



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROCOLOGIA  
DOUTORADO EM AGROECOLOGIA

GIVAGO LOPES ALVES

**ESTABELECIMENTO *in vitro* DE ABACAXIZEIRO CV. TURIAÇU  
E POTENCIAL FOTOAUTOTRÓFICO EM DIFERENTES  
SISTEMAS DE CULTIVO**

São Luís, Maranhão  
2022

GIVAGO LOPES ALVES  
Engenheiro Agrônomo  
Mestre em agroecologia

**ESTABELECIMENTO *in vitro* DE ABACAXIZEIRO CV. TURIAÇU  
E POTENCIAL FOTOAUTOTRÓFICO EM DIFERENTES  
SISTEMAS DE CULTIVO**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor.

Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis - Orientador

São Luís, Maranhão  
2022

Alves, Givago Lopes.

Estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro cv. Turiaçu e potencial fotoautotrófico em diferentes sistemas de cultivo / Givago Lopes Alves. – São Luís, 2022.

113 f

Tese (Doutorado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis.

1.*Ananas comosus* L. Merr. 2.Fotoautotrofia. 3.Biorreatores de imersão temporária. 4.Membranas porosas a gases. 5.Eficiência fotoquímica. I.Título.

CDU: 634.774-154.31

**Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665**

GIVAGO LOPES ALVES  
Engenheiro Agrônomo  
Mestre em Agroecologia

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor.

Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis - Orientador

Aprovado em: 21 / 04 / 2022

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis  
Universidade Estadual do Maranhão - PPGA (Orientador)

Prof<sup>ta</sup>. Dra. Thais Roseli Corrêa  
Universidade Estadual do Maranhão - PPGA (Avaliadora)

Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro  
Universidade Estadual do Maranhão - PPGAA (Avaliador)

Prof. Dr. Eliemar Campostrini  
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF (Avaliador)

Prof. Dr. José Domingos Cochicho Ramalho  
Universidade de Lisboa - ULisboa (Avaliador)

Dedico a minha família, em especial a minha mãe Dona Fátima,  
por todo esforço a mim dedicado.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus por todas as bênçãos e graças concedidas, pois sem ele nada teria se concretizado. Deus é fiel.

À minha querida e maravilhosa mãe Maria de Fatima, heroína que sempre me deu apoio e incentivo em todas as horas difíceis. Te amo mãe.

Ao meu Pai Humberto Alves, pela força, apoio e incentivo.

Às minhas irmãs maravilhosas Thassia Alves e Larissa Alves, pelo apoio incondicional nesse processo, pelos conselhos, e por sempre acreditar e me apoiar. Amo vocês. Aos meus demais familiares: avós, tios e primos agradeço.

À minha Flor Beatriz Collins, por estar ao meu lado todos os dias, me apoiando e me compreendendo, dividindo as tristezas e alegrias que a vida nos tem dado, agradeço por todo amor, companheirismo e amizade. Você é fenomenal.

Ao meu orientador Prof. Fabrício de Oliveira Reis pelo exemplo de competência profissional, dedicação e disponibilidade que marcaram o seu papel de orientador, sem dúvidas um grande motivador para o meu crescimento profissional. Obrigado pelo tempo que compartilhou comigo. Obrigado!

À minha Co-orientadora profa Thais Roseli Corrêa, pelo exemplo de competência profissional, pelas sugestões e ideias concedidas no desenvolvimento desta pesquisa, pela amizade e gratidão às oportunidades por ela oferecidas a mim. Obrigado!

Ao Professor e pesquisador Marcos Vinícius Marques Pinheiro pelo exemplo de competência profissional, dedicação e sempre disposto a me ajudar, amigo e grande motivador para o meu crescimento profissional, suas colocações foram indispensáveis e me ajudaram a concluir minha pesquisa. Obrigado!

A todo corpo docente dos Programas de Pós-Graduação em Agroecologia (PPGA) e Agricultura e Ambiente (PPGAA), especialmente ao professor Fábio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo, que por muitas vezes disponibilizou seu tempo valioso para me ajudar. Obrigado!

À toda equipe do LCT-UEMA, que sempre estiveram presentes e me ajudaram a aprimorar e concluir esta pesquisa. Em especial a TÁCILA MARINHO por sempre se mostrar companheira, prestativa e uma verdadeira amiga em todos os momentos.

À FAPEMA pela concessão da bolsa

À Universidade Estadual do Maranhão, em nome do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia.

A todos que direta e indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho dedico um especial agradecimento.

## Sumário

Lista de figuras .....	9
Lista de Siglas e Abreviações .....	13
Resumo .....	14
Abstract.....	16
Capítulo I.....	18
Referencial teórico e introdução geral.....	18
1. Introdução geral.....	19
2. Referencial teórico .....	21
2.1 A cultura do abacaxi .....	21
2.2 Propagação <i>in vitro</i> do abacaxizeiro .....	23
2.3 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> : mixotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico.....	24
2.4 Trocas gasosas nos diferentes sistemas de cultivo.....	26
2.4.1 Sistema convencional.....	26
2.4.2 Biorreatores de imersão temporária .....	27
3. Hipóteses .....	29
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.2 Objetivos específicos .....	29
Referências .....	30
Capítulo II.....	37
Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ em diferentes sistemas de cultivo.....	37
Resumo .....	38
Abstract.....	39
1. Introdução.....	40
2. Material e métodos .....	42
2.1 Experimento I – Estabelecimento <i>in vitro</i> de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ .....	42
2.1.1 Obtenção do material vegetal.....	42
2.1.2 Desinfestação e estabelecimento <i>in vitro</i> .....	42
2.1.3 Delineamento experimental e variáveis analisadas.....	44
2.1.4 Análise estatística.....	45
2.2.1 Material vegetal e condições de cultivo .....	45
2.2.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas.....	47



2.2.3 Análise estatística.....	47
3. Resultados.....	48
4. Discussão .....	57
4.1 Experimento I – Estabelecimento <i>in vitro</i> de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ .....	57
5. Conclusões.....	61
Capítulo III .....	68
Avaliação da eficiência fotossintética de planta inteira e potencial fotoautotrófico do abacaxizeiro Turiaçu em diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i> .....	68
Resumo .....	69
Abstract.....	70
1. Introdução.....	71
2. Material e Métodos.....	72
2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	72
2.2 Medição das trocas gasosas de planta inteira em sistemas de cultivo <i>in vitro</i> .....	74
2.3 Delineamento experimental e variáveis analisadas.....	78
2.4 Área foliar e variáveis de massa fresca e seca .....	79
2.5 Volume radicular .....	79
2.6 Eficiência fotoquímica e índice SPAD .....	80
2.7 Pigmentos fotossintéticos.....	80
2.8 Índice estomático .....	81
2.9 Aclimação .....	81
2.10 Análises estatística .....	82
3. Resultados.....	82
3.1 Parâmetros de crescimento .....	82
3.2 Capacidade fotossintética.....	91
3.3 Aclimação .....	101
4. Discussão .....	102
5. Conclusões.....	107
Referências .....	108
Capítulo IV .....	112
Considerações finais.....	112
1. Considerações finais.....	113

## Lista de figuras

### Capítulo II

- Figura 1.** Mapa de localização do município de Turiaçu, na microrregião Gurupi, Maranhão, Brasil; Mapa do Brasil (A); Mapa do Maranhão (B); Microrregião do Gurupi (C); Plantio comercial e coleta de mudas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr.) cv. Turiaçu (D); mudas tipo filhote (E). ..... 42
- Figura 2.** Desinfestação de explantes (ápice caulinar e gema lateral) provenientes de mudas do tipo filhote de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu): muda tipo filhote (A); redução de 2/3 das folhas por corte transversal (B); mudas mantidas em hipoclorito 0,1% de cloro ativo por 24 horas (C); haste desfolhadas (D); mudas desfolhadas mantidas em fungicida Cercobin<sup>®</sup> por 15 minutos (E); haste (mudas desfolhadas) antes dos cortes realizados em fluxo laminar (F); gema lateral (G); ápice caulinar (H); explante inoculado em tubo de ensaio(I). Barras: A, B, D: 2cm; C, E, F: 10 cm; G, H, I: 0,5 cm. .... 43
- Figura 3.** Sistemas de imersão permanente: Tsm - tampas de polipropileno rígidas sem membranas permeáveis a gases, Tcm – tampa de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas permeáveis a gases (SIP-FV e SIP-FCM, respectivamente) (A) e biorreatores de imersão temporária tipo frascos simples Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF) na multiplicação *in vitro* de brotos de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu (B). Barras: A: 1 cm; B: 3 cm ..... 46
- Figura 4.** Porcentagem de contaminação por fungo (A), Porcentagem de contaminação por bactéria (B), gema lateral contaminada com fungo (C) e ápice caulinar contaminado com bactéria (D) de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias do estabelecimento *in vitro*. Legendas: Fg – Fungo; Bc – Bactéria; Gl – Gema lateral; Ap – Ápice caulinar. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras: C-D 0,5 cm. .... 49
- Figura 5.** Porcentagem de oxidação (%) (A), porcentagem de sobrevivência (%) (B), massa fresca de brotos (C) e número de brotos (D) de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias do estabelecimento *in vitro*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. .... 50

**Figura 6.** Explantes estabelecidos (%) de ápice caulinar e gema lateral de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiacu durante o estabelecimento *in vitro* no período dos 14 aos 50 DAI (A) e visualização de explantes típicos obtidos de ápice caulinar (B, C, D, E, F) e gema lateral (G, H, I, J, K) no mesmo período. Barras: B-K: 1 cm. .... 52

**Figura 7.** Plantas de *Ananas comosus* cv. Turiacu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas aos diferentes sistemas de cultivo (SIP – FV, SIP – FCM e BIT – PF) e concentrações de BAP (4, 8, 12 e 16  $\mu$ M de BAP). Barras: A-L: 1cm..... 54

**Figura 8.** Crescimento das plantas de *Ananas comosus* cv. Turiacu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas aos diferentes sistemas de cultivo e concentrações de BAP. Padrão de crescimento das plantas nos sistemas SIP – FV (4, 8, 12 e 16  $\mu$ M de BAP), SIP – FCM (4, 8, 12 e 16  $\mu$ M de BAP) e BIT – PF (4 e 8  $\mu$ M de BAP): Pa – Parte aérea, Rz – Raíz (A); Padrão de crescimento das plantas no sistema BIT – PF (12 e 16  $\mu$ M de BAP): Mb – Multibrotações (B). Barras: A-B: 1cm. .... 55

**Figura 9.** Comprimento de planta (cm) (A), número de folhas (B), Massa fresca da parte aérea (g) (C), massa seca da parte aérea (g) (D), número de brotos (E), massa seca de raiz (g) (F), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiacu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de sistemas de cultivo e concentrações de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de dentro de cada sistema de cultivo. Médias da concentração de BAP nos diferentes sistemas de cultivo sistemas de cultivo, seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. .... 56

### Capítulo III

**Figura 1.** Diferentes sistemas de cultivo utilizados no alongamento e enraizamento *in vitro* de brotações de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiacu. 1) Sistemas de imersão permanente (SIP-FV e SIP-FCM), Tsm - tampas de polipropileno vedada sem orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases, Tcm – tampa de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas permeáveis à gases (A); biorreatores de imersão temporária de frasco simples - Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF) (B) e biorreatores de imersão temporária de frascos duplos - Ralm<sup>®</sup> (BIT-RALM) (C). Barras: a: 1cm; b-c: 3cm. .... 73

**Figura 2.** Esquema da avaliação das trocas gasosas de planta inteira em sistemas de cultivo *in vitro*. (A) Bomba de ar; (B) Caixa pré-misturadora; (C) Console (LI-COR 6400 XT); (D) Cabeça do IRGA; (E, H) Fluxômetro; (F) Sistema de cultivo a ser avaliado (Biorreator com brotos); (G) Sensor de temperatura; (I) Cilindro com dessecante; (J) fonte de luz proveniente de diodos emissores de luz (LEDs -  $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )..... 75

**Figura 3.** Esquema da adaptação das tampas de polipropileno dos frascos para permitir a avaliação das trocas gasosas do abacaxi cv. Turiaçu *in vitro*. Tampa adaptada com parafusos vazados de polipropileno para entrada e saída de ar (A); Frasco de cultivo com plântula de abacaxi e tampa adaptada (B); Avaliação das trocas gasosas no frasco de cultivo (SIP-FV e SIP-FCM) (C); Avaliação das trocas gasosas no sistema de imersão temporária de frasco simples - Plantform® (BIT-PF) (D); Avaliação das trocas gasosas no sistema de imersão temporária de frasco duplo Ralm® (SIT-RALM) (E); Abreviaturas: Pv - parafuso vazado de polipropileno; Avs --Anel de vedação de silicone; Pc - Porca de polipropileno; Eaa – Entrada do ar de amostra; Saa – Saída do ar de amostra Barras: A-C: 1cm; D-E: 2cm..... 77

**Figura 4.** Crescimento das plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 15 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) nos vários sistemas de cultivo (SIP-FV, SIP-FCM, BIT-PF e BIT-RALM). Barras = 1cm. .... 83

**Figura 5.** Comprimento de planta (cm) (A), número de folhas (B), área foliar (C) volume de raiz ( $\text{cm}^3$ ) (D), comprimento de raiz (cm) (E), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose..... 86

**Figura 6.** Plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 15 e  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) nos vários sistemas de cultivo (SIP-FV, SIP-FCM, BIT-PF e BIT-RALM). Barras = 1cm. .... 87

**Figura 7.** Massa fresca da parte aérea (MFPA, g) (A), massa seca da parte aérea (MSPA, g) (B), massa fresca de raiz (MFR, g) (C), massa seca de raiz (MSR, g) (D), de

plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose..... 90

**Figura 8.** Curva de estabilização da leitura de assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> no abacaxizeiro cv. Turiaçu em função de diferentes tempos de avaliação para os diferentes tratamentos de sacarose, nos sistemas SIP-FV (A), SIP-FCM (B), BIT-PF (C) e BIT-RALM (D). Assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> de plantas *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de sistemas de cultivo e concentrações de sacarose (E). \*Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. .... 93

**Figura 9.** Conteúdo de clorofila a (A), clorofila b (B), carotenoide (C), clorofila total (D), clorofila total e carotenoides (E) de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose..... 96

**Figura 10.** Rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ). (A), densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS) (B), Índice fotossintético (PI) (C), Índice SPAD (D) Índice fotossintético % (E), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose..... 100

**Figura 11.** Porcentagem de sobrevivência das plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 30 dias de cultivo *ex vitro*, provenientes de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose. .... 101

## Lista de Siglas e Abreviações

ANA - Ácido naftalenoacético

Avs – Anel de vedação de silicone

BAP - 6- benzilaminopurina

CV – Cultivar

Eaa – Entrada do ar de amostra

Fv/Fm - Rendimento quântico máximo do FSII

MFPA - Massa fresca da parte aérea

MFR - Massa fresca de raiz

MSPA - Massa seca da parte aérea

MSR - Massa seca de raiz

Pc - Porca de polipropileno

PI - Índice fotossintético

PTFE – Politetrafluoroetileno

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

RFA - Radiação fotossisteticamente ativa

R<sub>L</sub>- Respiração na luz

Saa – Saída do ar de amostra

SIP-FCM - Frascos de vidro com imersão permanente em meio líquido associado a tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas permeáveis a gases

SIP-FV - Frascos de vidro com imersão permanente em meio líquido associado a tampas de polipropileno vedadas

BIT-PF - Biorreatores de imersão temporária de frasco simples tipo Plantform<sup>®</sup>

BIT-RALM - Biorreatores de imersão temporária de frascos duplos tipo Ralm<sup>®</sup>

Tcm – Tampa de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas permeáveis à gases

Tsm - Tampas de polipropileno rígidas sem orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases

## Resumo

O plantio de abacaxi ‘Turiaçu’ realizado no Maranhão é basicamente familiar e conduzido no sistema itinerante de corte e queima, ainda que passando por inovações no processo produtivo. Um problema que diminui a produção da cv. ‘Turiaçu’ e dificulta a conquista de novos mercados é a falta de produção de mudas padronizadas e de qualidade. Embora a micropropagação seja eficiente, uma alta taxa de mortalidade tem sido observada durante o processo de aclimatização devido a alterações fisiológicas causadas pelo ambiente *in vitro*. A utilização de tampas permeáveis a gases e biorreatores é uma alternativa que pode promover a modificação das trocas gasosas no ambiente de cultivo e proporcionar maior rusticidade as plântulas. Com isso, o objetivo geral do trabalho foi estabelecer a micropropagação para o abacaxi “Turiaçu” bem como avaliar a taxa de multiplicação e o potencial fotoautotrófico sob alteração nas concentrações da sacarose no meio em diferentes sistemas de cultivo. Para o capítulo II o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para o abacaxi “Turiaçu” bem como avaliar a taxa de multiplicação sob diferentes sistemas de cultivo. A fase de estabelecimento *in vitro* do experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x2, sendo quatro meios de cultura (MS + 2.5 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 4 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 8 µM BAP; e MS + 2 µM de ANA + 12 µM de BAP) e dois tipos de explantes (gema lateral e ápice caulinar), com 12 repetições por tratamento. Para a fase de multiplicação o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 3x4, sendo três sistemas de cultivo SIP-FV, SIP-FM e SIT-PF, quatro concentrações de BAP (4, 8, 12 e 16 µM), totalizando 12 tratamentos. O explante de ápice caulinar de abacaxi cv. Turiaçu inoculado em meio MS + 2 µM ANA + 8 µM BAP apresenta melhores respostas ao estabelecimento *in vitro*. Os resultados demonstram que o abacaxi Turiaçu utilizando o biorreator de imersão temporária Plantform (SIT - PF) com adição do meio de cultura MS + 2 µM ANA + 12 µM BAP apresenta melhores respostas quanto às taxas de multiplicação, com grande potencial para a produção de plantas em larga escala. Para o capítulo III: objetivou-se avaliar diferentes concentrações de sacarose em diferentes sistemas de cultivo no alongamento

e enraizamento *in vitro* de abacaxi cv Turiaçu visando o aperfeiçoamento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 4x4, com quatro sistemas de cultivo: frascos de vidro com imersão permanente em meio líquido associado a tampas de polipropileno sem orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FV); frascos de vidro com imersão permanente em meio líquido associado à tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FM); biorreatores de imersão temporária de frasco simples tipo Plantform<sup>®</sup> (SIT-PF); e biorreatores de imersão temporária de frascos duplos tipo Ralm<sup>®</sup> (SIT-RALM), associados a quatro concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>), totalizando 16 tratamentos. Os resultados demonstraram que abacaxizeiro cv. Turiaçu possui potencial fotoautotrófico, visto o desenvolvimento das plantas na ausência de sacarose e com a utilização dos sistemas que possibilitam as trocas gasosas. Os tratamentos BIT-RALM e BIT-PF possibilitaram maior rusticidade para as plantas. Além disso, a diminuição da sacarose do meio de cultivo aumentou a eficiência fotoquímica das plantas.

