<b>Enraizamento</b>	<b>0,44 Ab</b>	<b>0,61 Aa</b>	<b>0,48 Ab</b>	<b>0,57 Aa</b>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Aldeberg et al. (1999), trabalhando com meloeiro *in vitro*, não observaram diferenças no comprimento das brotações quando se comparou o cultivo fotoautotrófico (ausência de sacarose) com a micropropagação convencional (fotomixotrófica). Entretanto, o enraizamento *in vitro* foi maior em cultivos na presença de sacarose.

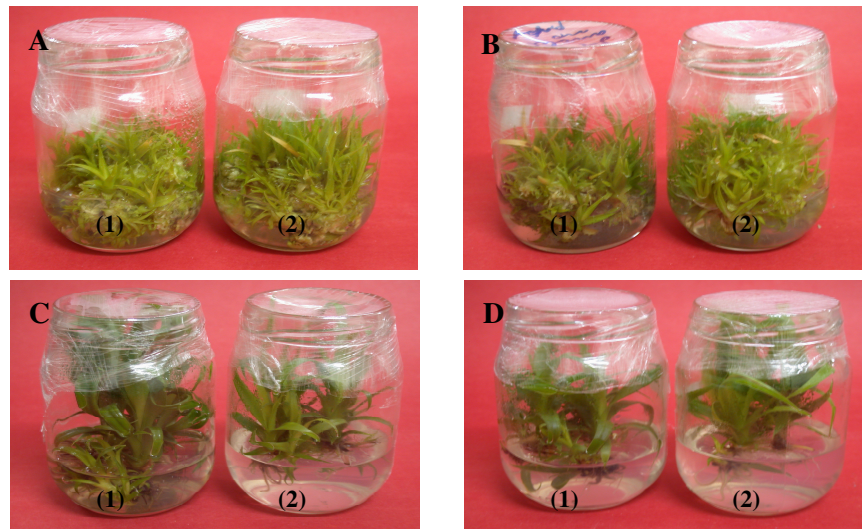
Maior massa seca das plântulas foi obtida com luz natural e em meio de enraizamento com 30 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 6). A sacarose é importante fonte de carbono para o cultivo *in vitro* (George, 1993), entretanto, em cultivos fotoautotróficos, ela tem sido considerada dispensável, pois, as plântulas apresentam maior desempenho na sua ausência. Neste trabalho, houve um cultivo fotomixotrófico. Apesar das plantas cultivadas terem sacarose disponível, principalmente para o crescimento em termos de altura, massa fresca e seca, a luz natural (em estufa) ou a alta irradiância promoveram desempenho superior, comparado às condições de sala de crescimento (luz artificial) ou de baixa intensidade luminosa. Possivelmente, isto se deve ao aumento da taxa fotossintética, o que aproxima este cultivo das condições fotoautotróficas. Os benefícios da alta irradiância têm sido demonstrados em cultivos fotoautotróficos para muitas espécies, como

batata (Kozai et al., 1988), arroz (Seko & Nishimura, 1996), eucalipto (Khan et al., 2003) e café (Nguyen et al., 2001).

**TABELA 6.** Massa seca total das plântulas de abacaxizeiro em função da luz, sacarose e meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>MASSA SECA TOTAL (g)</b>				
<b>Sacarose</b>	<b>Luz artificial</b>	<b>Luz natural</b>	<b>Meio multiplicação</b>	<b>Meio enraizamento</b>
<b>Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,23 Ab</b>	<b>0,36 Aa</b>	<b>0,24 Ab</b>	<b>0,35 Aa</b>
<b>Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,15 Ba</b>	<b>0,18 Ba</b>	<b>0,14 Bb</b>	<b>0,19 Ba</b>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.



**FIGURA 3.** Fotos das plântulas de abacaxizeiro crescendo em diferentes ambientes e meios de cultura. **A** – (1) Luz artificial/(2) luz natural (multiplicação com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose); **B** – (1)Luz artificial/(2) luz natural (multiplicação com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose); **C** – (1)Luz artificial/(2) luz natural (enraizamento com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose); **D** - (1)Luz artificial/(2) luz natural (enraizamento com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O crescimento *in vitro* de materiais vegetais em estufa pode reduzir os estresses do transplântio para o substrato. Na estufa, o cultivo *in vitro* já está parcialmente na mesma condição ambiental da fase de aclimatização e isto pode ser benéfico às espécies que apresentam baixa taxa de sobrevivência na transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*, principalmente espécies frutíferas.

### Características anatômicas

Houve influência dos fatores estudados nas características anatômicas (Anexo B). O emprego de luz natural promoveu maior espessura da epiderme da face adaxial, em meio de cultura com 15 ou 30 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 7 e Figura 6). A espessura da epiderme também foi influenciada pelo meio de cultura, tendo o melhor desempenho em meio de multiplicação com 15 g.L<sup>-1</sup>. Da mesma maneira, a luz natural promoveu maior espessura da epiderme da face abaxial, tanto no meio de cultura de enraizamento como no de multiplicação.

**TABELA 7.** Espessura da epiderme da face adaxial, em função da luz e sacarose e do meio de cultura e sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2006.

EPIDERME ADAXIAL (µm)				
Sacarose	Luz artificial	Luz natural	Multiplicação	Enraizamento
Sacarose total (30 g.L <sup>-1</sup> )	21,14 Bb	30,44 Aa	26,24 Ba	25,35 Aa
Sacarose total (30 g.L <sup>-1</sup> )	23,68 Ab	29,77 Aa	28,51 Aa	24,13 Ab

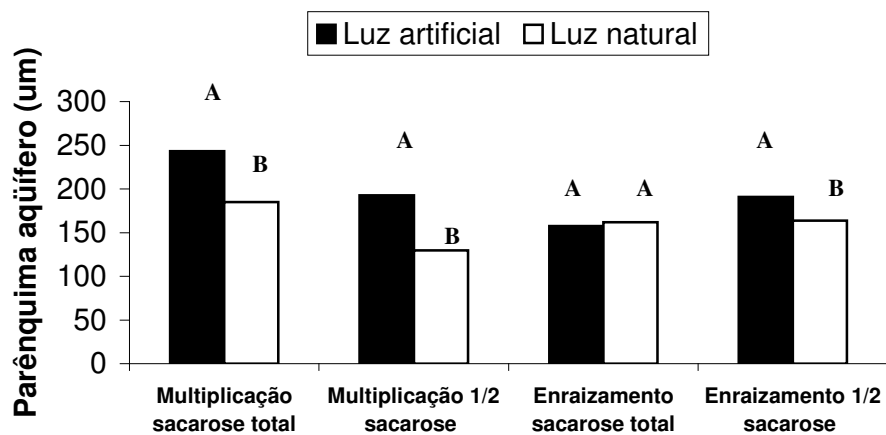
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

**TABELA 8.** Espessura da epiderme da face abaxial, em função da luz e sacarose e do meio de cultura e sacarose. UFLA, Lavras, MG, 2006.

EPIDERME ABAXIAL ( $\mu\text{m}$ )		
Luz	Multiplicação	Enraizamento
Artificial	19,49 Ba	11,21 Bb
Natural	21,36 Aa	15,99 Ab

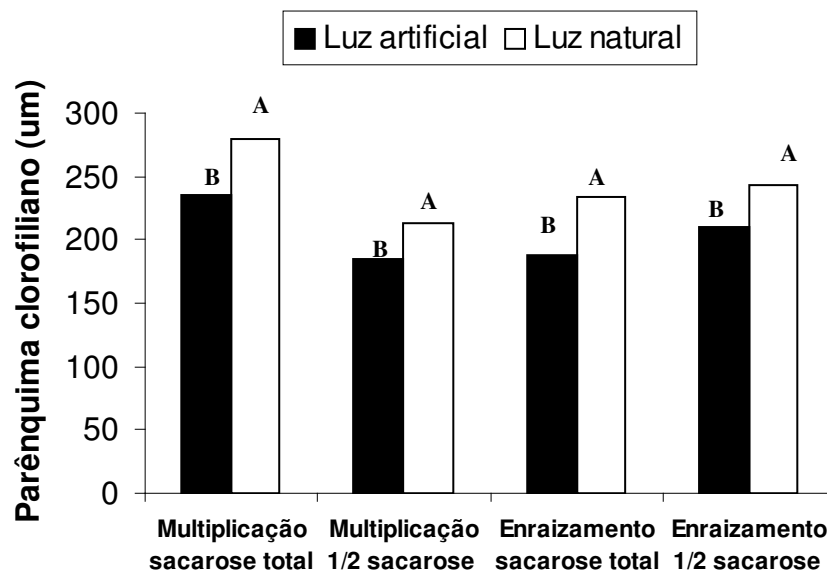
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5%.

De maneira geral, o parênquima aquífero mostrou-se mais espesso em condições de luz artificial do que em luz natural, com exceção em meio de enraizamento com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose (Figura 4 e 6). Provavelmente, o efeito do fator luz artificial (baixa irradiância), combinado com temperaturas amenas verificadas na sala de crescimento, proporcionou maior acúmulo de água por este tecido especializado.

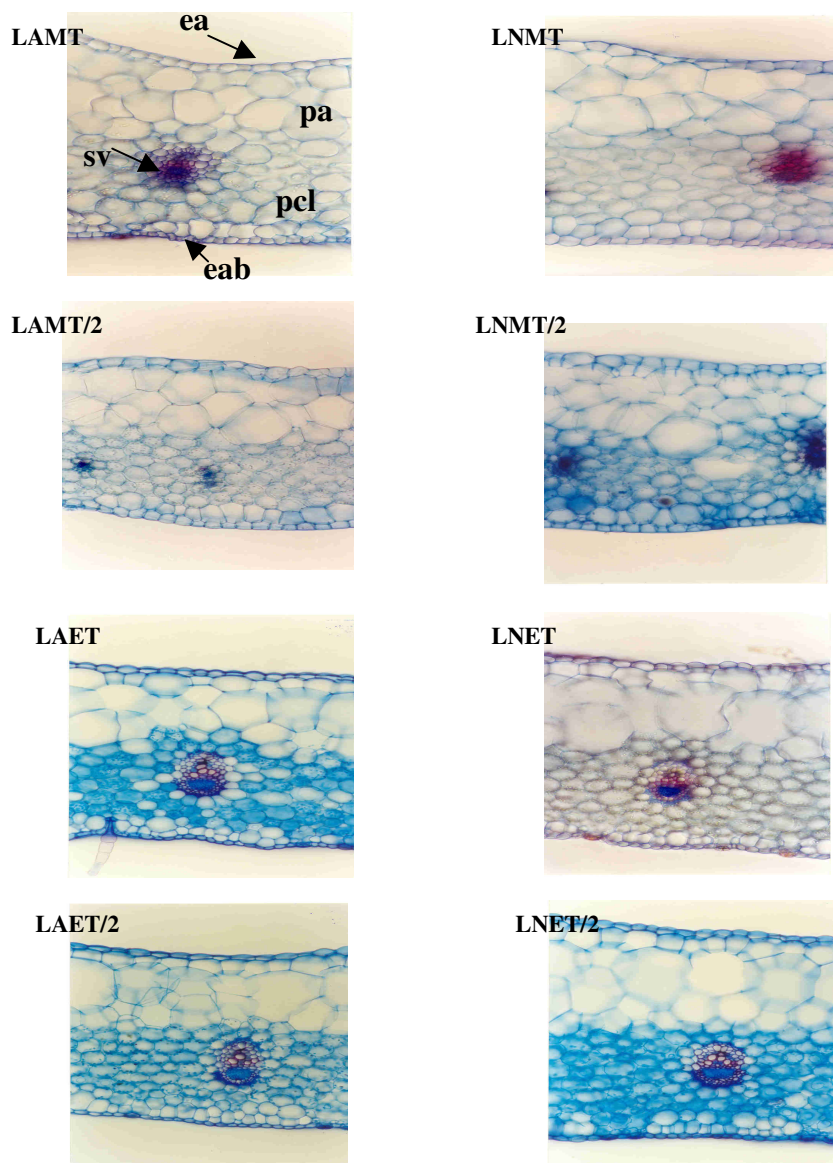


**FIGURA 4.** Parênquima aquífero de abacaxizeiro cultivados *in vitro*, em função da luz, sacarose e meios de cultura. Sacarose total ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 1/2 sacarose ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O parênquima clorofiliano (Figura 5), tecido responsável pela fotossíntese, apresentou maior desenvolvimento em plântulas crescendo em condições de luz natural, em todos os meios cultura testados (Figura 6). Este desempenho pode representar, para estas plântulas, maior capacidade fotossintética (Araus et al., 1986) e menor estresse na passagem da condição heterotrófica e fotomixotrófica para a autotrófica, exigida durante o processo de aclimatização. Maior desenvolvimento de parênquima paliçádico foi observado em gardênia cultivada *in vitro*, em altos níveis de irradiância durante o enraizamento (Serret et al., 1996). Em meio de enraizamento com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e com as plântulas crescendo sob luz natural, observou-se grande quantidade de cloroplastídeos (Figura 6 – LNET).