**Palavras chave:** *Ananas comosus* L. Merr, fotoautotrofia, biorreatores de imersão temporária, membranas porosas a gases, eficiência fotoquímica.



## Abstract

The planting of pineapple 'Turiaçu' carried out in Maranhão, is basically familiar, and conducted in the itinerant system of cutting and burning still going through innovations in the production process. A problem that decreases cv production. 'Turiaçu' and hinders the conquest of new markets is the production of standardized and quality seedlings. Although micropropagation is efficient, a high mortality rate has been observed during the acclimatization process due to physiological changes caused by the in vitro environment. The use of gas-permeable caps and bioreactors is an alternative that can promote the modification of gas exchange in the growing environment and provide greater rusticity to seedlings. Therefore, the general objective of the work was to establish the micropropagation for the pineapple "Turiaçu" as well as to evaluate the multiplication rate and photoautotrophic potential under alteration in the concentrations of sucrose of the medium in different cultivation systems. For chapter II. The objective of this work was to establish a micropropagation protocol for the pineapple "Turiaçu" as well as to evaluate the multiplication rate under different cultivation systems. The in vitro establishment phase of the experiment was conducted in a completely randomized design (IHD), in a 4 x 2 factorial scheme, being four culture media (DM + 2.5 µM BAP; MS + 2 µM de ANA + 4 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 8 µM BAP; and MS + 2 µM Of ANA + 12 µM BAP) and two types of explants (lateral yolk and stem apex), with 12 replicates per treatment. For the multiplication phase, the experiment was conducted in a completely randomized design (IHD), a 3x4 factorial scheme, with three sip-FV, SIP-FM and SIT-PF cultivation systems, four BAP concentrations (4, 8, 12 and 16 µM), totaling 12 treatments. The apex explant kaolin of pineapple cv. Turiaçu inoculated in MS medium + 2 µM ANA + 8 µM BAP presents better responses to in vitro establishment. The results show that turiaçu pineapple using platform temporary immersion bioreactor (SIT - PF) with the addition of ms + 2 µM ANA + 12 µM BAP culture medium presents better responses regarding multiplication rates, with great potential for large-scale plant production. For chapter III: the objective was to evaluate different concentrations of sucrose in different cultivation systems in the in vitro elongation and rooting of turiaçu pineapple in order to improve photoautotrophic micropropagation systems. The experiment was conducted in a completely randomized design (IHD), 4x4 factorial scheme, with four cultivation systems: glass vials with permanent immersion in liquid medium associated with polypropylene caps without

holes covered by porous membranes to gases (SIP-FV); glass vials with permanent immersion in liquid medium associated with polypropylene caps with two holes of 10 mm each, covered by porous membranes with gases (SIP-FM); Platform simple bottle temporary immersion bioreactors® (SIT-PF); and temporary immersion bioreactors of ralm® double vials (SIT-RALM), associated with four sucrose concentrations (0, 5, 15 and 30 g L<sup>-1</sup>), totaling 16 treatments. The results showed that pineapple cv. Turiacu has photoautotrophic potential, given the development of plants in the absence of sucrose and with the use of systems that enable gas exchange. The treatments BIT-RALM and BIT-PF were what allowed the greatest rusticity for the pineapple plants. In addition, the decrease in sucrose in the culture medium increased the photochemical efficiency of the plants.

**Keywords:** *Ananas comosus L. Merr.*, photoautotrophy, temporary immersion bioreactors, gas-porous membranes, photochemical efficiency.

---

## **Capítulo I**

### **Referencial teórico e introdução geral**

## 1. Introdução geral

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill; família Bromeliaceae) é uma espécie frutífera nativa de regiões tropicais da América, especialmente da América do Sul, na qual possui elevada importância comercial e posição de destaque no mundo devido ao consumo dos frutos de alto valor nutricional, seja *in natura* ou processado (KESSEL-DOMINI et al. 2022). No Brasil, a cultura do abacaxi é de grande importância econômica, sendo a terceira fruta tropical em termos de área de produção, com ampla distribuição no território nacional (COCK e LEAL, 2012). Na safra 2020, o Brasil teve uma área plantada de 65.049 hectares, uma produção de 1.637.126 milhões de toneladas, e rendimento médio de 25.269 kg/ha (IBGE, 2020).

O estado do Maranhão é o 4º lugar no ranking de produção de abacaxi na região nordeste e o 15º no ranking nacional (IBGE, 2020). O município de São Domingos do Maranhão tem uma representatividade de 74 % da área plantada com 52 % da produção, sendo considerado o maior produtor do Estado, seguido pelos municípios de Graça Aranha, Lago dos Rodrigues, Santa Inês, Colinas e Turiaçu.

No Maranhão, mais precisamente na Microrregião do Gurupi, no município de Turiaçu, é cultivado o abacaxi ‘Turiaçu’. No mercado consumidor regional, os frutos desta cultivar são muito apreciados, devido ao elevado teor de açúcares, peso médio e polpa amarelada. Contudo, o cultivo deste abacaxi ainda usa técnicas rústicas e tradicionais (ARAÚJO et al., 2012). De modo geral, a rusticidade na produção ainda é uma questão atual.

A propagação comercial do abacaxizeiro ocorre de forma vegetativa, e o método tradicional de propagação é realizada por meio de mudas formadas a partir de brotações laterais da planta, denominadas filhote, filhote-rebentão ou rebentão, o que contribui para a disseminação de doenças e pragas (COUTO et al., 2014). O uso deste tipo de muda depende muito de material vegetal, mão-de-obra e tempo, podendo aumentar os custos de produção, além de gerar material propagativo pouco uniforme em tamanho e vigor (SANTOS et al., 2011).

Com base nesses problemas, a cultura de tecidos é uma técnica de grande importância para o abacaxizeiro, pois proporciona a produção de milhares de mudas a partir de uma única gema, em pequeno intervalo de tempo e espaço físico, e totalmente

livres de pragas e doenças (SILVA et al., 2012). Contudo, a aplicação da técnica de micropropagação convencional ainda é limitada quanto às condições ambientais estabelecidas *in vitro* para as plantas. Estas plantas são cultivadas em frascos hermeticamente fechados, com ausência de trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa luminosidade e com a utilização de carboidratos em altas concentrações no meio de cultura (ARIGITA et al., 2002; ROGALSKI et al., 2003).

Embora esta técnica seja eficiente, uma alta taxa de mortalidade tem sido observada durante o processo de aclimatização devido às alterações fisiológicas causadas pelo ambiente *in vitro*, como mudanças no funcionamento dos estômatos e raízes, cutículas não desenvolvidas e ineficiência fotossintética (XIAO et al., 2011; KUMAR e RAO, 2012; SINGH et al., 2012). Estas alterações podem comprometer o funcionamento da maquinaria fotossintética no ambiente *in vitro*.

Para a redução destes problemas, uma possibilidade é o uso da propagação *in vitro* de plantas sob condições fotoautotróficas e em certas situações com o enriquecimento de CO<sub>2</sub> (KUBOTA, 2001; KOZAI, 2010; XIAO et al., 2011). Geralmente, em sistemas fotoautotrófico, a propagação *in vitro* de plantas resulta em melhoria do crescimento, redução das perdas por contaminações, maior vigor das plantas, maior sobrevivência durante a aclimatização e redução dos custos de produção. A utilização de biorreatores de imersão temporária (BIT) também surge como uma alternativa para promover a modificação das trocas gasosas no ambiente de cultivo, bem como associar esta utilização dos BIT's com o cultivo fotoautotrófico (YANG e YEH 2008; ARAGON et al. 2010).

Em particular, os BIT's oferecem vantagens para a produção de plantas em escala comercial devido à possibilidade de automação do sistema com base no meio líquido (LE et al., 2021). Além disso, o microambiente é facilmente controlado e as plantas podem absorver quantidades adequadas de água, nutrientes e fitohormônios provenientes do meio de cultura, bem como a radiação fotossinteticamente ativa (RFA) adequada da sala de cultivo (PAEK et al., 2005). Por isso, algumas alterações no cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico, como a redução da concentração de sacarose do meio de cultura, aliado a ventilação dos frascos de cultivo e a elevação da qualidade e da intensidade da RFA podem estimular o metabolismo fotossintético das plantas nestas condições, e assim produzir plantas mais rústicas e com melhor adaptação às condições

*ex vitro* (XIAO e KOZAI et al., 2004; FUENTES et al., 2007; DAMIANI; SCHUCH, 2008).

Nesse sentido, o presente estudo teve como um dos objetivos o estabelecimento *in vitro* do abacaxizeiro “Turiaçu”, bem como avaliar a taxa de multiplicação e o potencial fotoautotrófico sob alteração nas concentrações da sacarose do meio em diferentes sistemas de cultivo.

## **2. Referencial teórico**

### **2.1 A cultura do abacaxi**

O abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill é uma monocotiledônea, herbácea e perene, da família Bromeliaceae, em que todas as cultivares de interesse alimentar pertencem à variedade botânica *Ananas comosus* var. *comosus* (COPPENS d’EECKENBRUGGE; LEAL, 2003). Esta família apresenta 78 gêneros e 3659 espécies, e é considerada uma das famílias mais proeminentes com distribuição natural na América do Sul (GOUDA et al., 2018). O gênero *Ananas* é o mais importante da família e inclui o abacaxi, como uma das frutas tropicais mais apreciadas e consumidas no mundo, tanto *in natura* quanto na forma de produtos industrializados (LEAL et al., 2009; CASSAGO et al., 2022).

O Brasil é um dos maiores centros de diversidade genética de abacaxizeiro do mundo, contemplando, além de *Ananas comosus*, diversas espécies de *Ananas* e alguns gêneros próximos, como *Pseudananas* e *Bromelia*. Em várias regiões brasileiras, estas espécies são todas de ocorrência endêmica, o que mostra ampla variabilidade genética, notadamente da região Amazônica (FERREIRA et al., 2010). Atualmente o centro de diversidade do gênero *Ananas* se restringe a áreas localizadas entre as latitudes 10° N e 10° S e 55° W e 75° W de longitude (ARAÚJO et al., 2012).

As condições brasileiras apresentam vantagens para produção de abacaxi, quando comparado aos países concorrentes, devido às condições climáticas favoráveis, boas condições do solo, além da ampla disponibilidade de áreas (MORGADO, AQUINO e TERRA, 2004). No Maranhão, a produção de abacaxi é destacada por duas regiões produtoras, uma delas localiza-se no noroeste do Estado, no município de Turiaçu e a outra região mais central, em São Domingos do Maranhão. segundo dados

do IBGE (2020), o Estado é considerado o quarto maior produtor do Nordeste e o 14º do Brasil. Porém, a grande maioria dessa produção deve-se ao município de São Domingos do Maranhão, considerada hoje, o maior produtor do estado e responsável por inserir o Maranhão no mapa dos grandes produtores nacionais da cultura (IBGE, 2020).

O abacaxizeiro apresenta folhas com espinhos nos bordos e o número de filhotes por planta varia de 10 a 12. Algumas diferenças observadas no abacaxizeiro ‘Turiaçu’ em relação ao Pérola são: os olhos (cicatriz pistilar dos frutinhos) são mais proeminentes, o que pode facilitar o descascamento e maior rendimento de polpa; presença de micro-brotações na forma de mudinhas na base da coroa; e coloração verde violácea e até escarlate das folhas terminais quando a planta se encontra no estágio de florescimento; coloração da polpa amarelo intenso (ARAÚJO et al., 2004).

A cultivar ‘Turiaçu’ é um dos orgulhos maranhenses, muito apreciado e valorado no mercado consumidor local. Trata-se de uma seleção nativa da Amazônia Maranhense que apresenta importância socioeconômica e para a fruticultura no estado do Maranhão (REIS et al., 2019). As características físico-químicas do fruto de abacaxi ‘Turiaçu’ apresentam elevado teor de sólidos solúveis totais (média de 16,1 °Brix), baixa acidez (média de 0,38 %) e elevada relação do teor de sólidos solúveis totais/acidez (42,3) (ARAÚJO et al., 2012). Sabe-se que condições climáticas, estádios de maturação, diferenças varietais, nutrição mineral das plantas, entre outros fatores, exercem influência acentuada na composição química do abacaxi (BENGOZI et al., 2007).

O sistema de produção do abacaxizeiro ‘Turiaçu’ tem passado por modificações, através da adoção de tecnologias como utilização de espaçamentos que proporcionem maior densidade de plantas por hectare (ARAÚJO et al., 2010), padronização da colheita via indução de florescimento (AGUIAR JÚNIOR et al., 2012), estádio de maturação adequados a comercialização (SILVA, et al., 2012), estas tecnologias vêm garantindo a manutenção e renovação de áreas produtivas, tendo em vista que a maioria dos produtores fazem uso sistema tradicional, com plantio rústico e completamente manual.

## 2.2 Propagação *in vitro* do abacaxizeiro

A formação de plantas a partir de gemas apicais de mudas de abacaxi, cultivadas *in vitro*, foi demonstrada inicialmente por Sita et al. (1974), Mathews e Rangan (1979) e Zepada e Sagawa (1981). A produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro é uma alternativa que vem sendo oferecida nos últimos anos a partir de diferentes protocolos já estabelecidos (GUERRA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2009). Além disso, a micropropagação torna-se uma técnica mais vantajosa aos métodos tradicionais de propagação, incluindo produção de clones verdadeiros, multiplicação adicional de materiais livres de doenças e resgate de plantas (KRISANTINI, 2018). Até o momento, não há referências sobre a micropropagação do abacaxizeiro ‘Turiaçu’, porém, para os cultivares mais comuns vários trabalhos são encontrados, o que auxiliou na pesquisa desta cultivar.

As principais etapas do processo de micropropagação de plantas são: seleção das plantas matrizes; resgate, isolamento e o estabelecimento dos explantes *in vitro*; multiplicação de brotos; alongamento e enraizamento dos brotos e aclimatização das mudas micropropagadas (CORREIA et al., 2011).

Os hormônios vegetais são substâncias endógenas essencialmente produzidos nos tecidos vegetais, podendo ou não atuarem no tecido onde foram produzidos. Quando estes hormônios não atuam *in loco*, são transportados até o tecido onde desempenharão o seu papel fundamental. Entretanto, quando se trabalha com substâncias exógenas e sintéticas que desempenham papel análogo ao dos hormônios nos tecidos vegetais, estas substâncias são denominadas de reguladores de crescimento (CANHOTO, 2010). Estes reguladores de crescimento quando adicionados ao meio de cultivo induzem respostas fisiológicas aos explantes, promovendo então o seu crescimento *in vitro*. Dentre os reguladores de crescimento mais usuais na cultura de tecido pode-se citar as auxinas e citocininas, e em alguns casos faz-se uso de giberelinas e ácido abscísico (FURTADO, 2009).

Para iniciar o cultivo *in vitro* e para o posterior crescimento e desenvolvimento das plantas, são utilizados reguladores vegetais, principalmente citocininas e auxinas. As citocininas promovem o desenvolvimento das brotações por aumento da divisão celular (SCHMÜLLING, 2002). A combinação de auxinas e citocininas tem sido reconhecida há muito tempo como potenciais moléculas sinalizadoras que controlam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (FAISAL et al., 2018). Altos níveis de



citocininas juntamente com baixos níveis de auxinas afetam sinergicamente a divisão celular e a regeneração de plantas *in vitro* (FÁTIMA et al., 2011). A aplicação de citocininas no meio de cultura quebra a dominância apical e promove a formação de brotos (CHENG et al., 2013). As auxinas são promotoras a diversos processos fisiológicos nas plantas, inclusive ao controle do crescimento de brotações laterais, raízes e dominância apical (LIU et al., 2022).

O meio de cultura mais utilizado para a micropropagação do abacaxi é o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com reguladores vegetais. Cabral et al. (1984) obtiveram para o cultivar Smooth Cayenne, formação de gemas múltiplas e enraizamento em meio MS líquido com variações de BAP (6-Benzilaminopurina), NAA (ácido naftalenoacético) e IAA (ácido indol-3-acético). Os mesmos resultados foram relatados por Piza (2000).

Segundo Almeida et al. (2002), é possível produzir 161.080 plantas de abacaxi após oito meses, partindo de apenas uma planta com oito mudas e dez gemas axilares cada. Esta quantidade é suficiente para o cultivo de 2,3 ha em plantio adensado (70.000 plantas/ha) (SANTANA et al., 2001). Utilizando o método convencional de propagação de abacaxizeiro, levaria sete anos e seis meses para obter 32.700 plantas a partir de uma planta inicial, o que seria suficiente para, aproximadamente, 0,5 ha (MATOS et al., 1988). Esta comparação demonstra a vantagem da micropropagação do abacaxizeiro em relação à propagação convencional.