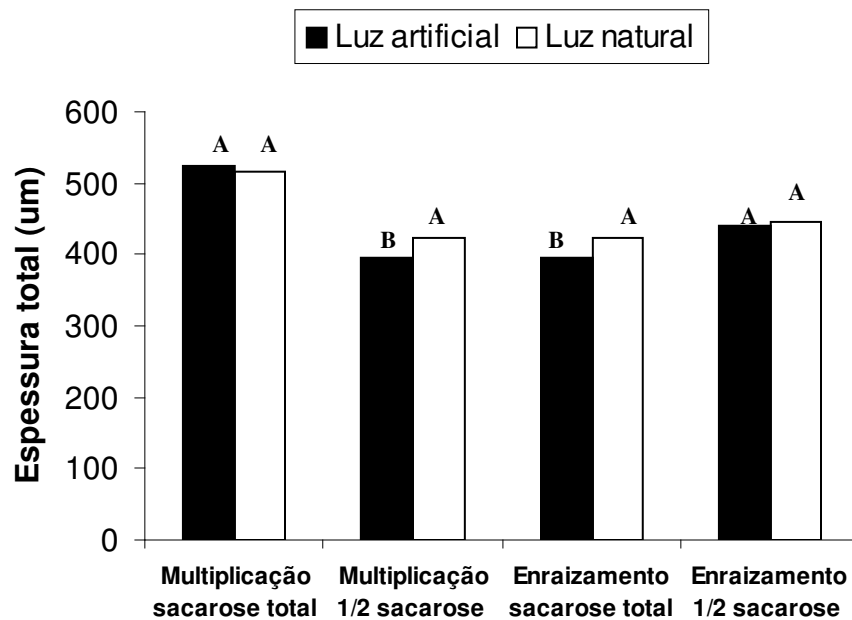
**FIGURA 5.** Parênquima clorofiliano de abacaxizeiro cultivado *in vitro*, em função da luz, sacarose e meios de cultura. Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>) e 1/2 sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>).UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 6** – Seções transversais de folhas de *in vitro* de abacaxizeiro. **LA** – Luz artificial; **LN** – Luz natural; **MT** – Multiplicação sacarose total (30g.L<sup>-1</sup> de sacarose); **MT/2** – Multiplicação metade sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>); **ET** – Enraizamento sacarose total (30g.L<sup>-1</sup> de sacarose); **ET/2** – Enraizamento metade sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>); **pa** (parênquima aquífero); **pcl** (parênquima clorofiliano); **ea** (epiderme adaxial); **eab** (epiderme abaxial); **sv** (sistema vascular). UFLA, Lavras, MG, 2006.

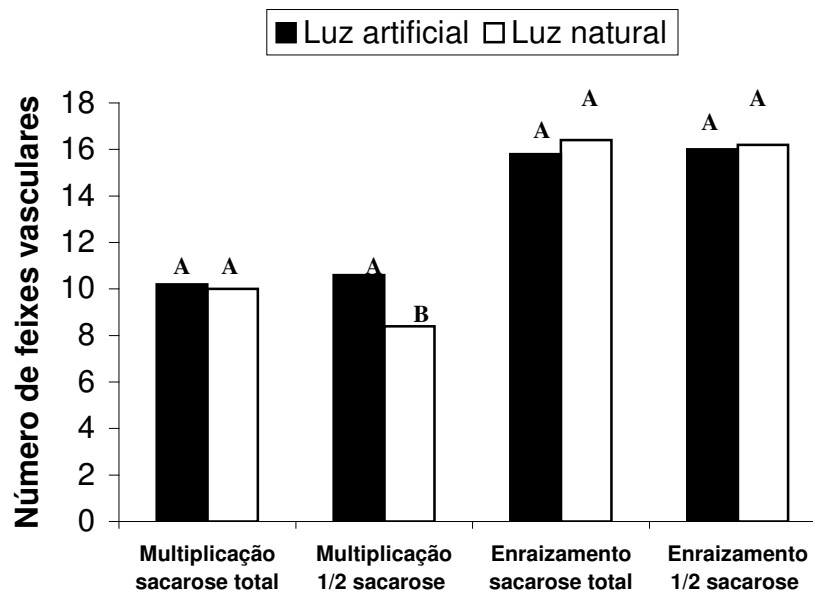
Dimassi-Theriou & Bosabalís (1996) observaram em cultivo fotomixotrófico de *Actinidea deliciosa* sob alta irradiância ( $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), que de maneira geral, as células do parênquima paliçádico e da epiderme adaxial são maiores. No presente trabalho também se observou que as células da epiderme adaxial eram maiores. Entretanto, não foi notada nenhuma tendência clara com relação ao tamanho ou formato das células do parênquima clorofiliano de plântulas, crescendo *in vitro*, de abacaxizeiro.

Maior espessura foliar foi observada em meio de multiplicação com 15 g.L<sup>-1</sup> e meio de enraizamento com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, em ambos os casos com as plântulas crescendo em luz natural (Figura 6 e 7).



**FIGURA 7.** Espessura das folhas de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em função da luz, sacarose e meios de cultura. Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>) e 1/2 sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Para os demais tratamentos, não houve efeito dos fatores em estudo. O aumento da espessura das folhas e células paliçádicas mais alongadas constituem um padrão clássico de resposta e adaptação das plantas à alta irradiância (Lee et al., 2000) e evidenciam a plasticidade adaptativa do cultivo de abacaxizeiro *in vitro* nestas condições.



**FIGURA 8.** Número de feixes vasculares de abacaxizeiro cultivado *in vitro*, em função da luz, sacarose e meios de cultura. Sacarose total (30 g.L<sup>-1</sup>) e 1/2 sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O número de feixes vasculares foi bem mais expressivo em meio de cultura de enraizamento, não havendo diferença entre a exposição ao fator luz (Figura 8). BAP influenciou negativamente o número de feixes condutores fazendo com que apresentassem desordens morfológicas. Este comportamento tem sido relatado (Preece & Sutter, 1991), principalmente em relação às citocininas (Figura 6). Em meio de enraizamento, os vasos condutores têm estrutura semelhante à das plantas desenvolvidas no campo.

O número de estômatos por  $\text{mm}^2$ , em seções paradérmicas de folhas de abacaxizeiro *in vitro*, foi maior na presença de luz natural, com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, quando comparado com o obtido sob luz artificial (Tabela 9). Sun et al. (1995) afirmam que os estômatos são estruturas fundamentais para as plantas porque, através deles, ocorrem os processos de trocas gasosas. Portanto, qualquer variação no número e ou tamanho destes pode acarretar maior ou menor eficiência das plântulas, quanto à taxa fotossintética.

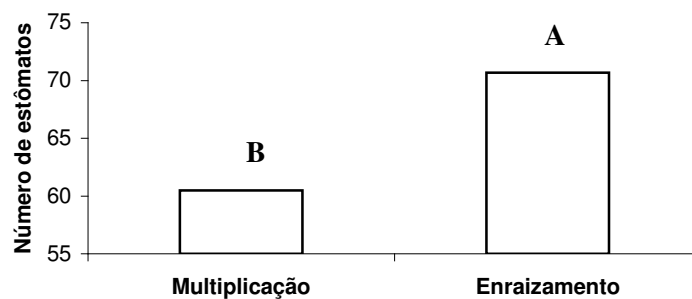
**TABELA 9.** Número de estômatos por  $\text{mm}^2$  em diferentes tipos de luminosidade e concentrações de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2006.

<b>NÚMERO DE ESTÔMATOS/ <math>\text{mm}^2</math></b>		
<b>Luz</b>	<b>Sacarose total (<math>30 \text{ g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>1/2 Sacarose (<math>15 \text{ g.L}^{-1}</math>)</b>
<b>Artificial</b>	<b>64,01 Ba</b>	<b>66,60 Aa</b>
<b>Natural</b>	<b>68,82 Aa</b>	<b>62,90 Ab</b>

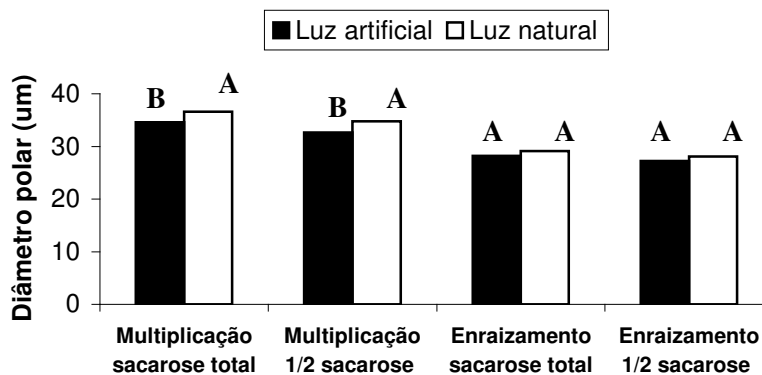
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

O número de estômatos por  $\text{mm}^2$  foi maior em meio de cultura de enraizamento (Figura 9). Existe um aumento no número de estômatos/ $\text{mm}^2$  nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, quando comparado às de plantas que crescem em outros ambientes (Brainerd & Fuchigami, 1991; Khan et al., 2003; Lee et al., 1988; Sciuti & Morini, 1995). Entretanto, em plantas no campo, estudos têm demonstrado que sob alta irradiância, a frequência de estômatos por unidade superficial da folha é alta (Ashton & Turner, 1979; Bjorkman & Holmgren, 1963; Medri & Lleras, 1980). Capellades et al. (1990) encontraram maiores densidades estomáticas em plântulas cultivadas em meio de enraizamento com alta irradiância, o que também foi observado no presente trabalho.

Não houve efeito significativo para diâmetro equatorial dos estômatos crescendo nos diferentes ambientes de cultivo (Anexo B), apresentando 23,47  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em média. Maiores diâmetros polares dos estômatos foram observados em plântulas crescendo em meio de multiplicação (Figura 10); em meio de enraizamento não houve efeito significativo da luz, apesar dos dados mostrarem tendência da luz natural apresentar maiores diâmetros polares.



**FIGURA 9.** Número de estômatos/ $\text{mm}^2$  de abacaxizeiro cultivados, *in vitro*, em função dos meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 10.** Diâmetro equatorial dos estômatos de abacaxizeiro cultivado *in vitro*, em função da luz, sacarose e meios de cultura. Sacarose total ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e 1/2 sacarose ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O estômato do abacaxizeiro é classificado como tetracítico, sendo envolvido por 4 células subsidiárias, duas paralelas as células-guarda, e o par restante polar. Segundo Alquini et al. (2003), o par de células subsidiárias polares é frequentemente menor e o estômato tetracítico é característico em várias famílias de monocotiledôneas.

De acordo com Khan et al. (2003), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionamento normal. Entretanto, a reduzida funcionalidade do estômato e a alta frequência estomática têm sido as principais causas da alta condutância foliar inicial e da rápida dessecação das plantas micropropagadas após a transferência (Diaz-Perez et al., 1995; Sciutti & Morini, 1995). Embora o número de estômatos/mm<sup>2</sup> aumente sob luz natural, a capacidade de resposta dos estômatos às variáveis ambientais pode ser mais importante para a determinação da condutância foliar do que a frequência dos estômatos (Kozłowski et al., 1991).

## 6 CONCLUSÕES

O emprego de luz natural na micropropagação de abacaxizeiro é viável, principalmente, na fase de enraizamento, por produzir plântulas maiores e mais adaptadas anatomicamente ao processo de aclimatização.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELBERG, J.; FUJIWARA, K.; KIRDMANEE, C.; KOZAI, T.  
Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 95-104, 1999.

ALQUINI, Y. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. p. 87-127.

ARAUS, J. L.; ALEGRE, L.; TAPIA, L.; CALAFELL, R.; SERRET, M. D. Relationship between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 73, n. 12, p. 1760-1770, Dec. 1986.

ASHTON, D. H.; TURNER, J. S. Studies on the light compensation point of *Eucalyptus regnans* Muell. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 27, n. 5, p. 289-607, 1979.

BJORKMAN, O.; HOLMGREN, P. Adaptability of the photosynthetic apparatus to light in ecotypes from exposed and shaded habitats. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 889-915, Apr. 1963.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1991.

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

CUI, Y. Y.; HAHN, E. J.; KOZAI, T.; PAEK, K. J. 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**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 219-226, 2000.

DEBERGH, P. Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. In: KOZAI, T. (Ed). **Horticulturae in high technology era: international symposium on high technology in protected cultivation**. Tóquio, 1988. p. 45-47.

DIAZ-PEREZ, J. C; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of in vitro-formed roots and acclimatization on water status and gas exchanges of tissue culture apple shoots. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 3, p. 435-440, May 1995.

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 Culture**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1996.

DOOLEY, J. H. Influence of lighting spectra on plant tissue. In: METTING OF AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS, 1991, Chicago. **Proceedings...** Chicago: [S. n. ], 1991.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DANQUITA, M.; GONZALES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 9, p. 743-748, May 1999.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

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

KANECHI, M.; OCHI, M.; ABE, M; INAGAKI, N; MAEKAWA, S. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of Cauliflower plantlets cultured in vitro photoautotrophically and photomixotrophically. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, 1998.

KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUNYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

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. 141-145, 1998.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 230, p. 121-127, 1988.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

KOZLOWSKI, T.; KRAMER, P. I.; PALLARDY, S. G. **The physiological ecology of woods plants**. London: Academic, 1991. 657 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal vegetal**. Seropédica: [S. n. ],, 1997. 198 p.

LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABORIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1/2, p. 237-257, jun. 1961.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSO, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; 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.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. reports improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, n. 3, p. 637-641, 1985.

MEDRI, M. E.; LLERAS, S. E. Ecofisiologia de plantas da Amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanheira do Pará) – Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 9, n. 1, p. 15-23, mar. 1980.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiology Plant**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; HEO, J.; THAI, D. X. Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffe plantlets to ventilation methods and photosyntetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 215-225, 2001.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation – technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p 71-93.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets by relative humidity during rooting in vitro. **Journal of Horticultural Science**, Ahsford, v. 70, n. 2, p. 221-228, Mar. 1995.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO<sub>2</sub> and light on survival and growth of rice regenerants growth in vitro on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 257-264, 1996.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. Development of photoautotrophic and photoinhibition of *Gardênia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 1-16, Apr. 1996.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation – technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

SUN, O. J. et al. Physiological responses to water and waterlogging in nothofagus species. **Tree Physiology**, Victoria, v. 15, n. 10, p. 629-638, 1995.

## CAPITULO 4

### 1 RESUMO

SILVA, Adriano Bortolotti. **Aclimatização e anatomia foliar de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr), a partir do cultivo *in vitro* sob luz natural**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Aclimatização é considerada a fase mais limitante da micropropagação. O enraizamento *in vitro* sob luz natural pode proporcionar melhor estrutura foliar das plântulas micropropagadas e pouco estresse devido à transferência do cultivo *in vitro* para o *ex vitro*. Brotações de *Ananas comosus* cv. Imperial foram cultivadas em diferentes condições ambientais (luz artificial e natural). Após dois meses de cultivo *in vitro*, plântulas foram transferidas para substrato comercial (Plantmax®) em casa de vegetação. Anatomia foliar e crescimento das plantas foram avaliados em diferentes tempos (0, 7, 15, 30 e 60 dias) do processo de aclimatização. A partir do cultivo *in vitro* sob luz natural (irradiância flutuando acima de 100 Watt.m<sup>-2</sup>, temperatura entre 14<sup>o</sup>C e 39,5<sup>o</sup>C) foram produzidas plântulas aclimatizadas significativamente mais altas, com sistema radicular funcional e maior massa seca. Além disso, as folhas que se desenvolveram nestas condições apresentaram aumento na espessura e organização do mesofilo, maior número de cloroplastos nas células, estômatos funcionais e reduzida perda de água quando submetidas a condições ambientais severas. Os resultados deste estudo indicam que a alta intensidade luminosa, da micropropagação sob luz natural, pode aumentar a capacidade da regulação da perda de água pela planta, favorecendo o crescimento após a transferência para o ambiente natural.

---

Orientador: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-orientador: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA).

## 2 ABSTRACT

SILVA, Adriano Bortolotti. **Acclimatization and leaf anatomy of pineapple (*Ananas comosus* L Merr) *in vitro* plantlets rooted under natural light**. 2006. 132 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Acclimatization is the most limiting phase in the micropropagation process. *In vitro* rooting under natural light results in better leaf structure of the micropropagated plantlets which reducing the stress caused by high temperatures and low relative humidity when transferring the seedlings from *in vitro* to *ex vitro* environment. Shoot tips of *Ananas comosus* ‘Imperial’ were cultured in different *in vitro* environments (artificial and natural light). After 2-months of culture, plantlets were transferred to plastic trays containing commercial substrate (Plantmax®) inside a greenhouse. Leaf structure and growth of the plantlets were evaluated in different times (0, 7, 15, 30 and 60-days) of acclimatization. Under natural light culture (irradiance of up to 100 watt.m<sup>-2</sup>, temperatures ranging from 14 to 39.5<sup>0</sup>C), the results were significantly taller plantlets with a functional root system and greater dry weight. In addition, the leaves that developed under this natural environmental condition presented increase in thickness and organization to mesophil, larger number of chloroplasts in the cell, stomata with characteristic functional shapes, and reduced water loss when submitted to severe atmospheric stress. The results of this study indicate that high light intensity (micropropagation under natural light) can increase the ability to regulate plant water loss, favoring growth after the transfer to natural environment.

---

Adviser: Moacir Pasqual (DAG/UFLA); Co-adviser: Evaristo Mauro de Castro (DBI/UFLA).

### 3 INTRODUÇÃO

A aclimatização de plântulas é considerada uma das fases mais limitantes da micropropagação. O estresse hídrico tem sido relatado como a principal causa de choque no transplântio, tendo como resultado a perda excessiva de água pelas plântulas (Brainerd & Fuchigami, 1991). A alta umidade relativa do recipiente de cultivo (próxima de 100%) e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura e funcionamento dos tecidos, causando a baixa capacidade das mudas produzidas *in vitro* de controlar a perda de água, quando submetidas às condições do ambiente natural, com aumento da demanda evaporativa (Fuchigami et al., 1981; Preece & Sutter, 1991).

O emprego de luz natural é uma forma de aumentar a irradiância na micropropagação de plantas, no ambiente de cultivo *in vitro*, podendo provocar alterações morfofisiológicas nas plântulas. A alta irradiância pode afetar diretamente o desenvolvimento das plantas *in vitro*, apresentando efeito sobre a lamina foliar e modificando características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lichtenthaler et al., 1981; Terry et al., 1983, citados por Lee et al., 1988).

O fator luz também influencia a fotossíntese, a concentração de clorofila e a estrutura dos cloroplastos em plantas cultivadas *in vitro*, entretanto, isso não causa limitação durante o processo de aclimatização (Lee et al., 1985). As plântulas crescidas neste sistema podem apresentar melhor desenvolvimento do sistema radicular, maior diferenciação do parênquima paliçádico, cutículas mais espessas, redução na densidade de estômatos e melhor funcionamento destes (Dimassi-Therious & Bosabalidis, 1996; Khan et al., 2003; Serret et al., 1996). Outro fator a ser considerado é o de proporcionar economia com os gastos relativos ao emprego de iluminação artificial em salas de crescimento, que

podem gerar custos de até 65% dos gastos com energia elétrica (Standaert de Metsenaerae, 1991)

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento e o desempenho anatômico de plantas de abacaxizeiro em aclimatização advindas de cultivo em sala de crescimento (micropropagação convencional) e em estufa (luz natural).

#### **4 MATERIAL E METODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (Departamento de Agricultura) e no Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal (Departamento de Biologia), da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

##### **Material vegetal**

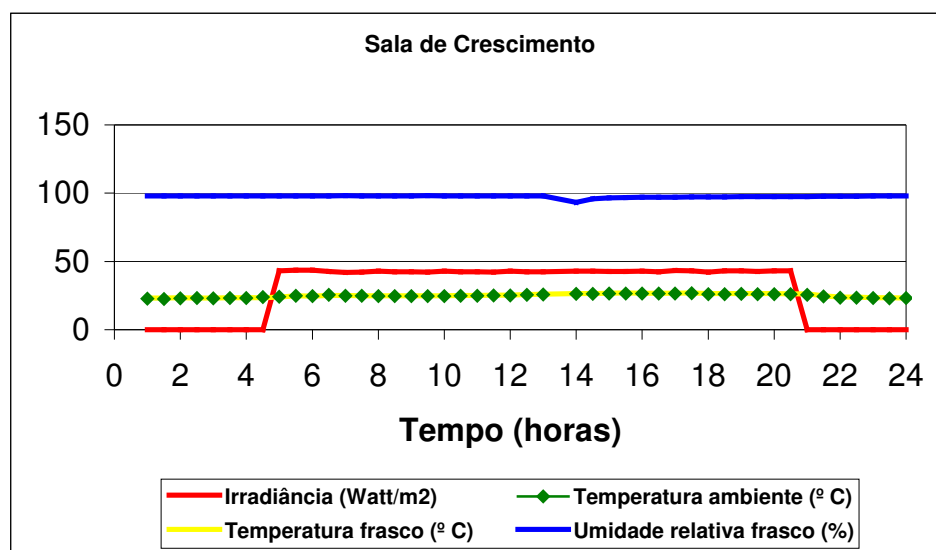
Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. cv. Imperial) foram obtidas a partir do estabelecimento de gemas axilares em meio líquido contendo os sais do meio MS (Murasigue & Skoog, 1962) suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e com pH ajustado para 5,8. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento por 60 dias, com lâmpadas brancas frias proporcionando 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, com 16 horas de fotoperíodo, a 24 ± 1°C.

##### **Descrição ambiental do cultivo *in vitro* em luz artificial e natural**

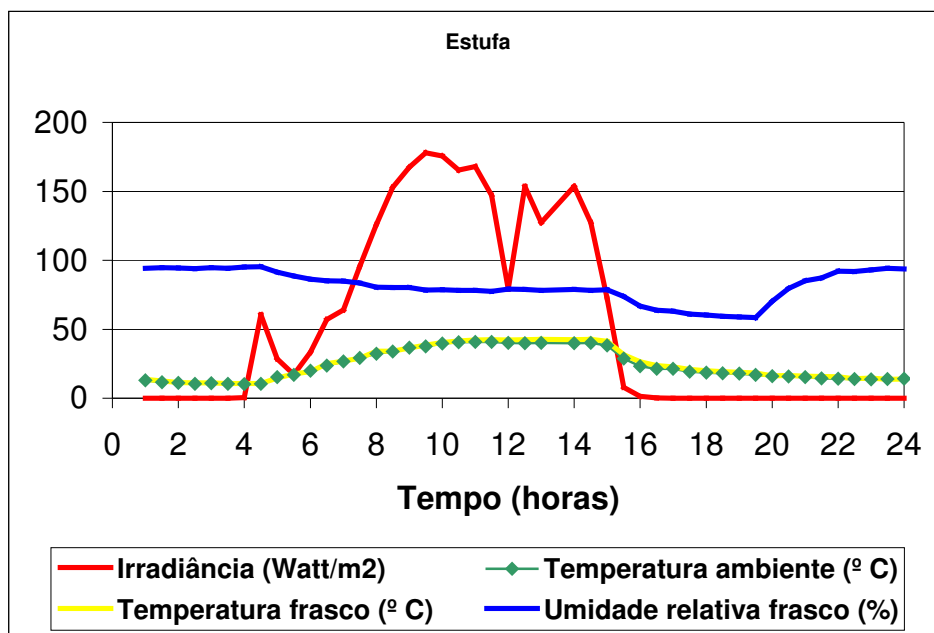
Na montagem dos experimentos, foram utilizadas plântulas com, em média, 1,0 cm de comprimento. As plântulas crescendo em condições de luz artificial foram mantidas em sala de crescimento com luz branca fria proporcionando irradiância de 40 Watt. m<sup>-2</sup>, com 16 horas de fotoperíodo a 24 ±

1°C. O cultivo sob luz natural foi mantido em estufa, coberta com Sombrite® 50% e revestida por plástico agrícola, apresentando temperatura máxima de 39,5°C e mínima de 14 °C, umidade relativa do ar variando de 40% a 85% (dados coletados por termohigrógrafo), e irradiância com picos de 55 a 160 Watt. m<sup>-2</sup> (dados coletados por quantômetro acoplado a um porômetro - modelo 1600M, LI-COR, Lincoln. Neb).