Segundo Borges et al. (2009), a micropropagação permite a obtenção de milhares de mudas a partir de uma única planta matriz selecionada, além da possibilidade de produção o ano todo, uma vez que esta técnica independe de mudanças sazonais. Contudo, a aplicação da técnica de micropropagação convencional ainda é limitada quanto às condições ambientais estabelecidas *in vitro* para as plantas. Estas plantas são cultivadas em ambiente fechado, com ausência de trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa luminosidade e com a utilização de açúcares em altas concentrações no meio de cultura como fonte de carbono e energia (ARIGITA et al., 2002; ROGALSKI et al., 2003).

### **2.3 Tipos de cultivo *in vitro*: mixotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico**

A micropropagação é um método utilizado para desenvolver e propagar células vegetais, tecidos ou órgãos sob condições assépticas (KRISANTINI, 2018). Em se

tratando de produção de mudas, a qualidade destas mudas é determinada por suas características genéticas, fisiológicas e morfológicas (SILVEIRA, 2015). Desta forma, os sistemas de cultivo que estão sob a presença de luz, são divididos em: mixotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico. Nas condições de um sistema mixotrófico, as mudas são mantidas em meio de cultura com reguladores de crescimento e açúcares, em salas de crescimento dentro de frascos vedados, mantidos sob baixa luminosidade, com temperatura e umidade controladas. A denominação do sistema mixotrófico vem do fato dos explantes estarem nas condições de trocas gasosas limitadas e os carboidratos exógenos são a única fonte de energia para o vegetal (KOZAI et al., 2005). A vedação dos frascos é uma justificativa para evitar a contaminação dentro dos frascos de cultivo, e assim diminuir as perdas dos explantes. Porém, a vedação do frasco causa acúmulo de gás etileno e o aumento da umidade relativa dentro dos frascos (XIAO et al., 2011). Isto resulta em alterações morfológicas e funcionamento irregular da maquinaria fotossintética, além da hiperhidricidade e crescimento reduzido dos explantes (KOZAI e KUBOTA, 2001).

Para as condições do sistema fotomixotrófico as plantas são mantidas nas mesmas condições de cultivo do sistema mixotrófico, exceto pela presença das trocas gasosas dentro dos frascos de cultivo. Nesse sistema ocorre ventilação dentro dos frascos de cultivo, o que normaliza a transpiração do vegetal e faz com que os estômatos se tornem funcionais (SILVEIRA, 2015). Esta ventilação pode ser feita de várias maneiras como, por exemplo, utilização de tampas com membranas permeáveis a gases, além do uso de biorreatores de imersão temporária (SALDANHA et al., 2012; PEREZ et al., 2013). Nas condições fotomixotróficas, as plantas utilizam tanto o CO<sub>2</sub> provenientes da ventilação do sistema, quanto a sacarose disponível no meio como fonte de energia (KOZAI et al., 2005).

No cultivo fotoautotrófico, a sacarose é totalmente retirada do meio de cultura, ne ainda utiliza das trocas gasosas, pois o crescimento dos explantes é obtido por meio da capacidade fotossintética e da absorção dos nutrientes inorgânicos presentes no meio de cultura pelo próprio explante (BARBOSA, 2016). Isso ocorre pois com a ventilação dos frascos os estômatos se tornam funcionais, fato este que reduz consideráveis perdas durante a adaptação das mudas ao ambiente *ex vitro* na aclimatização (KOZAI et al., 2005). Esta forma de cultivo pode ser chamada também de cultivo fotossintético *in*

*vitro*, cultivo inorgânico ou cultivo isento de açúcar (KOZAI, 1991; KOZAI, et al., 2005).

## **2.4 Trocas gasosas nos diferentes sistemas de cultivo**

### **2.4.1 Sistema convencional**

A micropropagação convencional requer a vedação do frasco para evitar a contaminação do explantes, ou seja, a entrada de agentes contaminantes nos frascos de cultivo. Na cultura de tecidos são utilizadas tampas rígidas de polipropileno, filmes de Policloreto de Vinila (PVC), tampas metálicas, dentre outros (BARBOSA, 2016). Esta vedação do frasco limita as trocas gasosas com o ambiente, que causam problemas em algumas espécies durante o cultivo *in vitro* e durante a aclimatização (NGUYEN e KOZAI, 2005; ALVAREZ et al., 2012).

A micropropagação convencional fornece baixas concentrações de CO<sub>2</sub>. Além disso, as plantas nesse sistema apresentam um mau funcionamento estomático, cutículas pouco desenvolvidas, folhas com baixos níveis de clorofila e hiperhidricidade das plântulas (POSPISILOVA et al., 1999). As plântulas *in vitro* precisam de um período de aclimatação para ajustar suas anormalidades anatômicas e melhorar seu desempenho fisiológico para garantir a sobrevivência em condições *ex vitro*. Ainda, a aclimatação pode levar várias semanas, dependendo da espécie (KRISANTINI, 2018). As plântulas têm que se adaptar rapidamente a partir de um cultivo mixotrófico ou fotomixotrófico em um crescimento autotrófico, e desenvolver um melhor controle da transpiração através dos estômatos e cutículas (DA SILVA et al., 2017).

Algumas alterações no sistema de cultivo podem ser realizadas, como o uso de membranas permeáveis a gases (SALDANHA et al., 2012), proporcionando aumento das trocas gasosas dos frascos de cultivo, elevação da qualidade e da intensidade de luz, e redução de carboidrato no frasco de cultivo, e assim, melhorar a eficiência fotoquímica e a assimilação fotossintética do carbono, o que se pode produzir plantas mais rústicas metabolicamente (XIAO; KOZAI, 2004; FUENTES et al., 2007; DAMIANI; SCHUCH, 2008). Com a elevação das trocas gasosas, as plantas podem ser fisiologicamente mais desenvolvidas, proporcionando maior resistência durante o processo de aclimatização *ex vitro* (KOZAI, 2010; XIAO et al., 2011; BATISTA et al., 2017).

As membranas porosas podem favorecer o crescimento dos explantes *in vitro* e controlar as concentrações de etileno diminuindo a abscisão foliar das plantas *in vitro*. Além das vantagens das membranas na fase *in vitro*, favorecem também o aumento da taxa de sobrevivência e o crescimento e desenvolvimento durante a etapa de aclimatização (ZOBAYED et al., 2000; SHIM et al., 2003; PINHEIRO et al., 2013).

#### **2.4.2 Biorreatores de imersão temporária**

Dentre os sistemas de cultivo que vêm sendo desenvolvidos para melhoria do processo de produção de mudas *in vitro*, focando a redução dos custos, destacam-se os sistemas de biorreatores (LORENZO et al., 1998). Os biorreatores de imersão temporária foram projetados para a propagação em massa de tecidos, embriões ou órgãos expostos ao meio líquido por um determinado tempo e frequência. Existem vários modelos de biorreatores, que foram descritos por vários autores (ETIENNE e BERTHOULY, 2002; GEORGIEV et al., 2014; WELANDER et al., 2014; GATTI et al., 2017). No geral, o sucesso da micropropagação em biorreatores de imersão temporária é em grande parte determinado pela frequência de imersão a que os explantes são submetidos e o volume de meio líquido inicial em relação ao número de explantes inoculados (WATT, 2012).

A pressurização do ar no sistema de imersão temporária contribui para a melhorar as trocas gasosas das plantas dentro do sistema, além de favorecer a menor ocorrência de distúrbios fisiológicos nas plantas. Alguns biorreatores têm a opção adicional de enriquecer o “headspace” com CO<sub>2</sub> durante o período de exposição ao gás (GEORGIEV et al., 2014). Níveis ótimos de CO<sub>2</sub> podem ter efeitos positivos na multiplicação do tecido vegetal, atividade fotossintética e morfologia de órgãos (ARAGÓN et al., 2010; YANG et al., 2010). Além disso, sistemas de imersão temporária não utilizam dispositivos de agitação mecânicos, assim o deslocamento dos propágulos cultivados, se houver, é feito apenas pelo poder das forças hidrodinâmicas durante os períodos de imersão. Sob estas condições, os tecidos da planta cultivada sofrem menos estresse que preserva a integridade da cultura e melhora adicionalmente a morfologia e fisiologia das plantas (GEORGIEV et al., 2014).

Uma das principais vantagens de utilizar biorreatores no cultivo *in vitro* de plantas em relação ao sistema convencional se deve principalmente ao uso do meio

nutritivo líquido visto que proporciona incremento em produtividade e eficiência do processo de micropropagação (ETIENNE et al., 2006; PENCHEL et al., 2007) Além disso, a imersão temporária tornou-se uma técnica muito útil para alcançar a propagação em massa, reduzir custos e aumentar as taxas de multiplicação durante o cultivo *in vitro* de plantas (RAMOS-CASTELLÁ et al., 2014 ; FRÓMETA et al., 2017 ; VIVES et al., 2017), favorecendo, além disso, o processo de aclimação, pois favorecerem a fotoautotrofia (ARAGÓN et al., 2014 ).

Atualmente o mercado dispõe de diferentes tipos de biorreatores de imersão temporária, dentre eles destaca-se os biorreatores de imersão temporária de frasco simples PLANTFORM<sup>®</sup> e os biorreatores de imersão temporária de frasco duplo RALM<sup>®</sup>. O biorreator Plantform<sup>®</sup> foi desenvolvido recentemente por Welander et al. (2014) os autores destacam que a principal vantagem deste biorreator é que ele possui um fundo interno relativamente maior para o crescimento das plantas e um tamanho adequado para manuseio. Além disso, tais biorreatores poderiam ser colocados um sobre o outro para economizar espaço de cultivo, o que é mais atrativo para produção em larga escala. Feito de policarbonato transparente com dimensões de 180 × 160 150 mm. Nesse biorreator, as plantas e o meio de cultura permanecem no mesmo recipiente. Entretanto, a construção e colocação da cesta foi projetada de forma que as plantas só fiquem imersas no meio líquido quando a pressão do ar é aplicada ao biorreator. Além disso, o biorreator possui três orifícios de abertura para fornecimento de meio, aeração e ventilação (WELANDER et al., 2014).

Os biorreatores de frasco duplo são compostos por dois recipientes, com volume variável, um para o crescimento das plantas e outro para o meio de cultura (GEORGIEV et al., 2014). A tampa de cada recipiente contém duas entradas, onde uma delas permite a passagem de uma mangueira que conecta os interiores dos dois recipientes e a outra entrada conecta cada recipiente a um compressor de ar estéril (LIU et al., 2010) A pressão de ar vinda de um compressor empurra o meio de um recipiente para o outro embebendo completamente as plantas (SCHERER et al., 2013). Após um período programado, o fluxo de ar então é revertido retirando o meio do recipiente contendo as plantas (GEORGIEV et al., 2014)

### **3. Hipóteses**

H1: Os diferentes explantes influenciam no estabelecimento *in vitro* e maior crescimento das plantas de abacaxizeiro;

H2: A multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro cv. Turiaçu em biorreatores terá sucesso em relação ao sistema convencional;

H3: Os sistemas que permitem as trocas gasosas proporcionam um melhor funcionamento do aparato fotossintético das mudas e reduz o estresse destas quando aclimatizadas.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo geral**

Estabelecer a micropropagação para o abacaxizeiro cv. Turiaçu bem como avaliar a taxa de multiplicação e o potencial fotoautotrófico sob alteração nas concentrações da sacarose do meio e em diferentes sistemas de cultivo.

#### **4.2 Objetivos específicos**

Estabelecer o melhor tipo de explante para uma micropropagação mais eficiente do abacaxizeiro Turiaçu.

Avaliar os aspectos ecofisiológicos *in vitro* do abacaxizeiro, em diferentes sistemas de cultivo, com a alteração na concentração de sacarose no meio de cultura.

Produzir mudas com maior desempenho fotossintético e com maior rusticidade, favorecendo o processo de adaptação à condição *ex vitro*.

## Referências

- AGUIAR JÚNIOR, R. A. ; ARAUJO, J. R. G. ; CHAVES, A. M. S. ; FIGUEIREDO, R. T. ; REIS, F.O. Indução floral de abacaxizeiro cv. Turiapu com diferentes doses e formas de aplicação de carbureto de cálcio e etephon. In: XXII Congresso Brasileiro de fruticultura, 2012, Bento Gonçalves-RS. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura - Anais. Vitória da Conquista - BA: SBF - **Sociedade Brasileira de fruticultura**, 2012.
- ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA,G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.P.C.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.296-300, 2002.
- ARAGÓN, C. E; SÁNCHEZ, C.; GONZALEZ-OLMEDO, J.et al. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. **Biologia Plantarum**, v. 58, n. 1, p. 29-38, 2014.
- ARAGON, C.; ESCALONA,M., RODRIGUEZ, R., CAÑAL, M. ET AL., Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** , v.46, p. 89-94, 2010.
- ARAUJO, J. R. G.; AGUIAR JÚNIOR, R. A. ; CHAVES, A. M. S. ; SILVA, A. G. P. ; FIGUEIREDO, R. T. ; GUISTEM, J. M. ; MARTINS, M. R. . Influência de espaçamentos em fileiras simples nas características físicas e qualidade de frutos de abacaxi Turiapu (*Ananas comosus* L. Merrill). 2010.
- ARAÚJO, J. R. G.; AGUIAR, R. A. J.; CHAVES, A. M. F.; REIS, F. O.; MARTINS, M. R. Abacaxi ‘Turiapu’: cultivar tradicional nativa do Maranhão. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 1270-1276, 2012.
- ARAUJO, J.R.G.; MARTINS, M.R.; SANTOS, F. N. Fruteiras nativas - ocorrência e potencial de utilização na agricultura familiar do Maranhão. In: MOURA, E.G. (Coord). Agroambientes de Transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. São Luís: UEMA/IICA, p. 257-312, 2004.
- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, n. 115, p. 166-173, 2002.
- BARBOSA, ROBERTO RIVELINO DO NASCIMENTO. Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 65f. 2016.
- BATISTA, D. S.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. SALDANHA, C. W.; OTONI, W. C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3. 2017.
- BENGOZI, F. J.; SAMPAIO, A. C.; SPOTO, M. H. F.; MISCHAN, M. M.; PALLAMIN, M.L. Qualidades físicas e químicas do abacaxi comercializado na CEAGESP São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.3, 2007.

- BENGOZI, F. J.; SAMPAIO, A. C.; SPOTO, M. H. F.; MISCHAN, M. M.; PALLAMIN, M.L. Qualidades físicas e químicas do abacaxi comercializado na CEAGESP São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.3, 2007.
- CABRAL, J. R. S.; CUNHA, G. A. P.; RODRIGUES, E. M. Micropropagação do abacaxizeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, V. Florianópolis, 1983. **Anais. Florianópolis**, SBF. v.5, p.124-7. 1984.
- CANHOTO, J.M. Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra: [s.n.] p. 407,2010.
- COCK, W.R.S.; LEAL, N.R.; Productive performance and vitamin c content in *ananas comosus* L. merrill submitted to different periods of flower induction. **Acta Horticulturae**, v. 1, n.928, p. 205-210, 2012.
- COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K.G. The pineapple: botany, production, and uses. New York: CAB International, p.13-32, 2003.
- CORREIA, D.; BORGES, N. S. S.; RIBEIRO, E. M.; MORAIS, J. P. S. Produção de Mudanças In Vitro e Indução Floral de Abacaxizeiro Ornamental. Documentos 134, **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza ISSN 2179-8184, 2011.
- COUTO, T. R.; SILVA, J. R.; NETTO, A. T.; CARVALHO, V. S.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados in vitro em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 459-466, 2014.
- DA SILVA, T.J.A.; MUSHARO, M.; SHARMA, M.; DOBRANSZKI, J.; CARDOSO, J.C.; AND ZENG, S. Acclimatization of in vitro derived Dendrobium. **Horticultural Plant Journal** 3, 110- 124, 2017.
- DAMIANI, C.R., SCHUCH, M.W. Multiplicação Fotoautotrófica de Mirtilo, Cv. Georgiagem. **Anais. III Simpósio Nacional do Morango, II Encontro Sobre Pequenas Frutas e frutas nativas do Mercosul**, Pelotas. p.71-78. 2008.
- ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 3, p. 215-231, 2002.
- FRÓMETA, O. L. M.; ESCALONA M, M.M.; TEIXEIRA. S, J.A. et al. In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 543-551, 2017.
- FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARÍA, J.M. Low exogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. **Acta Horticulturae**, v. 748. p. 151-156. 2007.
- FURTADO, M.B. Indução e controle da embriogênese somática em *O. Catharinensis* e *O. odorifera*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. 2009.
- GATTI, E.; SGARBI, E.; OZUDOGRU, E. A.; LAMBARDI, M. The effect of Plantform™ bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to a



conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, n. 151, v.6 , p. 1129-1136. 2017.

GEORGIEV, V., SCHUMANN, A., PAVLOV, A., & BLEY, T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in life sciences**, n. 14, v. 6, p. 607-621. 2014.

IBGE, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento de Safras Agrícolas, 2020.

KESSEL-DOMINI, A.; PÉREZ-BRITO, D.; GUZMÁN-ANTONIO, A.; BARREDO-POOL, F. A; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; CORTÉS-VELÁZQUEZ, A.; CANTO-FLICK, A.; AVILÉS-VIÑAS, S. A.; RODRÍGUEZ-LLANES, Y.; SANTANA-BUZZY, N. Indirect Somatic Embryogenesis: An Efficient and Genetically Reliable Clonal Propagation System for Ananas comosus L. Merr. Hybrid “MD2”. **Agriculture**, v. 12, p. 713, 2022.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**. v. 10. p. 188–204. 2010.

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. **Netherlands: Springer**, 2005.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, p. 525-537, 2001.

KRISANTINI, N. M. A. W. Photoautotrophic System: A Review and Potential Applications in Plant Micro Propagation, **Journal of Tropical Crop Science**. v. 5 n. 2, 2018.

KUMAR, K.; RAO, I.U. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in-ex vitro conditions-a review. **Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants**, n. 2, v. 4, p. 271-283, 2012.

LEAL, A. J. F.; HORA, R. C.; TONIN, T. A.; BOLIANI, A. C. Viabilidade econômica do cultivo de abacaxi no arenito Caiuá, região noroeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá. v. 31, n. 2, p. 353-358, 2009.

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

MATHEWS, V.H.;RANGAN, T.S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant ‘in vitro’ culture of pineapple. **Science Horticultural**, v.11, n.4, p.519-528, 1979.

MATOS, A. D.; CABRAL, J.; SOUZA, A. D. S.; FUKUDA, W.; SANTOS FILHO, H. P.; DANTAS, J. Uso da cultura de tecidos no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **ABCTP Notícias**, Brasília, v. 8, p. 2-5, 1998.

MORGADO, I. F.; AQUINO, C. N. P.; TERRA, D. C. T. Aspectos econômicos da cultura do abacaxi: sazonalidade de preços no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p.44-47, 2004.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**, Rehovot, v.15, p.473-97, 1962.
- NGUYEN, Q. T., KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S. M. A. (eds) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Dordrecht: **Springer**, p. 123-146, 2005.
- PÉREZ, M.; BUENO, M. A.; ESCALONA, M.; TOOROP, P.; RODRÍGUEZ, R., & CAÑAL, M. J. (2013). Temporary immersion systems (RITA®) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. **Trees**, n. 27, v. 5, p. 1277-1284, 2013.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. (2013) Trocas gasosas influenciam na morfogênese in vitro de duas cultivares de oliveira (*olea europaea* l.). **Revista Árvore**, Viçosa – MG, 19-29. 2013.
- PIZA, I.M.T. Bromelina e peroxidase em plantas de *Ananas comosus* L. Merrill, sob condições de salinidade “in vitro”. 2000. 117p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2000.
- POSPISILOVA, J., TICHA, I., KADLECEK, P., HAISEL, D., AND PLZAKOVA, S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum** n. 42, p. 481-497, 1999.
- RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L.G.; BELLO-BELLO, J. *et al* et al. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 5, p. 576-581, 2014.
- ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. Micropropagados. **Revista Brasileira de fruticultura**, n. 25, v. 2, p. 417-423, 2003.
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L F. de; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. do; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.
- SANTANA, L.L de A.; REINHARDT, D.H.; CUNHA, G.A.P. da; CALDAS, R.C. Altas densidades de plantio na cultura do abacaxi cv. Smooth Cayenne, sob condições de sequeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 353-358, 2001.
- SANTOS, P.C.; FREITAS, S.J.; FREITAS, M.S.M.; SOUSA, L.B.; CARVALHO, A.J.C. Produção de mudas do tipo rebentão, utilizando coroas de três cultivares de abacaxi inoculadas com fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.954-961, 2011.
- SCHMÜLLING, T. New insights into the functions of cytokinins in plant development, **Journal of Plant Growth Regulators**, v.21, p.40–49, 2002.
- SHIM, S. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. (2003) In vitro and ex vitro growth of grapevine rootstock „5BB” as influenced by number of air exchanges and the presence

or absence of sucrose in culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 57-62, 2003.

SILVA, A. D.; PASCOAL, M.; ARAÚJO, A. G.; BRAGA, F. T.; CASTRO, E. M.; ALBERT, L. H. B. Morfofisiologia e anatomia foliar de mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne em diferentes substratos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.5, p. 580-586, 2012.

SILVEIRA, A. A. C. Criopreservação de ápices caulinares e micropropagação em condições heterotróficas e mixotróficas de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas)–Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SINGH, N.V.; SINGH, S.K.; SINGH, A.K.; MESHRAMA, D.T.; SUROSHE, S.S.; MISHRA, D.C. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets. **Scientia Horticulturae**. n. 136, p. 122-127, 2012.

SITA, G. L.; SINGH, R. & IYER, C. P. A. Plantlets through shoot-tip cultures in pineapple. **Current Science**, v.43, p.724-5, 1974.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A. S. (Eds.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, p. 177-205. 2009.

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

VIVES, KAREL.; ANDÚJAR, I., LORENZO, J.C. et al. Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, n. 1, p. 195-199, 2017.

WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p. 14025-14035, 2012.

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

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

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

YANG, L., ZAMBRANO, Y., HU, C.-J., CARMONA, E. et al., Sugarcane metabolites produced in CO<sub>2</sub>-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum*

lycopersicum) resistance against bacterialwilt (*Ralstonia solanacearum*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, n. 46, p. 558–568, 2010.

ZEPADA, C. & SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. **Hortscience**, v.16, n.4, p.495, 1981.

ZOBAYED, S. M. A. *In vitro* propagation of Lagerstroemia spp. From nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. **Environmental Control in Biology**. 38: 1–11, 2000.

FAOSTAT, F. A. O. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome. 2021.

LE, K. C.; DEDICOVA, B.; JOHANSSON, S.; LELU-WALTER, M.-A.; EGERTSDOTTER, U. Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry). **Biotechnology Reports**, v. 32, p. e00684, 2021.

GOUDA, E. J.; BUTCHER, D.; GOUDA, C. S. (cont. updated). Encyclopaedia of Bromeliads, Version 4, 2018.

CASSAGO, A. L. L.; SOUZA, F. V. D.; ZOCCOLO, G. J.; DA COSTA, F. B. Metabolomics as a tool to discriminate species of the Ananas genus and assist in taxonomic identification. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 100, p. 104380, 2022.

FATIMA, N.; AHMAD, N.; ANIS, M. Enhanced *in vitro* regeneration and change in photosynthetic pigments, biomass and proline content in *Withania somnifera* L.(Dunal) induced by copper and zinc ions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 1465-1471, 2011.

FAISAL, M.; AHMAD, N.; ANIS, M.; ALATAR, A. A.; QAHTAN, A. A. Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 273-277, 2018.

CHENG, Z. J; WANG. L.; SUN. W.; ZHANG. Y.; ZHOU. C.; et al. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. **Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 240-251, 2013.

LIU, W.; PENG, B.; SONG, A.; ZHANG, Y.; JIANG, J.; CHEN, F. Sucrose-induced bud outgrowth in *Chrysanthemum morifolium* involves changes of auxin transport and gene expression. **Scientia Horticulturae**, v. 296, p. 110904, 2022.

WELANDER, M.; PERSSON, J.; ASP, H.; ZHU, L. H. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 227-232, 2014.

LIU, L.; LI, S.; YU, K.; TANG, H. et al., Rapid propagation of virusfree sugarcane plantlets via temporary immersion bioreactor system. **Hunan Agricultural Science and Technology**. n. 11, p. 148–150. 2010.

SCHERER, R. F., GARCIA, A. C., FRAGA, H. P. D. F., VESCO, L. L. D. et al., Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae** . n, 151, p. 38-45. 2013.

REIS, F.O.; ARAUJO, J.; BRAUN, H.; JUNIOR, A.; PEREIRA, A. Fruit quality of a traditional pineapple cultivar (Turiapu) compared to the most popular cultivar (Pérola) in Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.13, n.4, p.546-551, 2019.

---

## Capítulo II

**Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro ‘Turiapu’ em diferentes sistemas de cultivo**

## Resumo

A cultura do abacaxi da cultivar Turiaçu é importante para o setor frutícola, pois apresenta atributos bastante apreciados pelo mercado consumidor. Suas técnicas de propagação são limitadas, mas a cultura de tecidos pode ser uma ferramenta biotecnológica eficiente para superar tais desafios e alcançar a eficiência na produção de mudas de qualidade fitossanitária, totalmente livre de pragas e doenças. Diante do exposto, objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação para o abacaxi “Turiaçu” bem como avaliar a taxa de multiplicação sob diferentes sistemas de cultivo. Para a fase de estabelecimento *in vitro* o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro meios de cultura (MS + 2.5 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 4 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 8 µM BAP; e MS + 2 µM de ANA + 12 µM de BAP) e dois tipos de explantes (gema lateral e ápice caulinar), com 12 repetições por tratamento. Para a fase de multiplicação o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 3x4, sendo três sistemas de cultivo SIP-FV, SIP-FCMe BIT-PF, quatro concentrações de BAP (4, 8, 12 e 16 µM), totalizando 12 tratamentos. O explante de ápice caulinar de abacaxi cv. Turiaçu inoculado em meio MS + 2 µM ANA + 8 µM BAP apresenta melhores respostas ao estabelecimento *in vitro*. Os resultados demonstram que o abacaxi Turiaçu utilizando o biorreator de imersão temporária Plantform (BIT-PF) com adição do meio de cultura MS + 2 µM ANA + 12 µM BAP apresenta melhores respostas quanto as taxas de multiplicação, com grande potencial para a produção de plantas em larga escala.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* L. Merr., propagação *in vitro*, biorreatores de imersão temporária

## Abstract

The pineapple crop of Turiaçu cultivar is important for the fruit sector, because it presents attributes highly appreciated by the consumer market. Its propagation techniques are limited; however, tissue culture can be an efficient biotechnological tool to overcome such challenges, and achieve efficiency in the production of plant quality seedlings totally free of pests and diseases. In view of the above, the objective of this study was to establish a micropropagation protocol for the pineapple "Turiaçu" as well as to evaluate the multiplication rate under different cultivation systems. For the *in vitro* establishment phase, the experiment was conducted in a completely randomized design (IHD), in a 4 x 2 factorial scheme, being four culture media (DM + 2.5 µM BAP; MS + 2 µM de ANA + 4 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 8 µM BAP; and MS + 2 µM Of ANA + 12 µM BAP) and two types of explants (lateral yolk and stem apex), with 12 replicates per treatment. For the multiplication phase, the experiment was conducted in a completely randomized design (IHD), a 3x4 factorial scheme, with three sip-FV, SIP-FM and BIT-PF cultivation systems, four BAP concentrations (4, 8, 12 and 16 µM), totaling 12 treatments. The apex explant kaolin of pineapple cv. Turiaçu inoculated in MS medium + 2 µM ANA + 8 µM BAP presents better responses to *in vitro* establishment. The results show that Turiaçu pineapple using platform temporary immersion bioreactor (BIT - PF) with the addition of ms + 2 µM ANA + 12 µM BAP culture medium presents better responses regarding multiplication rates, with great potential for large-scale plant production.

**Keywords:** *Ananas comosus L. Merr.*, *in vitro* cultivation, bioreactors.



## 1. Introdução

O abacaxizeiro Turiaçu é uma cultivar nativa da Amazônia Maranhense, e encontra-se em processo de domesticação (REIS et al., 2019). Suas características químicas e morfológicas demonstram tratar-se de uma cultivar com atributos muito apreciados pelo mercado consumidor, como: frutos grandes, polpa amarelada, maior teor de açúcares e menor percentual de acidez (ARAÚJO et al., 2012; REIS et al., 2019), o qual lhe confere vantagens quando comparadas às cultivares de abacaxizeiro tradicionalmente comercializadas.

A propagação desta cultivar é realizada exclusivamente por meio de técnicas tradicionais em campo, ou seja, utilizando mudas formadas a partir de brotações laterais da planta. Contudo este sistema, amplamente estudado, tem demonstrado que contribui para a disseminação de pragas e doenças (COUTO et al., 2014). Ainda, esta técnica depende muito do material vegetal, mão-de-obra e tempo, o que pode aumentar os custos de produção, além de gerar material propagativo desuniforme tanto em tamanho quanto em vigor (SANTOS et al., 2011).

Para superar os gargalos das técnicas tradicionais, a micropropagação se apresenta como uma realidade na propagação *in vitro* de materiais genéticos de *Ananas comosus* L. Merr., pois proporciona a produção de mudas em larga escala a partir de um único explante, em um curto espaço de tempo, e totalmente livres de pragas e doenças (SILVA et al., 2012). Contudo, o estabelecimento *in vitro* corresponde a uma das etapas cruciais para o início da micropropagação, iniciando-se com a seleção dos explantes mais adequados para posterior multiplicação em condições *in vitro*. Ainda, o tipo de explante deve ser selecionado de acordo com sua capacidade de adaptação às condições *in vitro*, sendo recomendados explantes com maior proporção de tecidos meristemáticos, devido a maior possibilidade de expressar a totipotência (KIELSE et al., 2009).

A etapa de multiplicação *in vitro* visa produzir o maior número possível de plantas em um menor espaço de tempo, e para isso, torna-se necessário o ajuste do protocolo para cada espécie/cultivar (SCHUCH e ERIG, 2005). Dentre os fatores mais importantes que influenciam a taxa de multiplicação, destacam-se o tipo de sistema de cultivo e o meio de cultura, carboidratos e, com destaque para a concentração de citocinina adicionada ao meio (SILVEIRA et al., 2001; SILVA et al., 2007).

A micropropagação dita convencional é o cultivo *in vitro* de plantas em frascos vedados, com ausência de trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa luminosidade e com a utilização de açúcares em altas concentrações no meio de cultura, como fonte de carbono e energia (ARIGITA et al., 2002; ROGALSKI et al., 2003). Contudo, as plantas micropropagadas no sistema convencional podem apresentar distúrbios anatômicos e metabólicos, sendo estes distúrbios capazes de impossibilitar uma adequada assimilação fotossintética (XIAO e KOZAI, 2004; FUENTES et al., 2007). Uma alternativa para melhoria no sistema de produção de mudas oriundas do cultivo *in vitro* convencional, é a utilização de frascos com membranas permeáveis a gases, pois o efeito das trocas gasosas interfere nos processos morfogênicos, e promove um melhor desenvolvimento dos componentes da maquinaria fotossintética das plantas durante a propagação *in vitro* (KOZAI, 2010; SALDANHA et al., 2012).

A utilização de biorreatores, com base no conceito de imersão temporária é uma inovação efetiva adotada amplamente nas técnicas da cultura de tecidos de plantas (NASRI et al., 2019), e dentre as vantagens destaca-se o fato de que o tecido vegetal pode absorver nutrientes diretamente do meio através de fluxos periódicos de ar estéril, que permitem o contato dos explantes com o meio líquido, enquanto renova a atmosfera do frasco de cultivo (PAEK et al., 2005; NASRI et al., 2019).

O uso de biorreatores pode ser uma excelente alternativa para aperfeiçoar e melhorar o processo de propagação do abacaxizeiro ‘Turiaçu’; beneficiar o aumento da produção de mudas, com maior velocidade de multiplicação, redução de mão-de-obra, e assim reduzir os custos elevados da produção de mudas micropropagadas (TAKAYAMA e AKITA, 2005; PENCHEL et al., 2007). De fato, para muitas espécies, as taxas de multiplicação são melhoradas consideravelmente usando esses biorreatores, inclusive em outras cultivares de abacaxizeiro (SILVA et al., 2007; SCHERER et al., 2013; WILKEN et al., 2014; RAMÍREZ-MOSQUEDA et al., 2016; GODOY et al., 2017).

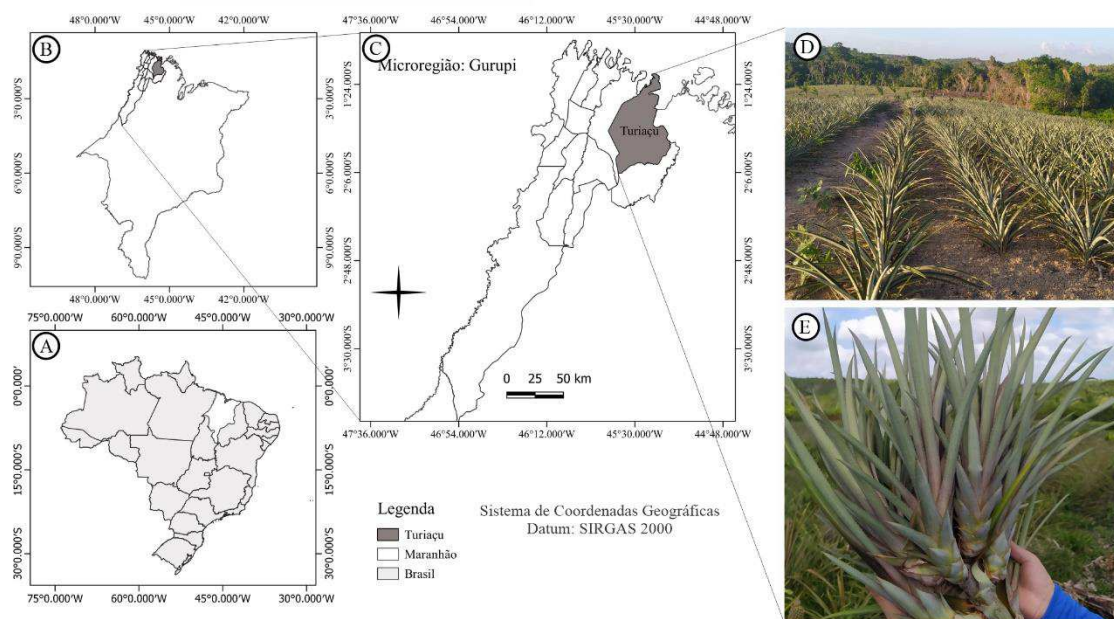
Apesar do potencial mercadológico e relevante importância econômica, ainda não há relatos sobre o estabelecimento *in vitro* da cultivar de abacaxi Turiaçu. Nesse sentido o presente estudo tem como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação para o abacaxizeiro cv. Turiaçu bem como avaliar a taxa de multiplicação sob diferentes sistemas de cultivo.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Experimento I – Estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro ‘Turiçaçu’

#### 2.1.1 Obtenção do material vegetal

Foram utilizados como fonte de explantes, mudas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiçaçu) do tipo filhote, coletadas em área de produção comercial localizado no município Turiçaçu, Maranhão, Brasil (01°38'58,6"S e 45°29'25,9"W) (Figura 1). O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT - UEMA), São Luís – MA.