Em função dos sistemas de cultivo, foram feitas avaliações da temperatura e irradiância no ambiente externo e da umidade relativa e temperatura dentro do recipiente de cultivo (Figuras 1 e 2). As medidas de irradiância foram obtidas utilizando-se quantômetro acoplado a um porômetro (modelo 1600M, LI-COR, Lincoln. Neb). Para determinar a umidade relativa e a temperatura do ar utilizou-se um sensor (LI – 104), adequadamente introduzido no recipiente de cultivo (LI 1400; Licor, Lincoln. Neb).



**FIGURA 1.** Condições ambientes dentro do recipiente de cultivo, no sistema de micropropagação convencional. UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 2.** Condições ambientes dentro do recipiente de cultivo, no sistema de micropropagação convencional. Dados obtidos em dia claro dos meses de agosto e setembro, na estufa do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (DAG/UFLA). UFLA, Lavras, MG, 2006.

### Meio de cultura

O material vegetal cresceu em meio de enraizamento constituído pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. A concentração de sacarose foi de  $30 \text{ g.L}^{-1}$ , o meio de cultura foi solidificado com  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar, tendo o pH sido ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C}$  e  $1 \text{ kg.cm}^{-1}$ , por 20 minutos. Foram adicionados 30 ml de meio de cultura em frascos de 250 ml. Após a inoculação, os recipientes foram vedados com filme de PVC, com 10 microns.

### **Teor de clorofila**

Para quantificar os teores de clorofila foram utilizadas 4 amostras de 100 mg de tecido foliar fresco para cada ambiente de cultivo, sendo a clorofila extraída com acetona 80%. As concentrações de clorofila *a*, *b* e total foram determinadas com método proposto por Arnon (1949), após a obtenção dos dados de absorbância com base nas leituras em espectrofotômetro a 663 e 645 nm.

### **Características anatômicas**

As plantas utilizadas nos estudos anatômicos foram coletadas e fixadas em álcool 70<sup>o</sup>GL. Os cortes das seções foliares foram realizados à mão livre. As seções transversais foram clarificadas em solução a 1% de hipoclorito de sódio, em seguida, lavadas em água destilada e coradas com o corante azul de astra-safranina. As lâminas foram montadas em glicerina 50%, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). A partir das seções transversais, com auxílio de ocular micrométrica, foram realizadas medições da espessura dos tecidos no terço mediano de cada folha.

Os cortes paradérmicos foram realizados na face abaxial, na região mediana das folhas e a safranina hidroalcoólica 1% foi usada como corante na montagem das lâminas. A frequência estomática foi obtida por meio do emprego de câmara clara, em microscópio OLYMPUS CBB, de acordo com a técnica de Labouriau et al. (1961). Os diâmetros polar e equatorial do estômato foram obtidos com o emprego de ocular micrométrica. As fotomicrografias foram realizadas utilizando-se um fotomicroscópio OLYMPUS BX – 60.

### **Perda de água do tecido foliar *in vitro***

Após 60 dias do crescimento *in vitro* em meio de enraizamento, as plântulas mantidas em sala de crescimento (micropropagação convencional) e em estufa (micropropagação em luz natural) foram retiradas dos recipientes e, em laboratório (40% a 50% de umidade relativa do ar), avaliadas em relação à perda de água. Em intervalos de 10 em 10 minutos, foram retirados discos foliares de 10 mm e pesados, durante um período de 120 minutos. No final deste período, os discos foram levados para secagem em estufa, a 60°C, por 72 horas, para a obtenção da massa seca (adaptado de Sciutti & Morini, 1995). Os valores de perda de água foram expressos em porcentagem do conteúdo total de água do tecido foliar.

### **Descrição dos tratamentos**

Plântulas foram mantidas em sala de crescimento e estufa, durante a fase de enraizamento *in vitro*. Após 60 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas foram transferidas para tubetes com as dimensões de (19,0 x 5,0 cm), contendo substrato comercial composto de casca de pinus (Plantmax®). Os dados de crescimento das plantas foram coletados aos 7, 15, 30 e 60 dias de aclimatização, enquanto os anatômicos foram obtidos aos 0, 7, 15, 30 e 60 dias de aclimatização.

### **Avaliações**

A avaliações foram realizadas nos diferentes tempos de aclimatização. Para os dados de crescimento das plantas, as avaliações foram realizadas nas seguintes características: comprimento da parte aérea e do sistema radicular, número de folhas, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular e massa seca total. A massa seca foi medida após a secagem em estufa, por 15 dias, a 50°C. As características anatômicas foram analisadas em termos de: espessura

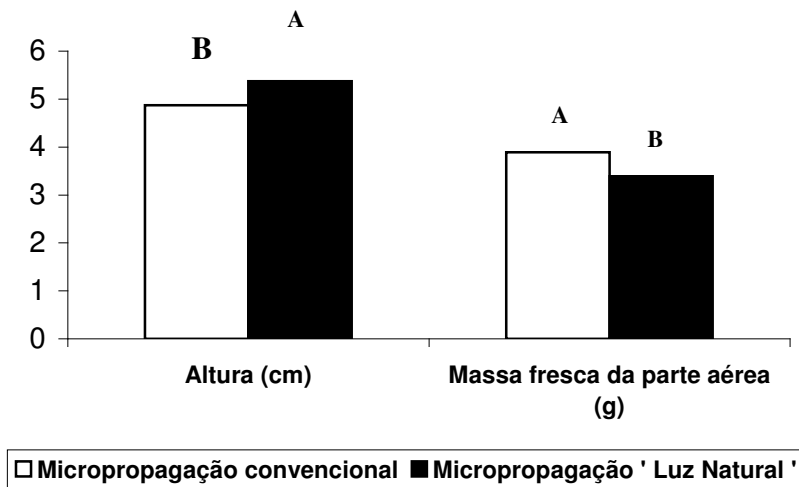
da epiderme da face adaxial, parênquima aquífero e clorofiliano, epiderme da face abaxial, espessura total, número de estômatos, diâmetro polar e equatorial de estômatos. Além dessas características, avaliaram-se o teor de clorofila das folhas ao longo do tempo de aclimatização e a perda de água das plântulas logo após o crescimento *in vitro*.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial simples de ambiente de enraizamento *in vitro* (sala de crescimento e estufa) e tempo (7, 15, 30, 60 dias) de aclimatização. Para os estudos de anatomia, foi adicionado o tempo zero. Foram quatro repetições para as características de crescimento e cinco para as anatômicas. O programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado para a realização das análises de variâncias (ANAVA), sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade e por regressão polinomial.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A altura das plantas durante a aclimatização foi afetada pelos ambientes de enraizamento *in vitro* (Anexo C). Plantas advindas de micropropagação em luz natural apresentaram-se mais altas, quando comparadas com as oriundas de micropropagação convencional. Entretanto, maior massa fresca da parte aérea foi verificada em plantas que cresceram no laboratório, em condições de sala de crescimento (micropropagação convencional) (Figura 3).

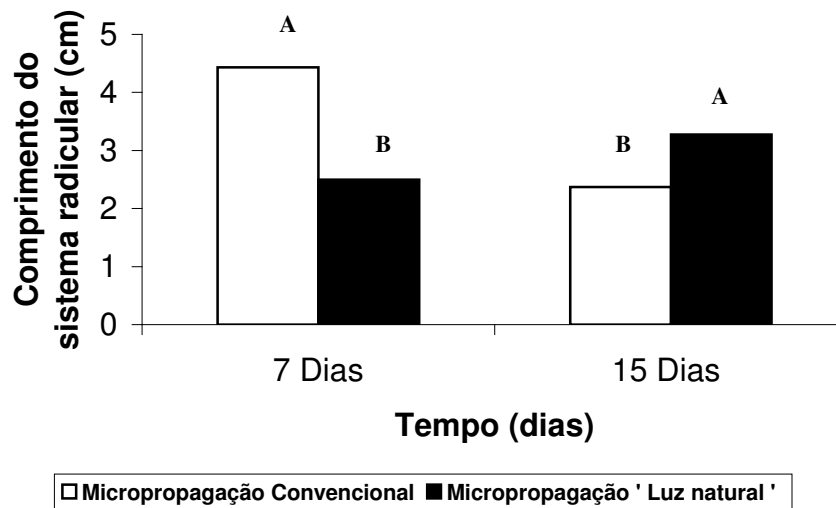


**FIGURA 3.** Altura e massa fresca de abacaxizeiro durante o processo de aclimatização, em função dos ambientes de crescimento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Houve influência do fator ambiente de enraizamento *in vitro* e tempo de aclimatização para o comprimento do sistema radicular. As plantas vindas da micropropagação convencional apresentaram maior comprimento de raízes aos 7 dias de aclimatização (Figura 4). Entretanto, aos 15 dias foi observada redução de 25% no comprimento do sistema radicular das plantas obtidas pela micropropagação convencional, podendo ser fator limitante para a aclimatização de mudas de abacaxizeiro. Isso pode estar relacionado à morte do sistema radicular, que é uma resposta característica das plantas em aclimatização advindas de cultura de tecidos.

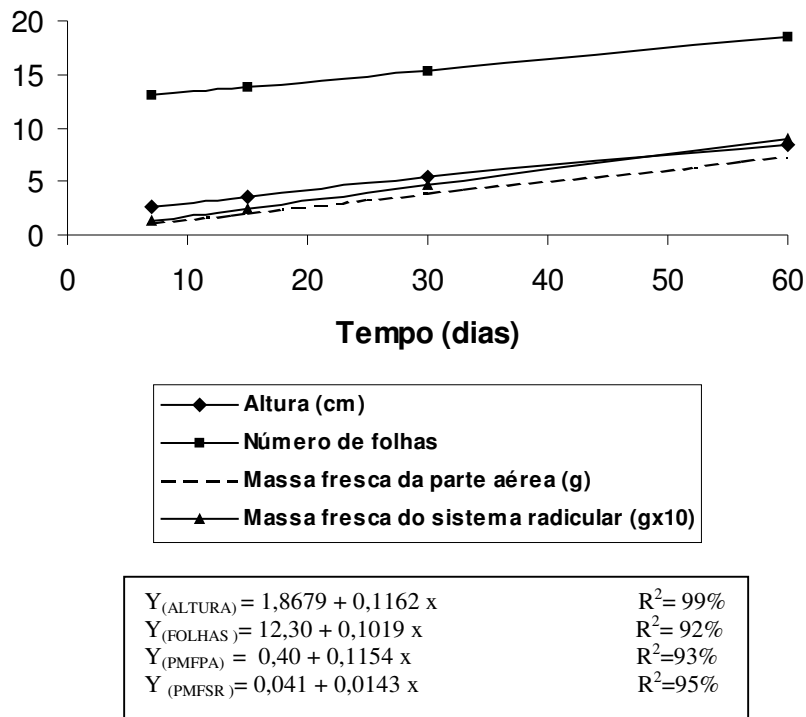
Raízes mal formadas e pouco funcionais têm sido comumente relatadas na micropropagação. Durante a fase de aclimatização, é necessário que haja a emissão de novas raízes para a absorção de água e sais minerais (Chenevard et al., 1997). Na micropropagação sob luz natural, foi observada tendência de crescimento do sistema radicular durante os 15 primeiros dias de aclimatização, o que pode beneficiar o crescimento das plantas durante este processo. Aos 30 e

60 dias de aclimatização, não houve influência significativa dos fatores estudados, apresentando comprimento médio de raízes de 11,0 cm aos 60 dias crescimento em estufa.



**FIGURA 4.** Comprimento do sistema radicular de abacaxizeiro, durante o processo de aclimatização, em função dos ambientes de crescimento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

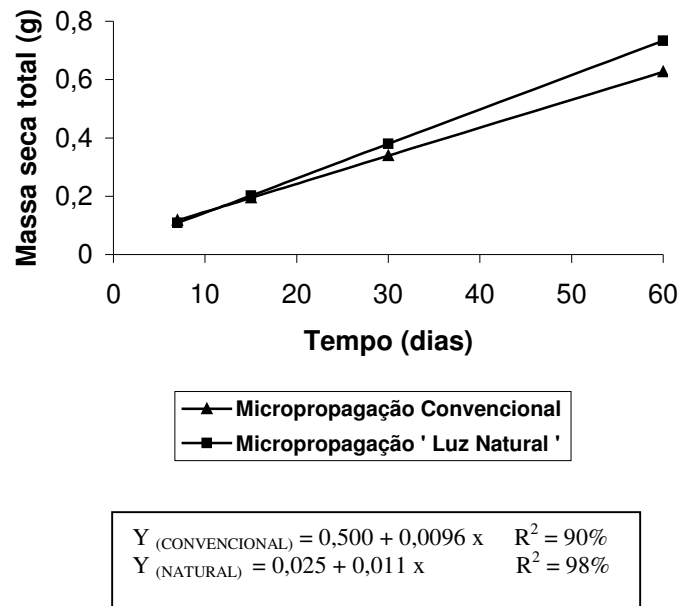
Os dados referentes a altura, número de folhas, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular, em função do tempo de aclimatização são mostrados na Figura 5. Ao longo do tempo, pôde-se observar um crescimento linear para todas as variáveis apresentadas, independente do sistema de cultivo *in vitro*, durante a fase de enraizamento. As mudas de abacaxizeiro apresentaram, aos 60 dias, as seguintes médias: altura de 8 cm, 18 folhas, 7,3 g para massa fresca da parte aérea e 0,9 g para massa fresca do sistema radicular.



**FIGURA 5.** Altura, número de folhas, massa fresca da parte aérea e do sistema radicular de abacaxizeiro, durante o processo de aclimatização, em função do tempo de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A massa seca de plantas foi afetada pela interação dos fatores estudados. Melhor comportamento foi observado no desempenho das mudas vindas da micropropagação sob luz natural, apresentando massa seca 14% superior em relação à micropropagação convencional, aos 60 dias de aclimatização. O enraizamento *in vitro* em estufa, em condições ambientais similares à fase de aclimatização das mudas, proporcionou menor estresse ao material vegetal e, conseqüentemente, maior desempenho das plantas. Além disso, o emprego de luz natural economiza gastos com energia elétrica em salas de crescimento,

iluminadas, em 90% dos casos, com lâmpadas fluorescentes branca frias (Dooley, 1991).

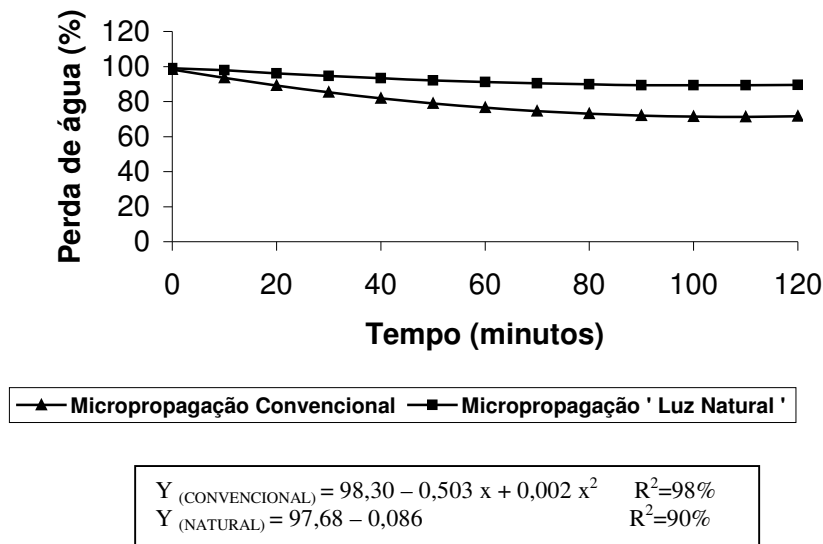


**FIGURA 6.** Massa seca total de abacaxizeiro, durante o processo de aclimatização, em função dos ambientes de crescimento *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A perda de água pelas plântulas de abacaxizeiro, após serem retiradas do recipiente, foi superior naquelas davindas da micropropagação convencional quando comparadas com aquelas micropropagadas sob luz natural (Figura 7). Aos 120 minutos, as plântulas que cresceram *in vitro* sob luz natural apresentavam 18% a mais de água do que no sistema convencional.

A micropropagação natural proporciona aumento na irradiância e queda da umidade relativa do ar dentro do recipiente de cultivo (Figura 2), aumentando a capacidade das plântulas em controlar as perdas de água durante os primeiros momentos da fase de aclimatização. A umidade mais baixa do que as convencionais (em torno de 100%) no ambiente de cultivo proporcionou a

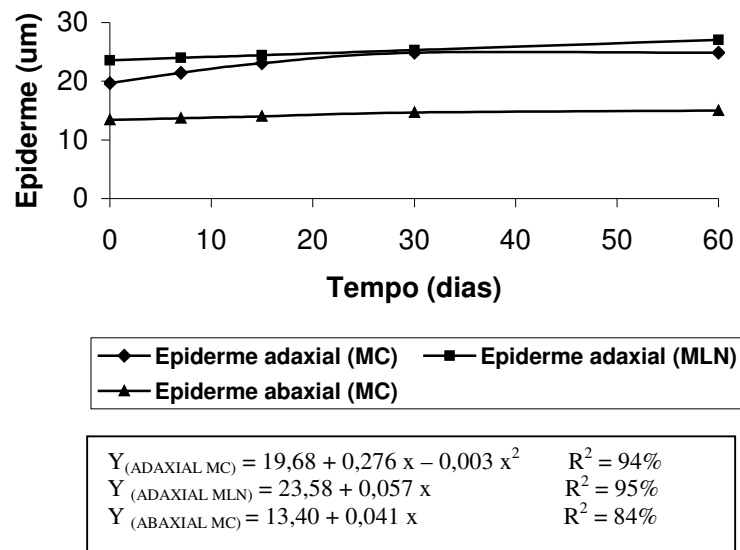
capacidade de controle de perda de água em *Prunus cerasifera* e *Malus domestica* cultivadas *in vitro* (Brainerd & Fuchigami, 1981; Sciutti & Morini, 1995). Capellades et al. (1990) afirmam que o aumento da irradiância e a redução da umidade relativa do ar durante o cultivo *in vitro* induzem a modificações anatômicas observadas nas plantas durante o período de aclimatização em casa de vegetação, como aumento na cêra epicuticular e redução no tamanho e frequência dos estômatos. Modificações anatômicas de plântulas cultivadas *in vitro* sob luz natural também foram observadas no presente trabalho.



**FIGURA 7.** Perda de água pelas plântulas retiradas do crescimento *in vitro*, em meio de enraizamento, em função dos ambientes de cultivos. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A espessura da face adaxial da epiderme das plantas advindas da micropropagação sob luz natural apresentou-se muito similar, desde a retirada das plântulas dos recipientes de cultivo até os 60 dias de aclimatização (Figura 8). Em contrapartida, houve aumento da espessura da epiderme adaxial das plantas vindas da micropropagação convencional. Estes resultados mostram que

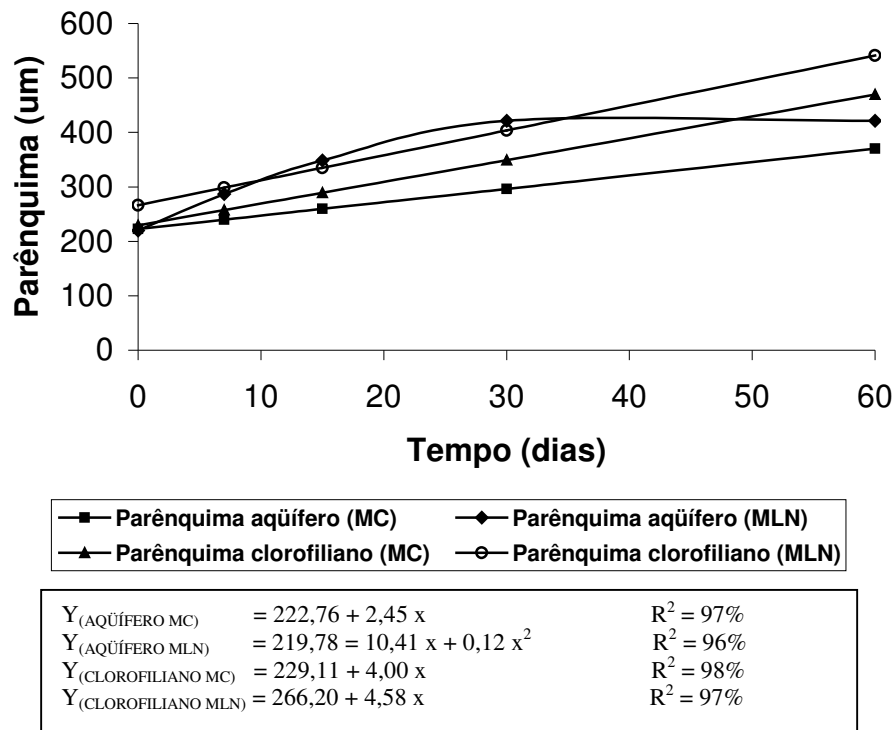
a estrutura das células da epiderme das plântulas, em cultivo sob luz natural, é similar à das plantas crescendo em estufa durante a aclimatização. O aumento da irradiância melhora a estrutura da epiderme das plântulas cultivadas *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalis, 1996). A espessura da face abaxial da epiderme praticamente não se alterou durante os 60 dias de cultivo em estufa, para plantas vindas da micropropagação convencional. Não houve efeito significativo para espessura da face abaxial da epiderme das plantas vindas de micropropagação sob luz natural, apresentando média de 14 µm aos 60 dias de aclimatização (Figura 8).



**FIGURA 8.** Espessura dos parênquimas aquífero e clorofiliano de plantas em diferentes tempos de aclimatização, em função dos ambientes de cultivos *in vitro*. Micropropagação convencional (MC) e micropropagação sob luz natural (MLN). UFLA, Lavras, MG, 2006.