**Figura 1.** Mapa de localização do município de Turiçaçu, na microrregião Gurupi, Maranhão, Brasil; Mapa do Brasil (A); Mapa do Maranhão (B); Microrregião do Gurupi (C); Plantio comercial e coleta de mudas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr.) cv. Turiçaçu (D); mudas tipo filhote (E).

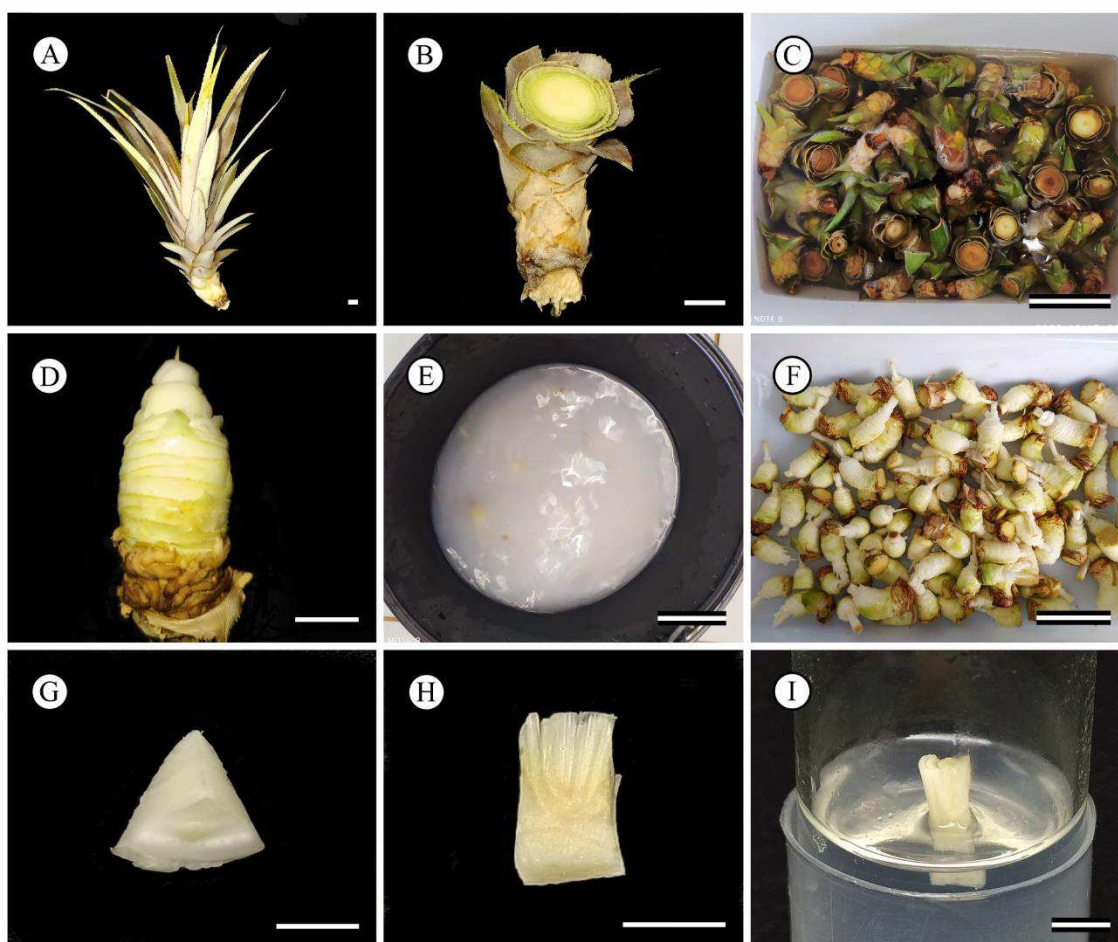
#### 2.1.2 Desinfestação e estabelecimento *in vitro*

O processo de desinfestação do material vegetal do tipo filhote (Figura 2A) foi dividido em três etapas:

1) As mudas tiveram a redução de 2/3 das folhas por corte transversal (Figura 2B), sendo submersas em solução de hipoclorito de sódio comercial (Qboa<sup>®</sup>) diluído a 0,1 % de cloro ativo por 24 horas (Figura 2C);

2) Após este período, foram removidas as folhas remanescentes para expor a haste do material (Figura 2D), sendo novamente submersas durante 20 minutos em solução contendo  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de Cercobin® (Figura 2E), com posterior lavagem em água corrente por 60 minutos para a retirada dos resíduos do produto (Figura 2F);

3) Em câmara de fluxo laminar, as hastes permaneceram por cinco minutos em álcool etílico 70%, com seguida imersão por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial (Qboa®) a 2 % de cloro ativo, sendo adicionado uma gota de Tween 20® (Isofar®) a cada 100 mL de solução, com seguida lavagem em água destilada autoclavada, por três vezes de cinco minutos cada.



**Figura 2.** Desinfestação de explantes (ápice caulinar e gema lateral) provenientes de mudas do tipo filhote de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu): muda tipo filhote (A); redução de 2/3 das folhas por corte transversal (B); mudas mantidas em hipoclorito 0,1% de cloro ativo por 24 horas (C); haste desfolhadas (D); mudas desfolhadas mantidas em fungicida Cercobin® por 15 minutos (E); haste (mudas desfolhadas) antes dos cortes realizados em fluxo laminar (F); gema lateral (G); ápice (H); haste desfolhada em um recipiente (I).

caulinar (H); explante inoculado em tubo de ensaio(I). Barras: A, B, D: 2cm; C, E, F: 10 cm; G, H, I: 0,5 cm.

Dois tipos de explantes provenientes das hastes de abacaxi (gemas laterais e ápice caulinar) (Figuras 2G, 2H) foram retirados com auxílio de bisturi e inoculados em tubo de ensaio de vidro (25 x 150 mm) (Figura 2I) contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG 1962) (PhytoTech<sup>®</sup>), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup>), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), com diferentes concentrações de 6- benzilaminopurina (BAP 4; 8; 12 e 16 µM) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) e ácido naftalenoacético (ANA 2 µM) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), solidificado com 2 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem (120 °C, 1 Kgf cm<sup>-2</sup>, 15 min).

Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, no escuro por sete dias, com seguida transferência para luz com fotoperíodo de 16 horas, irradiância luminosa de 42 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proveniente de duas lâmpadas LEDs (Diodos Emissores de Luz) de cor branca (Tubular T8 Led, 10 w, Brília, Brasil).

### 2.1.3 Delineamento experimental e variáveis analisadas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 2, com quatro meios de cultura (MS + 2,5 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 4 µM de BAP; MS + 2 µM de ANA + 8 µM BAP; e MS + 2 µM de ANA + 12 µM de BAP) e dois tipos de explantes (gema lateral e ápice caulinar), com 12 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental composta por um tubo de ensaio contendo um explante.

Aos 50 dias após a inoculação dos explantes em meio de cultura foram avaliados as porcentagens (%) de contaminação por bactéria, de contaminação por fungo, de oxidação, de sobrevivência, de explantes estabelecidos, assim como o número de brotos e massa fresca de brotos (g).

### 2.1.4 Análise estatística

Os dados coletados foram analisados quanto a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, seguida da análise de variância com dois fatores (ANOVA TWO-WAY), com comparação de médias pelo teste de Tukey HSD com  $p < 0,05$ . A variável número de brotos foi transformada para  $Y = \sqrt{x + 0,5}$  visando atender as pressuposições de normalidade dos dados. Para a variável porcentagem de explantes estabelecidos aplicou-se regressão. Para isso, foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 2.2 Experimento II – Multiplicação do abacaxi cv. Turiaçu em biorreator e frascos de cultivo

### 2.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas brotações previamente estabelecidas *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu, e para atender a quantidade de plantas para este experimento, realizou-se três subcultivos sucessivos em meio MS (Sigma<sup>®</sup>, suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 2 µM de ANA (Sigma<sup>®</sup>), 4 µM de BAP (Sigma<sup>®</sup>) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Isofar<sup>®</sup> Ltda, Duque de Caxias - RJ), com pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , e autoclavado (120 °C, 1 Kgf cm<sup>-2</sup>, 15 min).

Ainda em câmara de fluxo laminar, brotações, com aproximadamente 2 cm de comprimento de parte aérea, e com a excisão do sistema radicular, foram inoculados em diferentes sistemas de cultivo, onde foi utilizado o mesmo meio MS supracitado sendo fixado a concentração de 2 µM de ANA e diferentes concentrações de BAP (4, 8, 12 e 16 µM).

Os sistemas de cultivo avaliados foram: 1) frascos de vidro com imersão permanente em 50 mL de meio líquido associado a tampas de polipropileno rígidas e vedadas (SIP-FV); 2) frascos de vidro com imersão permanente em 50 mL de meio líquido associado a tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FCM) (Tsm, Tcm, respectivamente; Figura 3A) e biorreatores de imersão temporária de frasco simples tipo Plantform<sup>®</sup> com imersão permanente em 500 mL de meio líquido (BIT-PF) (Figura 3B).



**Figura 3.** Sistemas de imersão permanente: Tsm - tampas de polipropileno rígidas sem membranas permeáveis a gases, Tcm – tampa de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas permeáveis a gases (SIP-FV e SIP-FCM, respectivamente) (A) e biorreatores de imersão temporária tipo frascos simples Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF) na multiplicação *in vitro* de brotos de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu (B). Barras: A: 1 cm; B: 3 cm

Nos sistemas de imersão permanente (SIP-FV e SIP-FCM), os frascos de cultivo foram vedados com tampas de polipropileno, no qual as do sistema SIP-FCM, foram feitos dois orifícios, de 10 mm de diâmetro cada, cobertos por membranas permeáveis a gases compostas por duas camadas de fita microporosa Missner<sup>®</sup> e um PTFE (politetrafluoroetileno) Poly<sup>®</sup> de  $0,05 \pm 0,01$  mm de espessura (Figura 3A, seguindo metodologia proposta por Saldanha et al. (2012).

Os diferentes sistemas de cultivo foram mantidos na sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16h e 8h de escuro, irradiância de  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de lâmpadas tubulares de diodos emissores de luz (LEDs) de cor branca (T8 Led, 20 w, Elgin, Brasil). Nos biorreatores de imersão temporária (BIT- PF), o tempo de imersão dos explantes em meio de cultivo foi regulado por temporizador programável a cada 3 h, e os brotos permaneceram em contato com o meio de cultura durante 5 min.

### **2.2.2 Delineamento experimental e variáveis analisadas**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 3x4, com três sistemas de cultivo SIP-FV, SIP-FCM e BIT-PF, quatro concentrações de BAP (4, 8, 12 e 16  $\mu\text{M}$ ), totalizando 12 tratamentos, com quatro repetições e a unidade experimental composta por cinco brotos. Aos 50 dias de cultivo, foram avaliados o comprimento da planta (cm), o número de brotos, o número de folhas, a massa fresca da parte aérea, a massa seca da parte aérea (g) e o comprimento de raiz (cm).

### **2.2.3 Análise estatística**

Os dados coletados foram analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e as diferenças significativas foram determinadas por análise de variância com dois fatores (ANOVA TWO-WAY), e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD ( $P < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

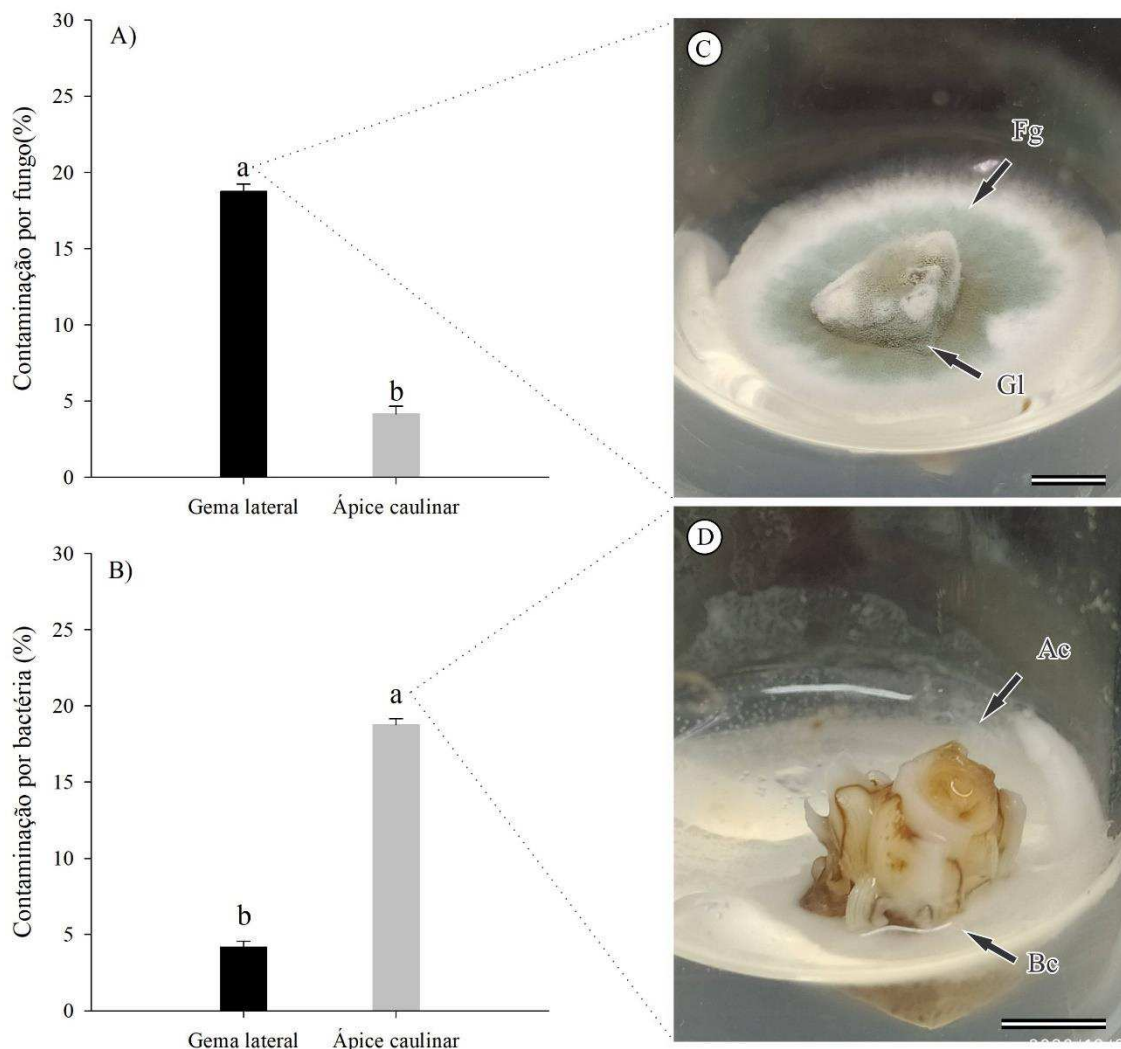


### 3. Resultados

#### 3.1 Experimento I – Estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro ‘Turiaçu’

A partir da análise de variância, foi possível observar que as variáveis porcentagem de contaminação por fungo, porcentagem de contaminação por bactéria, porcentagem de oxidação, porcentagem de sobrevivência, massa fresca de brotos e número de brotos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

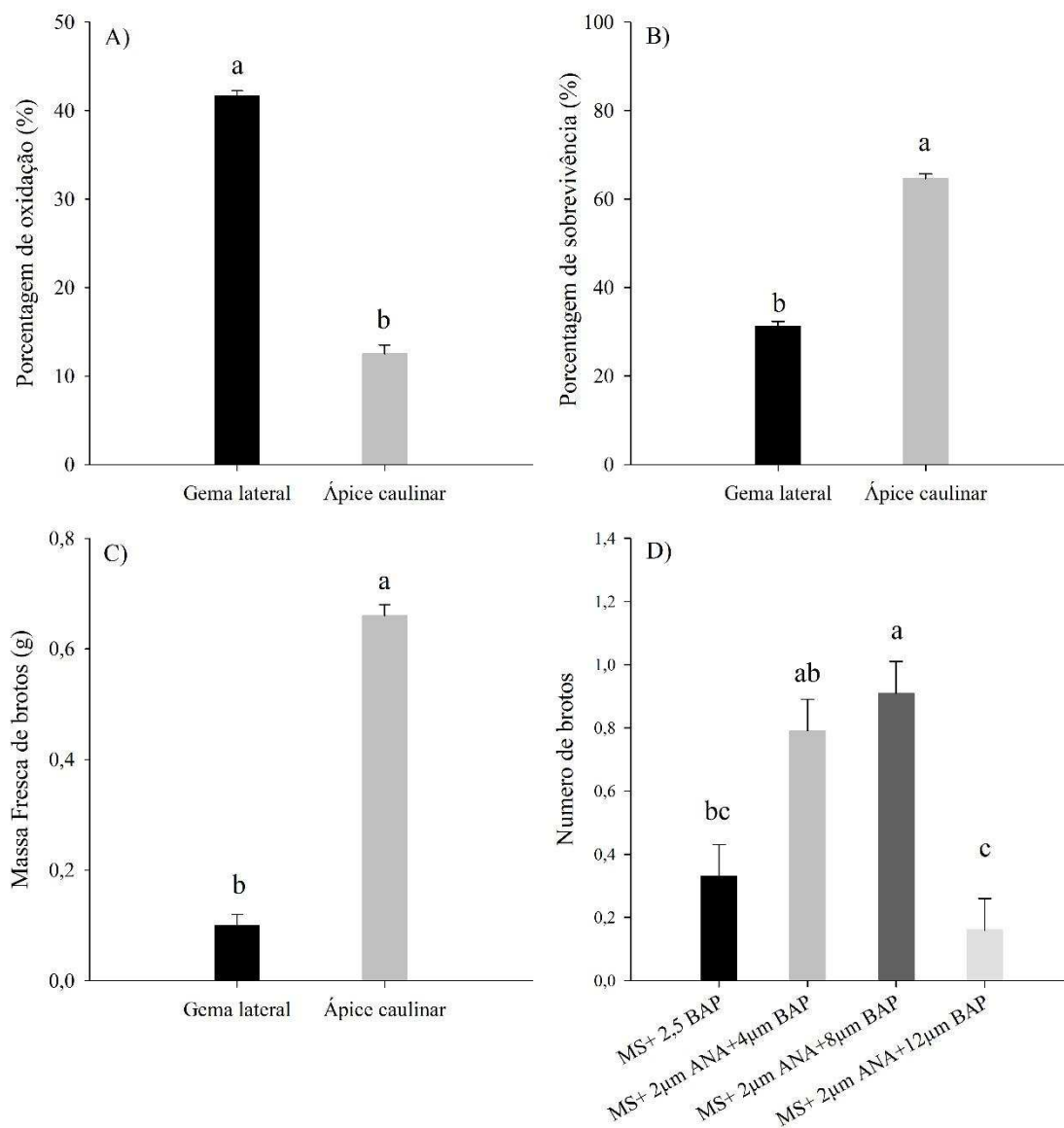
Para as variáveis porcentagem de contaminação por fungo e porcentagem de contaminação por bactéria, não houve interação entre os fatores meios de cultura e tipos de explante, ocorrendo significância apenas para o fator tipo de explante. A gema lateral foi o explante que apresentou maior percentual de contaminação por fungo, com 18,75% (Figura 4A, 4C), e o ápice caulinar, maior percentual de contaminação por bactéria com 18,75% (Figura 4B, 4D).



**Figura 4.** Porcentagem de contaminação por fungo (A), Porcentagem de contaminação por bactéria (B), gema lateral contaminada com fungo (C) e ápice caulinar contaminado com bactéria (D) de *Ananas comosus* cv. Turiapu aos 50 dias do estabelecimento *in vitro*. Legendas: Fg – Fungo; Bc – Bactéria; Gl – Gema lateral; Ap – Ápice caulinar. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Barras: C-D 0,5 cm.

Para a porcentagem de oxidação e porcentagem de sobrevivência, houve diferenças significativas apenas para o fator tipo de explante ( $p < 0,05$ ). A gema lateral foi o explante que apresentou maior percentual de oxidação com 41,66% quando comparado ao ápice caulinar, com apenas 12,5% (Figura 5A). Para a variável da porcentagem de sobrevivência, o ápice caulinar apresentou maior média, quando comparado à gema lateral (com 64,58% e 31,25%, respectivamente) (Figura 5B).

Para a variável de massa fresca de brotos, houve diferença significativa para os tipos de explante, no qual o ápice caulinar apresentou maior acúmulo de biomassa, sendo superior à gema lateral, com 0,66 g e 0,10 g, respectivamente (Figura 5C).

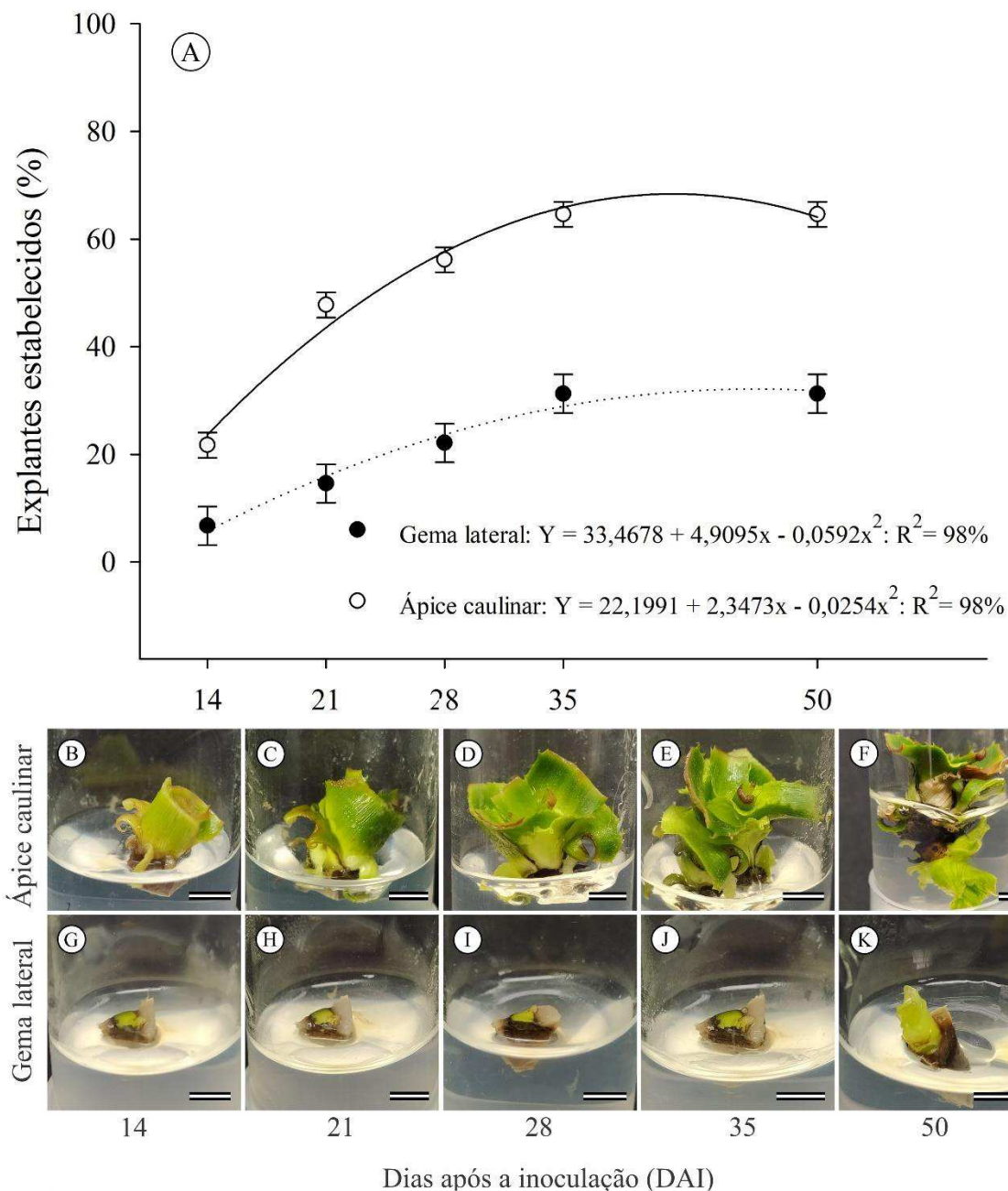


**Figura 5.** Percentagem de oxidação (%) (A), percentagem de sobrevivência (%) (B), massa fresca de brotos (C) e número de brotos (D) de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias do estabelecimento *in vitro*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Em relação ao número de brotos, houve diferença significativa apenas para meios de cultura, no qual o meio MS + 2  $\mu$ M ANA + 4  $\mu$ M BAP e MS + 2  $\mu$ M ANA + 8  $\mu$ M BAP apresentaram as maiores médias, com 0,86 e 0,73 respectivamente, sendo superiores quando comparado a MS + 2,5  $\mu$ M BAP e MS + 2  $\mu$ M ANA + 12  $\mu$ M BAP com 0,33 e 0,16, respectivamente (Figura 5D).

As curvas de regressão referente ao percentual de explantes estabelecidos em função dos dias após a inoculação (DAI), ajustaram-se ao modelo quadrático e apresentaram diferenças significativas para o fator tipo de explante ( $p < 0,05$ ) (Figura 6A). Em relação aos dias após a inoculação, observou-se o comportamento crescente da curva, quando se comparou os dois tipos de explantes, no qual ambos tiveram o crescimento ascendente, e obtiveram o seu estabelecimento máximo até os 35 DAI. Após este período ocorre a estabilização na curva.

O ápice caulinar apresentou o maior percentual de estabelecimento de explantes durante as épocas de avaliação, quando comparado à gema lateral (64,58% e 31,25, respectivamente). O maior crescimento dos explantes foi observado para o ápice caulinar, que desde a primeira avaliação, aos 14 DAI, foi mais responsivo do que a gema lateral, onde foram observadas mudanças de crescimento apenas aos 50 DAI, mediante observação visual.



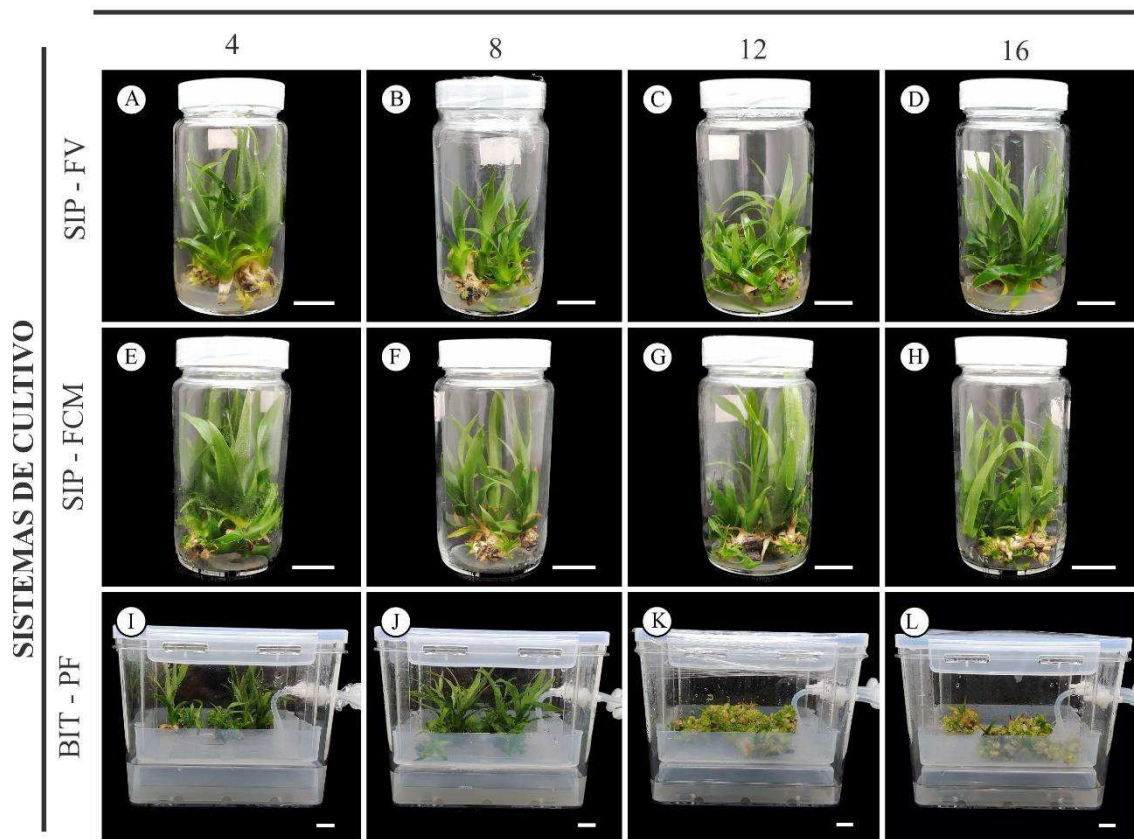
**Figura 6.** Explantes estabelecidos (%) de ápice caulinar e gema lateral de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiagu durante o estabelecimento *in vitro* no período dos 14 aos 50 DAI (A) e visualização de explantes típicos obtidos de ápice caulinar (B, C, D, E, F) e gema lateral (G, H, I, J, K) no mesmo período. Barras: B-K: 1 cm.

### **3.2 Experimento II – Multiplicação do abacaxi cv. Turiacu em biorreator e frascos de cultivo**

A partir da análise de variância observou-se que as variáveis comprimento de planta, número de folhas, massa fresca da parte aérea, massa seca da parte aérea, número de brotos e massa seca de raiz apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

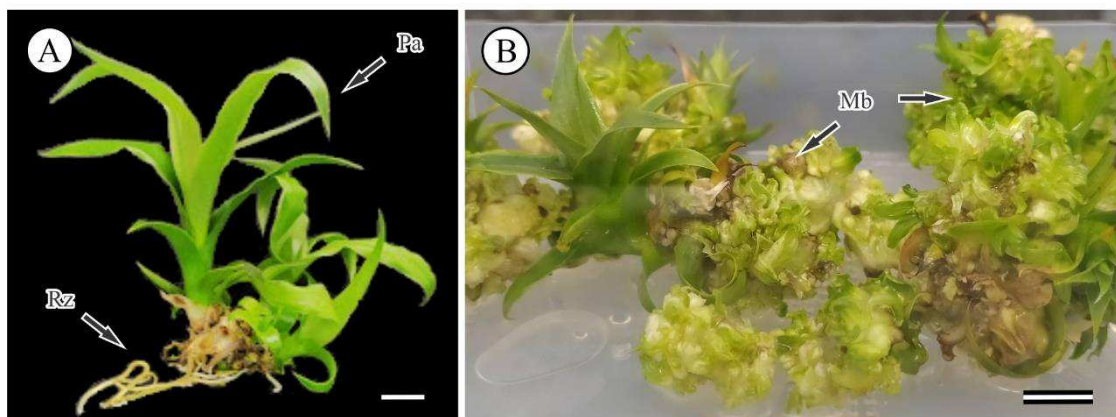
Para a variável de comprimento de planta houve diferença significativa para a interação entre os fatores de concentrações de BAP e dos sistemas de cultivo (Figura 9A). Para o sistema de cultivo SIP- FV a concentração de 4  $\mu\text{M}$  de BAP (8,74 cm) diferiu apenas das concentrações de 8  $\mu\text{M}$  (6,19 cm) e 12  $\mu\text{M}$  de BAP (6,32 cm), no entanto a concentração de 4  $\mu\text{M}$  de BAP não apresentou diferença significativa para os diferentes sistemas de cultivo. O sistema de cultivo SIP-FCM apresentou o maior comprimento de planta na concentração de 4  $\mu\text{M}$  de BAP (10,75 cm). Já o sistema de cultivo BIT-PF obteve os maiores valores de comprimento de plantas nas concentrações de 4  $\mu\text{M}$  de BAP (9,77 cm) e 8  $\mu\text{M}$  de BAP (9,52 cm), e com o aumento das concentrações de 12  $\mu\text{M}$  (2,0 cm) e 16  $\mu\text{M}$  BAP (1,75 cm) houve redução significativa do comprimento.

Para a variável número de folhas não houve diferença significativa entre as concentrações de BAP nos sistemas de cultivo SIP-FV e SIP-FCM, mas apresenta clara diferença no de BIT-PF (Figura 9B). Já o desdobramento das concentrações de BAP dentro dos sistemas de cultivo apresentou diferenças significativas, no qual o sistema SIP-FV foi superior em todas as concentrações de BAP, exceto a concentração de 4  $\mu\text{M}$  de BAP (12,65 cm) no sistema de BIT-PF. As variáveis massa fresca da parte aérea e massa seca da parte aérea, não apresentaram diferenças significativas quanto às diferentes concentrações de BAP nos sistemas de cultivo SIP-FV e SIP-FCM (Figura 9C e 9D). A concentração de 12  $\mu\text{M}$  de BAP obteve os maiores incrementos de biomassa tanto para massa fresca da parte aérea quanto para a massa seca da parte aérea no sistema de cultivo BIT-PF (12,29 e 5,43 g) respectivamente. Para os sistemas de cultivo SIP-FV e SIP-FCM a variável número de brotos não apresentou diferença significativa quanto às concentrações de BAP, diferindo apenas no sistema de cultivo BIT – PF, onde a concentração de 12  $\mu\text{M}$  de BAP (88,0) obteve o maior número de brotos (Figura 9E).