O crescimento dos parênquimas foi afetado pela interação dos ambientes de cultivo *in vitro* e tempos de aclimatização. De maneira geral, os parênquimas aquífero e clorofiliano foram mais espessos em plantas que passaram pela micropropagação sob luz natural (Figuras 9, 11 e 12), mostrando a plasticidade

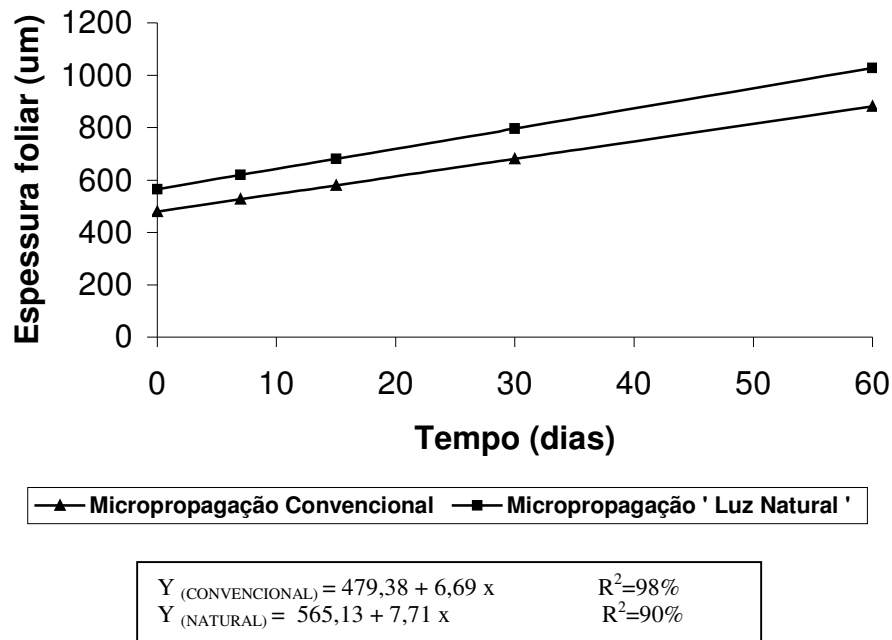
das plântulas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* sob alta irradiância e sua capacidade adaptativa, na fase posterior de aclimatização, ou seja, maior capacidade fotossintética e de acúmulo de água pelo parênquima clorofiliano e aquífero, respectivamente.



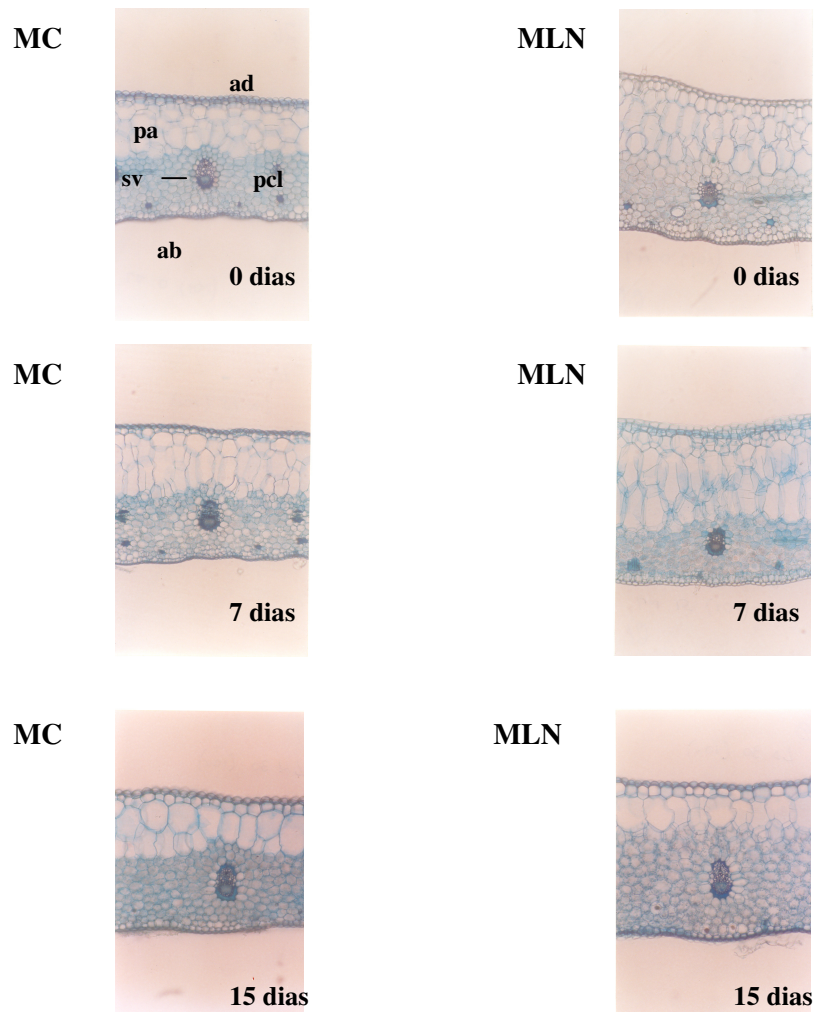
**FIGURA 9.** Espessura da epiderme adaxial e abaxial de plantas em diferentes tempos de aclimatização, em função dos ambientes de cultivo *in vitro*. Micropropagação convencional (MC) e micropropagação sob luz natural (MLN). UFLA, Lavras, MG, 2006.

Estudos em micropropagação fotoautotrófica (cultivo ausente de sacarose) sob alta irradiância têm mostrado maior organização dos tecidos do mesofilo de plântulas cultivadas nesse sistema (Khan et al., 2003; Serret et al., 1996) e menores perdas durante a fase de aclimatização (Serret et al., 1997).

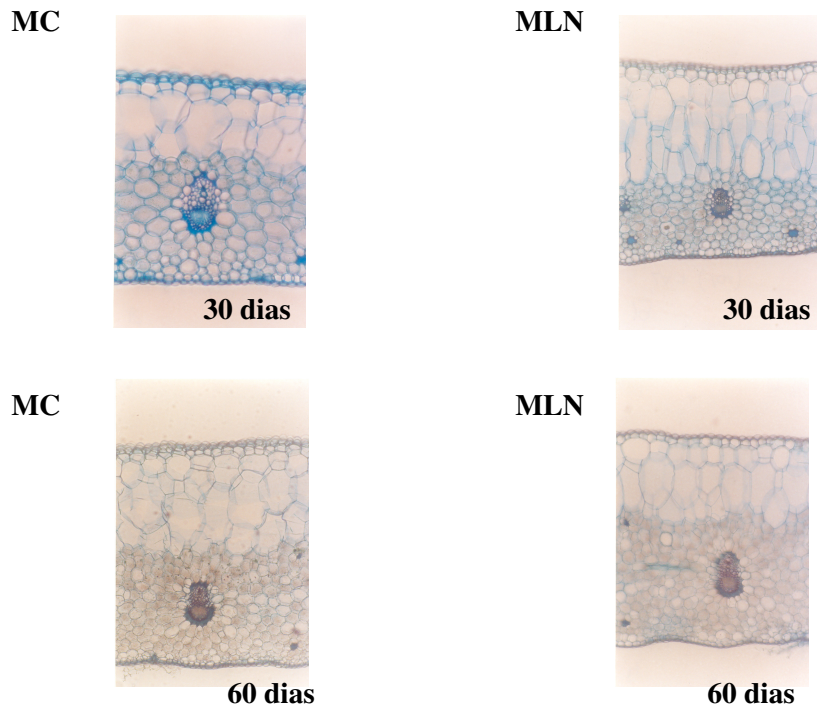
A espessura foliar, em todos os tempos de aclimatização, foi maior em plantas originadas do cultivo *in vitro* sob luz natural (Figuras 10, 11 e 12). Folhas mais espessas também foram observadas em cultivo *in vitro*, sendo considerada resposta padrão em cultivo sob alta irradiância (Lee et al., 2000). Folhas menos espessas em cultivo *in vitro* foram observadas quando comparadas com as folhas de plântulas em aclimatização (Donnelly & Vidaver, 1984).



**FIGURA 10.** Espessura foliar de plantas em diferentes tempos de aclimatização, em função dos ambientes de cultivos *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

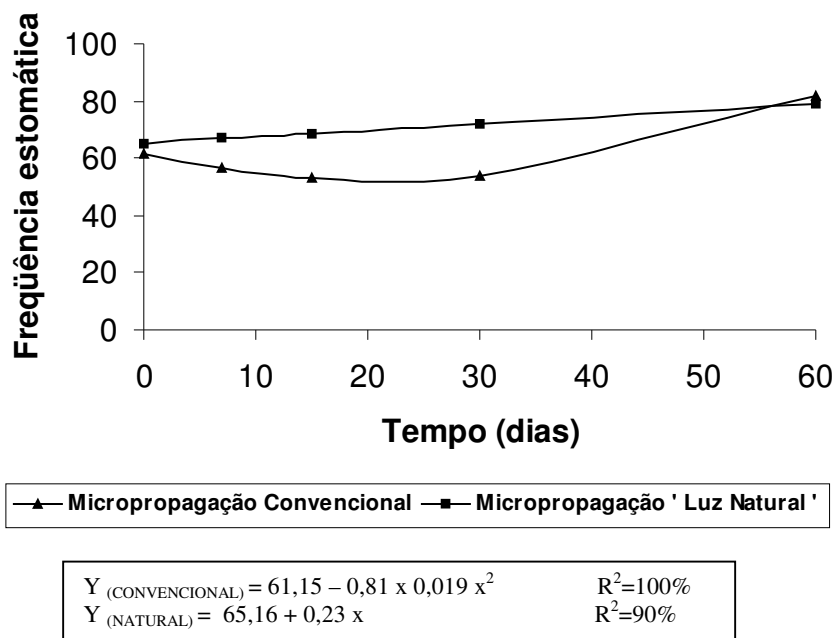


**FIGURA 11.** Seções transversais de folhas de abacaxizeiro desenvolvidas durante os diferentes tempos de aclimatização, em função da micropropagação convencional (MC) e da micropropagação sob luz natural (MLN). **ad** - adaxial; **ab** - abaxial; **pa** - parênquima aquífero; **pcl** - parênquima clorofiliano; **sv** - sistema vascular. UFLA, Lavras, MG, 2006.



**FIGURA 12.** Seções transversais de folhas de abacaxizeiro desenvolvidas durante os diferentes tempos de aclimatização, em função da micropropagação convencional (MC) e da micropropagação sob luz natural (MLN). UFLA, Lavras-MG, 2006.

O número de estômatos por  $\text{mm}^2$  apresentou queda, até os 30 dias de aclimatização. Após este período, houve aumento na frequência estomática das plantas vindas da micropropagação convencional (Figura 13). Aumento no tamanho e na densidade estomática tem sido relatados como fator para excessiva perda de água após a transferência do cultivo *in vitro* para o *in vivo* (Brainerd & Fuchigami, 1981; Lee et al., 1988; Sciutti & Morini, 1995).



**FIGURA 13.** Frequência estomática (estômatos/mm<sup>2</sup>) de plantas em diferentes tempos de aclimatização, em função dos ambientes de cultivos *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Entretanto, as plantas obtidas a partir da micropropagação sob luz natural apresentaram um crescimento linear no número de estômatos durante a fase de aclimatização (Figura 13). A densidade estomática *in vitro* foi maior em macieira (Blanke & Belcher, 1989) e roseira (Capellades et al., 1990), mas menor em ameixeira (Brained et al., 1981), quando comparadas com plantas que cresceram em casa de vegetação.

O reduzido controle estomático das plântulas *in vitro* também é relatado (Capellades et al., 1990; Khan et al., 2003; Lee et al., 1988; Sciutti & Morini, 1995). Os estômatos mais elípticos são relatados como mais funcionais (Capellades et al., 1990; Khan et al., 2003).

O diâmetro polar dos estômatos em plantas obtidos via micropropagação convencional foi menor até os 30 dias de cultivo. Para o diâmetro equatorial, não

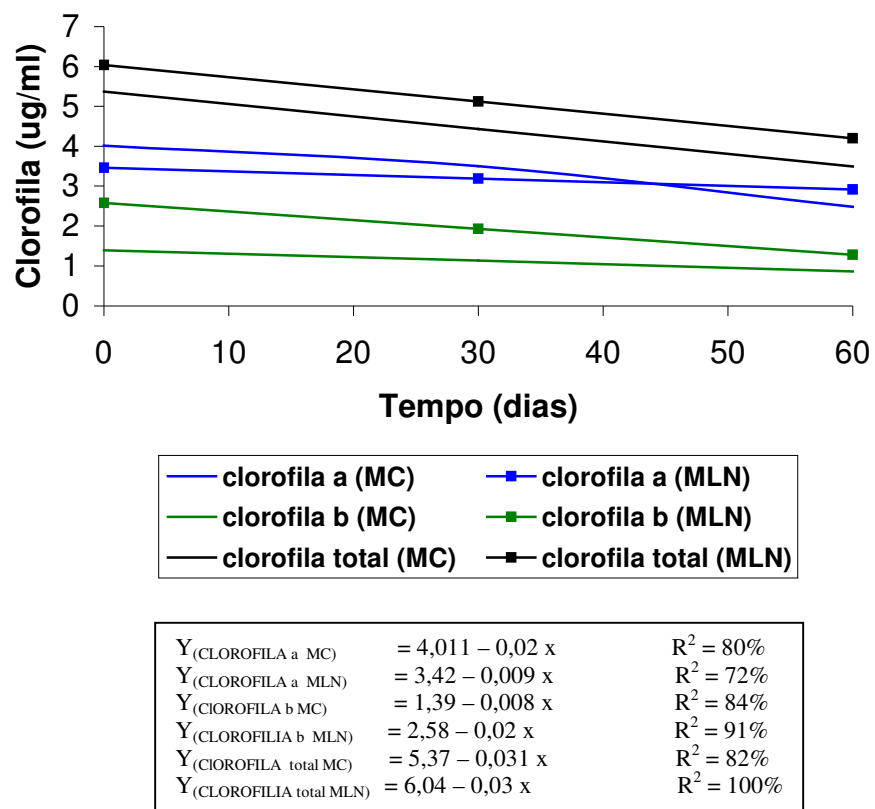
houve diferença para as plantas advindas da micropropagação convencional. As plantas vindas da micropropagação sob luz natural apresentaram estômatos com as mesmas dimensões das plantas aos 60 dias de transplântio, já na segunda semana de aclimatização (15 dias). As dimensões nas plantas advindas da micropropagação sob luz natural, aos 15 dias de aclimatização, eram de 25,40  $\mu\text{m}$  para o diâmetro equatorial e 25,9  $\mu\text{m}$  para o diâmetro polar. Comparando-se com a micropropagação convencional, este formato só foi atingido aos 60 dias de aclimatização, quando o diâmetro polar apresentou média de 25,35 (Tabela 1).

TABELA 1. Diâmetro polar e equatorial de estômatos de plantas em diferentes tempos de aclimatização em função dos ambientes de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Tempo (dias)	Diâmetro polar ( $\mu\text{m}$ )		Diâmetro equatorial ( $\mu\text{m}$ )	
	MC	MLN	MC	MLN
0	22,25 B	25,08 A	22,40 A	23,10 B
7	22,25 B	25,72 A	25,71 A	22,63 B
15	23,31 B	25,91 A	25,17 A	25,40 A
30	22,41 B	25,22 A	25,91 A	25,96 A
60	25,35 A	26,56 A	26,60 A	25,36 A

Dados com a mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Micropropagação convencional (MC) e micropropagação sob luz natural (MLN).

Os teores de clorofila *a*, *b* e total foram superiores nas plantas obtidas pela micropropagação sob luz natural e, no decorrer da aclimatização, foi observada queda linear na concentração das clorofilas (Figura 16). Provavelmente, com o avanço no processo de aclimatização e aumento da disponibilidade de luz e  $\text{CO}_2$ , a planta investiu menos assimilados no complexo proteína-clorofila do aparelho fotossintético.



**FIGURA 16.** Teores de clorofila a, b e total de plantas em diferentes tempos de aclimatização, em função dos ambientes de cultivos *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

No cultivo *in vitro* a presença da sacarose no meio de cultura tem sido considerada a principal causa da redução dos teores de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese (Chenevard et al., 1997; Deng & Donnelly, 1993). Entretanto, mesmo em cultivo contendo sacarose e sob alta irradiância, as clorofilas *a*, *b* e total apresentaram maiores teores que na micropropagação convencional, o que pode representar maior capacidade fotossintética.

## 6 CONCLUSÕES

O emprego de luz natural, durante a fase de enraizamento *in vitro*, proporciona melhor desempenho agrônômico e anatômico das plantas de abacaxizeiro durante a fase de aclimatização, apresentando o benefício de economizar energia elétrica para iluminação artificial em laboratórios de cultura de tecidos vegetais.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.

BLANKE, M. M.; BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 85-89, 1989.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1991.

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

CHENEVARD, E. M.; FROSSARD, J. S.; ALLEMAND, C. J. Carbohydrate reserves and CO<sub>2</sub> balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* n 23 x *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, n. 1/4, p. 207-217, Mar. 1997.

DENG, R.; DONNELLY, D. In vitro hardening of red raspberry by CO<sub>2</sub> enrichment and reduced medium sucrose concentration. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 10, p. 1048-1051, Oct. 1993.

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 Culture**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1996.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

DOOLEY, J. H. Influence of lighting spectra on plant tissue. In: MEETING OF AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS, 1991, Chicago. **Proceedings...** Chicago: [S. n. ], 1991.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration of water loss in aseptically cultured plum. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, July 1981.

KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal vegetal**. Seropédica: [S. N. ], 1997. 198 p.

LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABORIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 237-257, 1961.

LEE, D. W.; OBERBANER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISNAPILAY, B.; MANSON, M.; 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.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrstructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. teords improved acclimatization and field survial. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, n. 3, p. 637-641, 1985.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morfology of in vitro – and in vivo – developed Sweetgum leaves. **The Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

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

PREECE, E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 72-93.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets by relative humidity during rooting in vitro. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 70, n. 2, p. 221-228, Mar. 1995.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. Development of photoautotrophic and photoinhibition of *Gardênia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 1-16, Apr. 1996.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I.; MATAS, J.; ARAUS, J. L. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardênia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimatization ex vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 47, n. 3, p. 217-230, 1997.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

## ANEXO A

TABELA 1 A. Resumo da análise de variância para número de brotos de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	108
TABELA 2 A. Resumo da análise de variância para brotos maiores de 1,0 cm de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	108
TABELA 3 A. Resumo da análise de variância para comprimento de brotos (cm) de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	108
TABELA 4 A. Resumo da análise de variância para peso da massa fresca de brotos (g) de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	109
TABELA 5 A. Resumo da análise de variância para peso da massa seca de brotos (g) de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	109

TABELA 1 A. Resumo da análise de variância para número de brotos de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Tratamentos	8	69,49	31,86	0,00**
Resíduo	27	2,18		
Total	35			
CV (%)	10,25			
Média geral	14,40			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

TABELA 2 A. Resumo da análise de variância para brotos maiores de 1,0 cm de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Tratamentos	8	104,53	32,35	0,00**
Resíduo	27	3,23		
Total	35			
CV (%)	17,00			
Média geral	10,57			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

TABELA 3 A. Resumo da análise de variância para comprimento de brotos (cm) de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Tratamentos	8	1,27	26,72	0,00**
Resíduo	27	0,047		
Total	35			
CV (%)	11,77			
Média geral	1,85			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

TABELA 4 A. Resumo da análise de variância para peso da massa fresca de brotos (g) de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras – MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Tratamentos	8	12,41	37,53	0,00**
Resíduo	27	0,33		
Total	35			
CV (%)	13,84			
Média geral	4,16			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

TABELA 5 A. Resumo da análise de variância para peso da massa seca de brotos (g) de abacaxizeiro micropropagado em meio líquido, semi-sólido, biorreator de imersão contínua e temporária. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Tratamentos	8	0,023	58,82	0,00**
Resíduo	27	0,00039		
Total	35			
CV (%)	8,27			
Média geral	0,24			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F

## ANEXO B

TABELA 1 B. Resumo da análise de variância para número de brotos de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	113
TABELA 2 B. Resumo da análise de variância para comprimento de brotos (cm) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	113
TABELA 3 B. Resumo da análise de variância para peso da massa fresca (g) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	114
TABELA 4 B. Resumo da análise de variância para comprimento do sistema radicular (cm) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	114
TABELA 5 B. Resumo da análise de variância para peso da massa fresca do sistema (g) radicular de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	115
TABELA 6 B. Resumo da análise de variância para peso da massa seca (g) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras – MG, 2006.	115

TABELA 7 B. Resumo da análise de variância para epiderme superior ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	116
TABELA 8 B. Resumo da análise de variância para parênquima aquíífero ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	116
TABELA 9 B. Resumo da análise de variância para parênquima clorofiliano ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	117
TABELA 10 B. Resumo da análise de variância para epiderme inferior ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	117
TABELA 11 B. Resumo da análise de variância para espessura total ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	118
TABELA 12 B. Resumo da análise de variância para número de vasos condutores de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	118

TABELA 13 B. Resumo da análise de variância para número de estômatos de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	119
TABELA 14 B. Resumo da análise de variância para diâmetro polar ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	119
TABELA 15 B. Resumo da análise de variância para diâmetro equatorial ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	120

TABELA 1 B. Resumo da análise de variância para número de brotos de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	112,483	46,112	0,00**
Sacarose	1	213,560	87,540	0,00**
Meio	1	5.486,427	2.249,115	0,00**
Luz x sacarose	1	78,105	32,020	0,00**
Luz x meio	1	15,584	6,390	0,02*
Sacarose x meio	1	111,242	45,603	0,00**
Luz x Sacarose x meio	1	35,434	14,526	0,00**
Resíduo	24	2,439		
<b>Total</b>	<b>31</b>			
CV (%)	9,07			
Média geral	17,228			

\* e \*\*Significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 2 B. Resumo da análise de variância para comprimento de brotos (cm) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	3,195	18,930	0,00**
Sacarose	1	1,471	8,720	0,00**
Meio	1	189,769	1.125,237	0,00**
Luz x sacarose	1	0,922	5,470	0,03*
Luz x meio	1	10,142	60,135	0,00**
Sacarose x meio	1	0,612	3,3628	0,07ns
Luz x Sacarose x meio	1	0,575	3,412	0,08ns
Resíduo	24	0,168		
<b>Total</b>	<b>31</b>			
CV (%)	11,76			
Média geral	3,49			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 3 B. Resumo da análise de variância para peso da massa fresca (g) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,689	2,77	0,11ns
Sacarose	1	10,596	42,51	0,00**
Meio	1	38,290	154,15	0,00**
Luz x sacarose	1	8,991	36,20	0,00**
Luz x meio	1	0,247	0,99	0,32ns
Sacarose x meio	1	0,185	0,74	0,39ns
Luz x Sacarose x meio	1	0,007	0,02	0,86ns
Resíduo	24	0,248		
<b>Total</b>	<b>31</b>			
CV (%)	10,91			
Média geral	4,56			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 4 B. Resumo da análise de variância para comprimento do sistema radicular (cm) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,055	0,110	0,74ns
Sacarose	1	3,008	5,980	0,02*
Meio	1	35,301	70,21	0,00**
Luz x sacarose	1	0,042	0,080	0,77ns
Luz x meio	1	0,060	0,131	0,72ns
Sacarose x meio	1	3,284	6,533	0,02*
Luz x Sacarose x meio	1	0,029	0,060	0,81ns
Resíduo	24	0,502		
<b>Total</b>	<b>31</b>			
CV (%)	56,32			
Média geral	1,26			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 5 B. Resumo da análise de variância para peso da massa fresca do sistema (g) radicular de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,062	27,70	0,00**
Sacarose	1	0,016	7,35	0,01**
Meio	1	1,827	809,39	0,00**
Luz x sacarose	1	0,008	3,95	0,06ns
Luz x meio	1	0,056	24,81	0,00**
Sacarose x meio	1	0,015	6,73	0,01**
Luz x Sacarose x meio	1	0,008	3,72	0,06ns
Resíduo	24	0,002		
<b>Total</b>	<b>31</b>			
CV (%)	16,34			
Média geral	0,29			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 6 B. Resumo da análise de variância para peso da massa seca (g) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,017	14,08	0,00**
Sacarose	1	0,140	110,37	0,00**
Meio	1	0,053	41,85	0,00**
Luz x sacarose	1	0,044	34,49	0,00**
Luz x meio	1	0,0002	0,142	0,70ns
Sacarose x meio	1	0,007	5,26	0,03*
Luz x Sacarose x meio	1	0,003	2,65	0,11ns
Resíduo	24	0,001		
<b>Total</b>	<b>31</b>			
CV (%)	15,31			
Média geral	0,23			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 7 B. Resumo da análise de variância para epiderme superior ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	591,937	342,14	0,00**
Sacarose	1	8,614	4,98	0,03*
Meio	1	49,842	28,81	0,00**
Luz x sacarose	1	25,732	14,87	0,00**
Luz x meio	1	1,572	0,90	0,35ns
Sacarose x meio	1	18,059	10,44	0,00**
Luz x Sacarose x meio	1	0,898	0,51	0,47ns
Resíduo	32	1,729		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	5,01			
Média geral	26,26			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 8 B. Resumo da análise de variância para parênquima aquífero ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	4.999,619	62,75	0,00**
Sacarose	1	3.127,708	39,25	0,00**
Meio	1	3.669,703	46,06	0,00**
Luz x sacarose	1	185,276	2,32	0,13ns
Luz x meio	1	14.592,575	183,15	0,00**
Sacarose x meio	1	12.419,513	155,88	0,00**
Luz x Sacarose x meio	1	477,098	5,98	0,02*
Resíduo	32	79,672		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	5,01			
Média geral	178,08			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 9 B. Resumo da análise de variância para parênquima clorofiliano ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	38,058	0,57	0,45ns
Sacarose	1	4.558,596	68,09	0,00**
Meio	1	954,777	14,26	0,00**
Luz x sacarose	1	6,957	0,104	0,74ns
Luz x meio	1	14.657,818	218,94	0,00**
Sacarose x meio	1	13.626,780	203,54	0,00**
Luz x Sacarose x meio	1	538,129	8,038	0,00**
Resíduo	32	66,948		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	3,66			
Média geral	223,72			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