CONCENTRAÇÕES DE BAP ( $\mu\text{M}$ )

**Figura 7.** Plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas aos diferentes sistemas de cultivo (SIP – FV, SIP – FCM e BIT – PF) e concentrações de BAP (4, 8, 12 e 16  $\mu\text{M}$  de BAP). Barras: A-L: 1cm

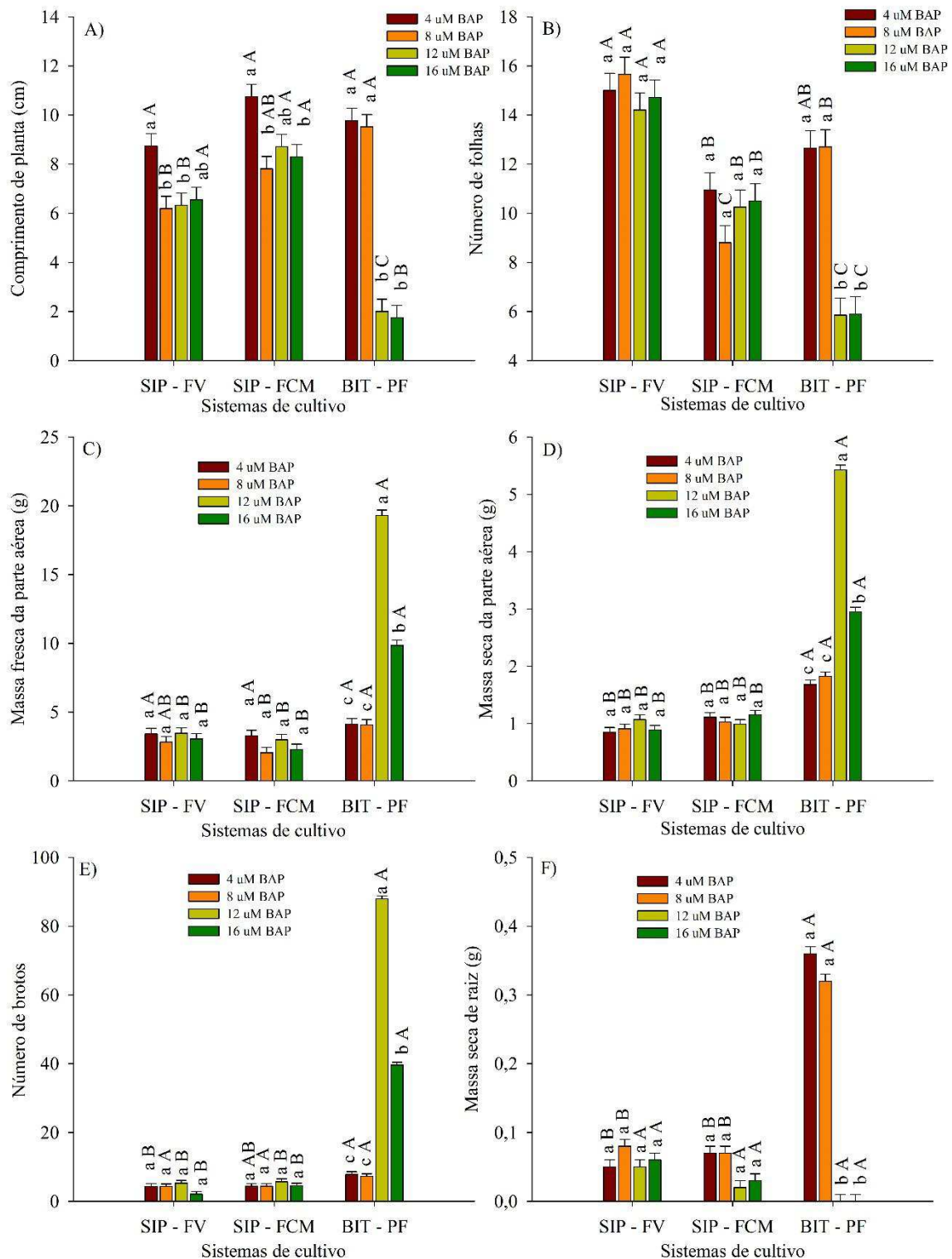
A variável massa seca de raiz apresentou as maiores médias no sistema de cultivo BIT-PF nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$  de BAP (0,36 e 0,32 g, respectivamente) (Figura 8E). Já para as concentrações de 12 e 16  $\mu\text{M}$  de BAP não houve formação de radicular.



**Figura 8.** Crescimento das plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas aos diferentes sistemas de cultivo e concentrações de BAP. Padrão de crescimento das plantas nos sistemas SIP – FV (4, 8, 12 e 16  $\mu$ M de BAP), SIP – FCM (4, 8, 12 e 16  $\mu$ M de BAP) e BIT – PF (4 e 8  $\mu$ M de BAP): Pa – Parte aérea, Rz – Raíz (A); Padrão de crescimento das plantas no sistema BIT – PF (12 e 16  $\mu$ M de BAP): Mb – Multibrotações (B). Barras: A-B: 1cm.

As plantas mantidas nos sistemas de cultivo SIP – FV e SIP – FCM, apresentaram o padrão de crescimento com maior comprimento da parte aérea e formação de raiz em todas as concentrações de BAP (Figura 7 A-H). Para as plantas mantidas no sistema de cultivo BIT - PF o aumento das concentrações de BAP (12 e 16  $\mu$ M) reduz o comprimento das plantas, no entanto, aumenta o número de brotações (Figura 7 K – L).





**Figura 9.** Comprimento de planta (cm) (A), número de folhas (B), Massa fresca da parte aérea (g) (C), massa seca da parte aérea (g) (D), número de brotos (E), massa seca de raiz (g) (F), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiacu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de sistemas de cultivo e concentrações de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si

pelo teste de Tukey, a 5% de dentro de cada sistema de cultivo. Médias da concentração de BAP nos diferentes sistemas de cultivo sistemas de cultivo, seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

#### 4. Discussão

##### 4.1 Experimento I – Estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro ‘Turiaçu’

Este foi o primeiro estudo para o desenvolvimento de um protocolo de estabelecimento e multiplicação *in vitro* para *A. comosus* cv. Turiaçu, material genético único e de extremo apreço pelos maranhenses. Além disso, essa cultivar destaca-se no mercado consumidor por proporcionar frutos grandes e com maior teor de açúcares (15.7 °Brix) (REIS et al., 2019). O trabalho foi conduzido para determinar o potencial de resposta durante o estabelecimento *in vitro* de explantes da gema lateral e do ápice caulinar de *A. comosus* cv. Turiaçu.

Muitos autores relatam a regeneração *in vitro* para várias espécies da família Bromeliaceae, incluindo os efeitos dos reguladores de crescimento no meio de cultura, e tipos de explante (GUERRA et al., 1999; PARDO et al., 2008; SCHERER et al., 2013; SANTOS et al., 2015), sendo o explante fundamental para o sucesso da micropropagação de qualquer espécie vegetal.

Para garantir o sucesso da micropropagação, outro aspecto importante é prevenir a contaminação fúngica e bacteriana (SURAYA et al., 2021). O protocolo de descontaminação estabelecido no presente trabalho, demonstrou ser eficiente para o controle da contaminação total, com 78% de explantes não contaminados (dados não apresentados). O maior percentual da contaminação por fungo na gema lateral, indicou que o hipoclorito de sódio (NaOCl) não foi suficiente para penetrar as camadas mais internas do explante. O aumento das colônias fúngicas na gema lateral do abacaxizeiro (Figura 4C), pode ser explicada pela quantidade de detritos que permanecem alojados nas axilas das folhas, tornado assim esse ambiente ideal para a proliferação de fungos. No ápice caulinar, houve maior contaminação por bactéria, e este fato ocorre por conta que do meristema apical estar mais protegido de contaminantes externos, evidenciando que provavelmente, a contaminação foi causada por bactérias endofíticas (Figura 4D).

A contaminação pode ter diversas origens, desde a coleta dos explantes até a manipulação laboratorial (THOMAS et al., 2011; THOMAS e ASWATH, 2014).

Adicionalmente, cabe salientar que a arquitetura da planta também pode influenciar diretamente a presença destes contaminantes, pois a estrutura e distribuição da folhagem, topografia da superfície foliar, presença de nutrientes na superfície das folhas e o microclima estabelecido, podem influenciar na presença destes patógenos (SAIKKONEN 2007; MUKHTAR et al., 2010; MEJÍA et al., 2014). Ainda, a comunidade microbiana pode ser classificada de acordo com a região que se encontra na planta matriz: epifítica - quando habitam a superfícies de folhas ou hastes, ou endofíticas - quando colonizam interior dos tecidos vegetais (IKEDA et al., 2010; PINI et al., 2012). Dessa forma, diferentes tipos de explantes podem exigir tratamentos contrastantes de descontaminação, no qual deve ser alcançado equilíbrio entre duração da exposição do explante e a concentração do agente esterilizante (POOBATHY et al., 2019).

Além da contaminação, outro ponto limitante da micropropagação é a oxidação, que pode dificultar o estabelecimento das espécies no cultivo *in vitro*, e alguns fatores como genótipo e tipo de explante, que podem influenciar negativamente o desenvolvimento do material vegetal (BASSAN et al., 2006). A causa da oxidação do tecido vegetal é dada pelo acúmulo de compostos fenólicos no tecido dos explantes, e nos meios de cultura (JONES e SAXENA, 2013). Embora os compostos fenólicos estejam geralmente presentes em tecidos vegetais saudáveis, e possam se acumular em tipos de células especializadas (BECKMAN, 2000), eles são frequentemente produzidos em maior abundância e liberados como uma resposta de defesa, especialmente após ferimentos nos tecidos ou exposição a estresses bióticos ou abióticos (BECKMAN, 2000; JONES e SAXENA, 2013).

Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados para indução e estabelecimento *in vitro* de uma espécie, no entanto, ápices caulinares e gemas axilares são os mais utilizados (NORMAH et al., 2019). Neste trabalho observou-se maior vigor e sobrevivência dos explantes provenientes do ápice caulinar (Figura 5B). De fato, os ápices caulinares tendem a ser mais responsivos, pois possuem tecidos mais organizados consistindo de células meristemáticas com intensa capacidade de divisão celular (ENGELMANN, 2014), e o uso de um tipo de explante mais responsivo tem forte influência nas etapas subsequentes ao estabelecimento *in vitro* (ARAÚJO e CARVALHO, 2005).

O maior incremento de massa fresca de brotos ocorreu para o explante do ápice caulinar, independente do meio de cultura utilizado (Figura 5C); e esse ganho de

biomassa muitas vezes é decisivo ao aumento da taxa de sobrevivência dos explantes (VALE et al., 2019). O incremento de biomassa e formação de brotos é um processo recorrente do cultivo *in vitro*, e pode ser atribuído a fatores como espécie, tipo de explante, sistema de cultivo ou atividade fisiológica diferenciada das células meristemáticas (DARWESH 2015, GARCÍA-RAMÍREZ et al. 2015).

O número de brotos apresentou influência direta do meio de cultura (Figura 5D), isso pode estar relacionado a presença da citocininas BAP e a sua alta atividade relacionada com parte aérea dos explantes (BAKHTIAR et al., 2016). Todavia, ao elevar a concentração deste regulador de crescimento, há também aumento do estresse no tecido vegetal. Fatores de estresse exógenos ativam genes relacionados à síntese de oxidases/desidrogenases das citocininas, que se ligam a sítios específicos desta molécula. Tal promoverá a sua degradação, alterando o balanço hormonal endógeno de citocininas (MACKOVÁ et al., 2013; KOPEČNÝ et al., 2016).

A redução do número de brotos observada em concentrações acima de 12  $\mu\text{M}$  de BAP pode estar relacionada à resposta dos explantes ao aumento do estresse (Figura 5D). Para os valores de BAP acima dessa concentração, possivelmente há ativação dos genes responsáveis pela síntese de enzimas citocininas oxidases/desidrogenases (ROSA et al., 2018). Desta forma, estas enzimas catalisam o BAP adicionado ao meio de cultura, o que reduz a sua atividade e em resposta, os explantes emitem menos brotos (ROSA et al., 2018).

Quanto a curva de estabelecimento dos explantes, o ápice caulinar apresentou o maior percentual de estabelecimento de explantes durante os dias após a inoculação (DAI) quando comparado à gema lateral (Figura 6A). Silva (2010) também observou que os explantes de ápices caulinares se mostraram mais eficientes na indução da organogênese *in vitro*, quando comparado às gemas laterais. A principal vantagem desses tipos de explantes é que, por envolver órgãos meristemáticos primordiais, apresentam maior estabilidade genética e rápido crescimento das plantas micropropagadas (FARIA et al., 2007; FLORES et al., 2011).

Assim, no seu conjunto, os dados do Experimento I permitem concluir que o explante de ápice caulinar do abacaxizeiro cv. Turiaçu inoculado em meio MS + 2  $\mu\text{M}$  ANA + 8  $\mu\text{M}$  BAP apresenta melhores respostas ao seu estabelecimento *in vitro*.

#### **4.2 Experimento II – Multiplicação do abacaxi cv. Turiaçu em biorreator e frascos de cultivo**

O Abacaxizeiro Turiaçu apresentou diferentes respostas quanto ao seu desenvolvimento e multiplicação *in vitro*, decorrentes das alterações das concentrações de BAP e dos diferentes sistemas de cultivo. A composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e para o padrão de desenvolvimento das plantas nos diferentes sistemas de cultivo (GALVANESE et al., 2007; CHU et al., 2010). De modo geral, as citocininas promovem a expansão e a divisão celular favorecendo uma maior taxa multiplicação nos explantes e incrementando a biomassa das plantas *in vitro* (AHMADIAN et al., 2017; ARRUDA et al., 2019). O maior incremento de massa fresca e massa seca da parte aérea ocorreu para o tratamento BIT-PF na concentração de 12  $\mu\text{M}$  de BAP (Figura 9C e 9D), esse aumento da biomassa pode estar relacionado à aeração forçada dentro do frasco de cultivo que proporcionou aos explantes um ambiente com elevadas trocas gasosas, resultando em melhor crescimento e acúmulo de biomassa (PEREIRA-LIMA et al., 2012).

A eficácia dos biorreatores para propagação em larga escala e produção de biomassa foram relatados para várias espécies (SCHERER et al., 2013; JESIONEK et al., 2017; KUNAKHONNURUK et al., 2019). Além disso, os biorreatores de imersão temporária, têm sido usados para aumentar a eficiência de propagação em massa, o que é difícil de alcançar usando métodos convencionais de propagação *in vitro* (MOREIRA et al., 2013).

Quanto ao número de brotos o sistema de cultivo BIT – PF, mostrou-se superior aos SIP-FCM e SIP-FV. Esses resultados demonstram que a concentração de 12  $\mu\text{M}$  de BAP foi apropriada para a produção em larga escala de abacaxieiro Turiaçu (Figura 9E). No entanto, a altura das plantas de abacaxi cultivadas no sistema de cultivo BIT-PF na concentração de 12  $\mu\text{M}$  de BAP foram menores em comparação aos sistemas de cultivo SIP-FCM e SIP-FSM. Este resultado, pode ser devido à regeneração excessiva de novos brotos que inibiu a expansão dos brotos individuais por explante. De acordo com Kunakhonnuruk et al. (2019), o aumento do número de brotos por explante diminuiu o comprimento dos brotos de *Drosera communis* cultivada em biorreatores de imersão temporária. Georgiev et al. (2014) sugerem que o aumento na taxa de multiplicação por explante se deve a fatores como a renovação do ar no interior dos frascos de cultura e o contato superficial do meio líquido com os explantes.

Quanto à massa seca de raiz o BIT-PF apresentou o maior acúmulo de biomassa nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$  de BAP, contrastando com a ausência de raízes nas

concentrações de 12 e 16  $\mu\text{M}$  BAP. Estes resultados sugerem que o balanço hormonal em função do sistema de imersão temporária resultou na condição ideal para aumentar o número de brotações, visto que na etapa de multiplicação a presença de raiz torna-se menos relevante. De fato, na etapa de multiplicação o balanço hormonal é crucial na determinação das respostas morfogênicas bem como as condições de cultivo e o tipo de explante (LUÍS, 2008). As interações entre auxinas e citocininas durante todo o desenvolvimento da planta são complexas, controlando a formação das raízes e dominância apical (LANDI e MEZZETTI, 2005). O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese das plantas *in vitro* (PASQUAL, 2001). Além disso, as respostas morfogênicas *in vitro* estão diretamente relacionadas à fonte de explante, composição mineral do meio de cultura, balanço hormonal e sistemas de cultivo (PERES, 2002).

No seu conjunto, os dados obtidos no Experimento II apontam para um elevado potencial do sistema de cultivo BIT-PF para propagação em larga escala, em comparação aos sistemas de cultivo SIP- FV e FCM. Adicionalmente, 12  $\mu\text{M}$  de BAP é a ideal para multiplicação de brotações no sistema de cultivo BIT-PF. Considerando este fato, é altamente recomendável definir a concentração ideal de citocinina para obter o maior crescimento e diferenciação dos tecidos vegetais (RUŽIĆ e VUJOVIĆ, 2008).

## 5. Conclusões

O explante de ápice caulinar de abacaxi cv. Turiaçu inoculado em meio MS + 2  $\mu\text{M}$  ANA + 8  $\mu\text{M}$  BAP apresenta melhores respostas ao estabelecimento *in vitro*.

Os resultados demonstram que o abacaxi Turiaçu utilizando o biorreator de imersão temporária Plantform (BIT - PF) com adição do meio de cultura MS + 2  $\mu\text{M}$  ANA + 12  $\mu\text{M}$  BAP apresenta melhores respostas quanto as taxas de multiplicação, com grande potencial para a produção de plantas em larga escala.

O abacaxi cv. Turiaçu apresenta grande potencial para ser propagado por técnicas da micropropagação, e o protocolo original proposto neste estudo demonstrou ser eficiente na desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes, podendo servir de base para futuros estudos da biotecnologia da cultivar.

## Referências

AHMADIAN, M.; BABAEI, A.; SHOKRI, S.; HESSAMI, S. Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 309-315, 2017.

ARAÚJO, J.R.G.; AGUIAR JR, R.A.; CHAVES, A.M.S.; REIS, F.O.; MARTINS, M.R. Turiaçu: a pineapple cultivar traditional and native from Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.4, p.1270–1276, 2012.

ARAÚJO, L.H.A.; CARVALHO, J.M.F.C. de. Técnicas de cultivo *in vitro*. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias, 2005. (Programa de PósGraduação).

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. VAN. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 1, p. 1-16, 2012.

ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, n. 115, p. 166-173, 2002.

ARRUDA, A. L.; BUSS, M.; NERBASS, F.R.; RUFATO, L. Concentrações de Citocinina influenciam a multiplicação *in vitro* de kiwizeiro. **Evidência**, Joaçaba v. 19, n. 1, p. 45-56, 2019.

BAKHTIAR, ZIBA.; MIRJALILI, MOHAMMAD HOSSEIN.; SONBOLI, ALI. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2016.

BASSAN, J.; REINIGER, L.; ROCHA, B.; SEVERO, C.; FLÔRES, A. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal** v.16 n. 4, v. 16, 12/01 2006.

BECKMAN, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 57: p. 101-110, 2000.

BIANCO, M.; GIUSTINI, L.; SABATINI, S. Spatiotemporal changes in the role of cytokinin during root development. **New Phytologist**, v. 199, n. 2, p. 324-338, 2013.

CHU, E. P.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; GIAMPAOLI, P.; & YOKOTA, E. S. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. **Scientia horticultrae**, v. 125, n. 3, p. 451-455, 2010.

DARWESH, R. S. S. Morphology, physiology and anatomy *in vitro* affected acclimatization *ex vitro* date palm plantlets: a review. **International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 183-190, 2015.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. **Acta Horticulturae** v. 1039, p. 31-39, 2014.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. de C.; LEDO, C. A. da S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; CUNHA, M. A. P. da. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007.