Tabela 10 B. Resumo da análise de variância para epiderme inferior ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	110,671	134,64	0,00**
Sacarose	1	9,222	11,22	0,00**
Meio	1	465,702	566,59	0,00**
Luz x sacarose	1	0,553	0,67	0,41ns
Luz x meio	1	21,297	25,91	0,00**
Sacarose x meio	1	0,248	0,30	058ns
Luz x Sacarose x meio	1	1,396	1,70	0,20ns
Resíduo	32	0,821		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	5,33			
Média geral	17,01			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 11 B. Resumo da análise de variância para espessura total ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	2.152,910	16,577	0,00**
Sacarose	1	14.828,814	114,181	0,00**
Meio	1	15.429,733	118,808	0,00**
Luz x sacarose	1	85,258	0,656	0,42ns
Luz x meio	1	88,959	0,685	0,41ns
Sacarose x meio	1	52.148,617	401,541	0,00**
Luz x Sacarose x meio	1	1.678,035	12,921	0,00**
Resíduo	32	129,871		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	2,56			
Média geral	445,71			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 12 B. Resumo da análise de variância para número de vasos condutores de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	4,900	5,220	0,03*
Sacarose	1	0,900	0,960	0,33ns
Meio	1	396,900	423,360	0,00**
Luz x sacarose	1	0,900	0,960	0,33ns
Luz x meio	1	2,500	2,667	0,11ns
Sacarose x meio	1	0,900	0,960	0,33ns
Luz x Sacarose x meio	1	4,900	5,227	0,03*
Resíduo	32	0,937		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	7,48			
Média geral	12,95			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 13 B. Resumo da análise de variância para número de estômatos de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	3,080	0,125	0,72ns
Sacarose	1	27,722	1,125	0,29ns
Meio	1	1.035,306	42,014	0,00**
Luz x sacarose	1	181,050	7,347	0,01**
Luz x meio	1	41,412	1,681	0,20ns
Sacarose x meio	1	3,080	0,125	0,72ns
Luz x Sacarose x meio	1	27,722	1,125	0,29ns
Resíduo	32	24,642		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	7,57			
Média geral	65,58			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 14 B. Resumo da análise de variância para diâmetro polar ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,011	0,006	0,93ns
Sacarose	1	20,005	10,210	0,00**
Meio	1	418,324	213,502	0,00**
Luz x sacarose	1	3,860	1,970	0,17ns
Luz x meio	1	0,030	0,016	0,90ns
Sacarose x meio	1	1,535	0,784	0,38ns
Luz x Sacarose x meio	1	22,129	11,294	0,00**
Resíduo	32	1,959		
<b>Total</b>	<b>39</b>			
CV (%)	4,46			
Média geral	31,38			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 15 B. Resumo da análise de variância para diâmetro equatorial ( $\mu\text{m}$ ) de abacaxizeiro micropropagado em diferentes meios de cultura, concentrações de sacarose e ambientes de crescimento. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	4,182	3,719	0,06ns
Sacarose	1	2,043	1,817	0,18ns
Meio	1	130,013	115,620	0,00**
Luz x sacarose	1	2,409	2,134	0,15ns
Luz x meio	1	0,576	0,512	0,47ns
Sacarose x meio	1	4,459	4,084	0,06ns
Luz x Sacarose x meio	1	0,173	0,155	0,69ns
Resíduo	32	1,124		
Total	39			
CV (%)	4,52			
Média geral	243,471			

ns – não significativo; \* e \*\*significativo, a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

## ANEXO C

TABELA 1 C	Resumo da análise de variância para altura de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	124
TABELA 2 C	Resumo da análise de variância para número de folhas de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	124
TABELA 3 C	Resumo da análise de variância para comprimento do sistema radicular de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	125
TABELA 4 C	Resumo da análise de variância para peso da massa fresca da parte aérea de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	125
TABELA 5 C	Resumo da análise de variância para peso da massa fresca do sistema radicular de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	126
TABELA 6 C	Resumo da análise de variância para peso da massa seca total de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	126

TABELA 7 C Resumo da análise de variância para espessura da epiderme superior de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	127
TABELA 8 C Resumo da análise de variância para espessura do parênquima aquífero de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	127
TABELA 9 C Resumo da análise de variância para espessura do parênquima clorofiliano de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	128
TABELA 10 C Resumo da análise de variância para espessura da epiderme inferior de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	128
TABELA 11 C Resumo da análise de variância para espessura foliar de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	129
TABELA 12 C Resumo da análise de variância para número de estômatos superior de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras – MG, 2006.	129
TABELA 13 C Resumo da análise de variância para diâmetro polar de estômatos de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras – MG, 2006.	130

TABELA 14 C Resumo da análise de variância para diâmetro equatorial de estômatos de abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	130
TABELA 15 C Resumo da análise de variância para perda de água abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	131
TABELA 16 C Resumo da análise de variância para clorofila a abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	131
TABELA 17 C Resumo da análise de variância para clorofila b abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.	132
TABELA 18 C Resumo da análise de variância para clorofila total abacaxizeiro enraizado <i>in vitro</i> , em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras – MG, 2006.	132

TABELA 1 C Resumo da análise de variância para altura de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	2,0101	15,131	0,00**
Tempo	3	59,6179	448,773	0,00**
Luz x tempo	3	0,1224	0,922	0,44ns
Resíduo	24	0,1328		
Total	31			
CV (%)	7,11			
Média geral	5,12			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 2 C Resumo da análise de variância para número de folhas de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	1,8500	2,391	0,13ns
Tempo	3	49,2868	63,698	0,00**
Luz x tempo	3	1,0374	1,341	0,28ns
Resíduo	24	0,7737		
Total	31			
CV (%)	5,80			
Média geral	15,15			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 3 C Resumo da análise de variância para comprimento do sistema radicular de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,9090	10,808	0,00**
Tempo	3	115,0860	1.368,240	0,00**
Luz x tempo	3	2,9556	35,169	0,00**
Resíduo	24	0,0841		
Total	31			
CV (%)	4,89			
Média geral	5,92			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 4 C Resumo da análise de variância para peso da massa fresca da parte aérea de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	1,8990	9,507	0,00**
Tempo	3	62,6059	313,42	0,00**
Luz x tempo	3	0,4387	2,196	0,11ns
Resíduo	24	0,1997		
Total	31			
CV (%)	12,30			
Média geral	3,63			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 5 C Resumo da análise de variância para peso da massa fresca do sistema radicular de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,0033	0,660	0,42ns
Tempo	3	0,9446	187,99	0,00**
Luz x tempo	3	0,0088	1,762	0,18ns
Resíduo	24	0,0050		
Total	31			
CV (%)	15,98			
Média geral	0,44			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 6 C Resumo da análise de variância para peso da massa seca total de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,0104	24,331	0,00**
Tempo	3	0,5241	1.215,293	0,00**
Luz x tempo	3	0,0079	18,471	0,00**
Resíduo	24	0,0004		
Total	31			
CV (%)	6,15			
Média geral	0,33			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 7 C Resumo da análise de variância para espessura da epiderme superior de abacaxizeiro enraizado *in vitros* em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	67,048	55,25	0,00**
Tempo	4	31,04	25,56	0,00**
Luz x tempo	4	6,51	5,36	0,00**
Resíduo	40	1,21		
Total	49			
CV (%)	4,65			
Média geral	23,71			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 8 C Resumo da análise de variância para espessura do parênquima aquífero de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	41.493,89	204,27	0,00**
Tempo	4	47.934,52	235,98	0,00**
Luz x tempo	4	5.184,07	25,52	0,00**
Resíduo	40	203,12		
Total	49			
CV (%)	4,65			
Média geral	306,53			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 9 C Resumo da análise de variância para espessura do parênquima clorofiliano de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	31.306,02	147,94	0,00**
Tempo	4	108.753,50	513,935	0,00**
Luz x tempo	4	1.907,41	9,014	0,00**
Resíduo	40	211,60		
Total	49			
CV (%)	4,23			
Média geral	343,83			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 10 C Resumo da análise de variância para espessura da epiderme inferior de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	4,121	4,923	0,03*
Tempo	4	14,88	10,232	0,00**
Luz x tempo	4	9,396	6,4969	0,00**
Resíduo	40	1,446		
Total	49			
CV (%)	8,61			
Média geral	13,96			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 11 C Resumo da análise de variância para espessura foliar de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	147.538,55	169,659	0,00**
Tempo	4	313.688,57	360,721	0,00**
Luz x tempo	4	5.897,744	6,782	0,00**
Resíduo	40	869,61		
Total	49			
CV (%)	4,31			
Média geral	683,73			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 12 C Resumo da análise de variância para número de estômatos superior de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	1.026,04	33,366	0,00**
Tempo	4	621,744	20,219	0,00**
Luz x tempo	4	252,37	8,207	0,00**
Resíduo	40	30,751		
Total	49			
CV (%)	8,42			
Média geral	65,86			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 13 C Resumo da análise de variância para diâmetro polar de estômatos de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	99,63	216,137	0,00**
Tempo	4	9,158	19,86	0,00**
Luz x tempo	4	2,282	4,95	0,00**
Resíduo	40	0,460		
Total	49			
CV (%)	2,80			
Média geral	24,28			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 14 C Resumo da análise de variância para diâmetro equatorial de estômatos de abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	9,34	11,868	0,00**
Tempo	4	16,56	21,04	0,00**
Luz x tempo	4	7,27	9,236	0,00**
Resíduo	40	0,787		
Total	49			
CV (%)	3,59			
Média geral	24,74			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 15 C Resumo da análise de variância para perda de água abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	4.197,03	421,407	0,00**
Tempo	12	328,94	33,03	0,00**
Luz x tempo	12	65,31	6,56	0,00**
Resíduo	78	9,95		
Total	103			
CV (%)	3,66			
Média geral	86,14			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 16 C Resumo da análise de variância para clorofila a abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	0,021	0,15	0,70ns
Tempo	2	2,822	19,32	0,00**
Luz x tempo	2	0,540	3,70	0,04*
Resíduo	18	0,146		
Total	23			
CV (%)	11,87			
Média geral	3,22			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 17 C Resumo da análise de variância para clorofila b abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	3,88	213,08	0,00**
Tempo	2	1,66	91,40	0,00**
Luz x tempo	2	0,485	26,61	0,00**
Resíduo	18	0,018		
Total	23			
CV (%)	8,80			
Média geral	1,53			

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.

TABELA 18 C Resumo da análise de variância para clorofila total abacaxizeiro enraizado *in vitro*, em diferentes ambientes e avaliados nos diferentes tempos de aclimatização. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Luz	1	2,85	26,089	0,00**
Tempo	2	7,29	66,640	0,00**
Luz x tempo	2	0,456	4,02	0,05*
Resíduo	18	0,10		
Total	23			
CV (%)				
Média geral				

\* e \*\*Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste de F.