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

FLORES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; CUNHA, A.C. M. C. M. da; GOLLE, D. P.; BASSAN, J. S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

GALVANESE, M.S.; TAVARES, A.R.; AGUIAR, F.F.A.; KANASHIRO, S.; CHU, E.P.; STANCATO, G.C. & HARDER, I.C.F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, v. 54, n. 311, p. 63-67, 2007.

GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; GONZÁLEZ, M.; FREIRE-SEIJO, M.; O-CÁRDENAS, M. *et al.* Effect of morphological and physiological development on the acclimatization of *in vitro* plants of *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl in liquid culture medium. **Open Access Library Journal**, v. 2, e1787, 2015.

GEORGIEV, V., SCHUMANN, A., PAVLOV, A., & BLEY, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in life sciences**, v. 14, n. 6, p. 607-621, 2014.

GODOY, S.; TAPIA, E.; SEIT, P.; ANDRADE, D.; SÁNCHEZ, E.; ANDRADE, P. PRIETO, H. Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 5, p. 494-504, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C; CALDAS. L. S.; BUSO, J. A. (Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas*. 1. Ed. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

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

IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; TERASAWA, K.; MITSUI, H & MINAMISAWA K. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. **Plant and Cell Physiology** n. 51, p. 1398-1410, 2010.



JESIONEK, A., KOKOTKIEWICZ, A., WLODARSKA, P., ZABIEGALA, B., BUCINSKI, A., e LUCZKIEWICZ, M. (X). Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131 n. 1, p. 51-64. 2017.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005.

JONES, A. M.; SAXENA, P. K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **Plos One**. n. 7, v 8, 2013.

KIELSE, P.; FRANCO, E.T.H.; PARANHO, J.T.; LIMA, A.P.S. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p.1 098-11 04, 2009.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**. v. 10. p. 188–204. 2010.

KUNAKHONNURUK, B.; KONGBANGKERD, A.; INTHEMA, P. Improving large-scale biomass and plumbagin production of *Drosera communis* A.St.-Hil. by temporary immersion system. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 197-202, 2019.

LANDI, L.; MEZZETTI, B. TDZ, anxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. **Plant Cell Reports**. 25:281–288p. 2005.

LUIS, ZANDERLUCE GOMES. Propagação *in vitro* e Caracterização Anatômica de Gemas Adventícias e Embriões Somáticos de Murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae). Dissertação, UNB, Brasília, 2008.

MACKOVÁ H, HRONKOVÁ M, DOBRÁ J, TUREČKOVÁ V, NOVÁK O, LUBOVSKÁ Z, MOTYKA V, HAISEL D, HÁJEK T, PRÁŠIL IT, GAUDINOVÁ A, ŠTORCHOVÁ H, GE E, WERNER T, SCHMÜLLING T, VANKOVÁ R. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. **Journal of Experimental Botany**. n. 64, v. 10, p. 2805-15, 2013.

MANGIERI, M. A.; HALL, A. J.; STRIKER, G. G.; CHIMENTI, C. A. Cytokinins: A key player in determining differences in patterns of canopy senescence in Stay-Green and Fast Dry-Down sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids. **European Journal of Agronomy**, v. 86, p. 60-70, 2017.

MEJÍA, L. C.; HERRE, E. A.; SPARKS, J. P.; WINTER, K.; GARCÍA, M. N.; VAN BAEL, S. A.; STITT, J.; SHI, Z.; ZHANG, Y.; GUILTINAN, M. J. & MAXIMOVA, S. N. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. **Frontiers in Microbiology**. n. 5, p. 1-16. 2014.

MOREIRA, A. L., SILVA, A. B. D., SANTOS, A., REIS, C. O. D., & LANDGRAF, P. R. C. (2013). *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, n. 43 v. 10, p. 1804-1810, 2013.

- MUKHTAR I, MUSHTAQ S, ALI A & KHOKHAR I. Epiphytic and endophytic phyllosphere microflora of *Cassytha filiformis* L. and its hosts. **Ecoprint** v.17, p. 1-8, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n. 15, v. 3. p. 473-479, 1962.
- NASRI, A.; BAKLOUTI, E.; BEN ROMDHANE, A.; MAALEJ, M.; SCHUMACHER, H. M.; DRIRA, N.; FKI, L. Large-scale propagation of *Myrobolan (Prunus cerasifera)* in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 144-153, 2019.
- NORMAH, M. N.; SULONG, N.; REED, B. M. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advances and strategies. **Cryobiology**, v. 87, p. 1-14, 2019.
- PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 81, n. 3, p. 287-300, 2005.
- PARDO, A.; MICHELANGELI, C.; MOGOLLÓN, N.; ALVARADO, G. Regeneración In Vitro de *Billbergia Rosea* Hortus Ex Beer a partir de ápices caulinares. **Boletín Del Centro De Investigaciones Biológicas**, Zulia, v. 42, n. 4, p. 491–505, 2008.
- PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (ed.) **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 75-92. 2007.
- PEREIRA LIMA, G. P., SILVA CAMPOS, R. A. DA, GOMES, L., J.R., T., e VIANELLO, F. Polyamines, gelling agents in tissue culture, micropropagation of medicinal plants and bioreactors. **Recent Advances in Plant in Vitro Culture**. 2012.
- PERES, L. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 25: p. 44-48, 2002.
- PINI F, GALARDINI M, BAZZICALUPO M & MENGONI A. Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in Alphaproteobacteria? **Genes**. n. 2 p.1017-1032, 2011.
- POOBATHY, R.; ZAKARIA, R.; MURUGAIYAH, V.; SUBRAMANIAM, S. Surface sterilization and micropropagation of *Ludisia discolor*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101380, 2019.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; RAMÍREZ-MADERO, G.; HERNÁNDEZ-RINCÓN, E. U. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. **South African Journal of Botany**, v. 106, p. 238-243, 2016.
- REIS, F.O.; ARAUJO, J.; BRAUN, H.; JUNIOR, A.; PEREIRA, A. Fruit quality of a traditional pineapple cultivar (Turiaçu) compared to the most popular cultivar (Pérola) in Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.13, n.4, p.546-551, 2019.

ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P.; SILVA, A.L. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. Micropropagados. **Revista Brasileira de fruticultura**, n. 25 v. 2, p. 417-423, 2003.

ROSA, W.S.; MARTINS, J. P. R.; RODRIGUES, E. S.; RODRIGUES, L. C. A.; GONTIJO ABPL & FALQUETO A. R. Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** n. 133, p. 339-350, 2018.

RUŽIĆ, V. DJ., VUJOVIĆ, I. T.. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.), **Horticultural Science**. v. 35, n. 1, p. 12-21. 2008.

SAIKKONEN K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews** 21: 67-74, 2007.

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

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

SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H. P. D. F.; VESCO, L. L. D.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In. FACHINELO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p.155-173, 2005.

SILVA, A. B. DA; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; & ARAÚJO, A. G. DE. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(9), 1257–1260, 2007.

SILVA, A. B.; Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online]. 2007, v. 42, n. 9 [Acessado 2 Janeiro 2022] , pp. 1257-1260.

SILVA, E. O. Propagação e armazenamento de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 2010.105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. de L.; CITADIN, I.; Journal of bioreactors as a high performance micropropagation strategy in cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.488-492, 2001.

SURAYA, A. A.; MISRAN, A.; HAKIMAN, M. The Efficient and Easy Micropropagation Protocol of *Phyllanthus niruri*. **Plants**, v.10, 2141, 2021.

TAKAYAMA, S., AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: Gupta, S.D., Ibaraki, Y. **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, p. 83-100, 2005.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.

THOMAS, P e ASWATH, C. *In vitro* introduction of hardy alcohol resistant *bacillus* spp. through aseptically grown watermelon seedlings. **Advances in Microbiology**. n 4, p. 504-510, 2014.

THOMAS, P. Intense association of non-culturable endophytic bacteria with antibiotic-cleansed *in vitro* watermelon and their activation in degenerating cultures. **Plant Cell Reports** n. 30, p. 2313-2325, 2011.

VALE, P.A.A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.B.; COSTA, F.H.S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Height and number of shoots on the survival and development of micropropagated bamboo plantlets during preacclimatization. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.49, n.1, p.1-8, 2019.

WILKEN, D.; JIMÉNEZ GONZALEZ, E., GERTH, A., GÓMEZ-KOSKY, R., SCHUMANN, A., & CLAUS, D.. Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv.'Grande naine'AAA). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 5, p. 582-589, 2014.

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

ZHAO, Y., CHENG, S., SONG, Y., HUANG, Y., ZHOU, S., LIU, X., & ZHOU, D.-X.. The interaction between rice ERF3 and WOX11 promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling. **The Plant Cell**, v. 27, n. 9, p. 2469-2483, 2015.

---

### **Capítulo III**

**Avaliação da eficiência fotossintética de planta inteira e potencial fotoautotrófico do abacaxizeiro Turiacu em diferentes sistemas de cultivo *in vitro***

## Resumo

O abacaxi Turiaçu é importante para o setor frutícola, pois apresenta atributos bastante apreciados pelo mercado consumidor. A produção de mudas de qualidade dessa cultivar é necessária, sendo possível obter tal cultivar pelo uso de técnicas de micropropagação e com potencial autotrófico. Baseado nisso, objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de sacarose em diferentes sistemas de cultivo no alongamento e enraizamento *in vitro* de abacaxi cv Turiaçu visando ao aperfeiçoamento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), esquema fatorial 4x4, com quatro sistemas de cultivo: frascos de vidro com imersão permanente em meio líquido associado a tampas de polipropileno sem orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FV); frascos de vidro com imersão permanente em meio líquido associado à tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FM); biorreatores de imersão temporária de frasco simples tipo Plantform<sup>®</sup> (SIT-PF); e biorreatores de imersão temporária de frascos duplos tipo Ralm<sup>®</sup> (SIT-RALM), associados a quatro concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>), totalizando 16 tratamentos. Os resultados demonstraram que abacaxizeiro cv. Turiaçu possui potencial fotoautotrófico, visto o desenvolvimento das plantas na ausência de sacarose e com a utilização dos sistemas que possibilitam as trocas gasosas. Os tratamentos BIT-RALM e BIT-PF foram os que possibilitaram a maior rusticidade para as plantas de abacaxi. Além disso, a diminuição da sacarose do meio de cultivo aumentou a eficiência fotoquímica das plantas.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* L. Merr., Sistemas de cultivo, Fotoautotrofia.

## Abstract

Turiaçu pineapple is important for the fruit sector, as it has attributes highly appreciated by the consumer market. In addition, the production of quality seedlings of this cultivar is necessary, being possible to obtain this cultivar by the use of micropropagation techniques and with autotrophic potential. Based on this, the objective of this work was to evaluate different concentrations of sucrose in different cultivation systems in the *in vitro* stretching and rooting of turiaçu cv pineapple aiming at the improvement of photoautotrophic micropropagation systems. The experiment was conducted in a completely randomized design (IHD), 4x4 factorial scheme, with four cultivation systems: glass vials with permanent immersion in liquid medium associated with polypropylene caps without holes covered by porous membranes to gases (SIP-FV); glass vials with permanent immersion in liquid medium associated with polypropylene caps with two holes of 10 mm each, covered by porous membranes with gases (SIP-FM); Plantform simple bottle temporary immersion bioreactors® (SIT-PF); and temporary immersion bioreactors of ralm® double vials (SIT-RALM), associated with four sucrose concentrations (0, 5, 15 and 30 g L<sup>-1</sup>), totaling 16 treatments. The results showed that pineapple cv. Turiaçu has photoautotrophic potential, given the development of plants in the absence of sucrose and with the use of systems that enable gas exchange. The treatments BIT-RALM and BIT-PF were what allowed the greatest rusticity for the pineapple plants. In addition, the decrease in sucrose in the culture medium increased the photochemical efficiency of the plants.

**Keywords:** *Ananas comosus L. Merr.*, cultivation systems, Photoautotrophy.

## 1. Introdução

Para uma decisiva viabilização do sistema de produção de frutas, manter o elevado padrão de qualidade morfofisiológica e fitossanitária das plantas é de extrema importância (HAWERROTH et al., 2010), sobretudo em culturas em expansão e com grande apreço no mercado consumidor, como é o caso da cultura do abacaxi cv. Turiaçu (REIS et al., 2019). Esta pode ser propagada *in vitro*, proporcionando a obtenção de muitas mudas isentas de pragas e doenças, num curto intervalo de tempo. No entanto, o emprego da micropropagação convencional pode comprometer a qualidade fisiológica das plantas produzidas no ambiente *in vitro* e diminuir a sobrevivência durante o período de aclimatização (XIAO; KOZAI, 2004).

Diante desse cenário, algumas alterações no sistema de cultivo podem ser implementadas. Como exemplo, o sistema fotomixotrófico, o qual proporciona o aumento das trocas gasosas dos frascos de cultivo, elevação da qualidade e da intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), e redução da sacarose do meio de cultura. Assim, neste sistema, a eficiência fotoquímica e a assimilação fotossintética do carbono do material vegetal são elevadas, o que se pode produzir plantas mais rústicas metabolicamente (XIAO; KOZAI, 2004; FUENTES et al., 2007; DAMIANI; SCHUCH, 2008). Com a elevação das trocas gasosas, as plantas podem ter maior capacidade fotossintética, o que, durante o processo de aclimatização, irá proporcionar as plantas terem maior tolerância aos fatores ambientais supra e infra ótimos (KOZAI, 2010; XIAO et al., 2011; BATISTA et al., 2017).

Entre as práticas utilizadas para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas e conferir maior rusticidade do material vegetal cultivado *in vitro*, destaca-se a eliminação total ou a redução na concentração da sacarose do meio de cultura (KOZAI e KUBOTA, 2001). De fato, a sacarose é o açúcar mais utilizado na micropropagação, e, em teores elevados, pode inibir a síntese de clorofila em algumas espécies cultivadas (RODRIGUES et al., 2006). A utilização de diferentes sistemas de cultivo, como o uso de biorreatores de imersão temporária (BIT), pode ser efetiva na micropropagação fotoautotrófica, visto que, segundo KOZAI e KUBOTA (2001), o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e a diminuição da concentração de etileno e da umidade relativa dentro dos frascos de cultivo, em associação à elevação na intensidade da RFA, podem



aumentar a atividade fotossintética das plantas *in vitro* e otimizar o crescimento do material vegetal neste ambiente.

No sistema de cultivo *in vitro* convencional, uma alternativa para melhoria do crescimento vegetal, é a utilização de frascos com membranas permeáveis a gases, pois as trocas gasosas interferem nos processos morfogênicos, e promove a maior atividade do aparato fotossintético das plantas durante a propagação *in vitro* (KOZAI, 2010; SALDANHA et al., 2012). O uso de biorreatores pode ser uma excelente alternativa para aperfeiçoar e melhorar o processo de propagação do abacaxizeiro cv. Turiaçu. O uso do BIT pode aumentar a produção de plantas, com maior taxa de multiplicação/crescimento, redução de mão-de-obra, e assim reduzir os custos elevados da produção de mudas por cultura de tecidos (TAKAYAMA e AKITA, 2005; PENCHEL et al., 2007). Além disso, o uso do BIT favorece a autotrofia do material vegetal (ARAGÓN et al., 2014).

Nesse sentido, objetivou-se avaliar diferentes concentrações de sacarose em diferentes sistemas de cultivo no alongamento e enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro cv. Turiaçu visando o aperfeiçoamento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica.

## **2. Material e Métodos**

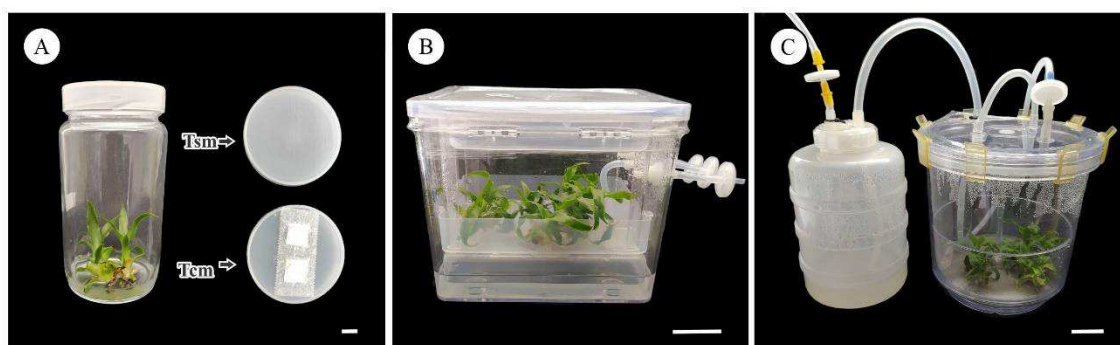
### **2.1 Material vegetal e condições de cultivo**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), localizado em São Luís, MA (Latitude: 2° 31' 51" Sul, Longitude: 44° 18' 24" Oeste). Foram utilizadas brotações previamente estabelecidas *in vitro* de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu e subcultivadas sucessivamente por três vezes em meio de cultura MS (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 2 µM ácido naftalenoacético (ANA) (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 4 µM de benzilaminopurina (BAP) (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Isofar<sup>®</sup> Ltda, Duque de Caxias - RJ).

Em câmara de fluxo laminar, as brotações, com aproximadamente três centímetros de comprimento de parte aérea, tiveram o sistema radicular seccionado e em seguida foram transferidas para os diferentes sistemas de cultivo, sendo padronizado o meio de cultura MS (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 2,7 µM de ácido naftalenoacético (ANA)

(Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), e diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , e autoclavado (121 °C, 1,5 atm, 15 min.).

Os sistemas de cultivo avaliados foram: 1) frascos de vidro com imersão permanente das brotações em meio líquido, associado a tampas de polipropileno vedadas (SIP-FV) (Tsm, Figura 1A); 2) frascos de vidro com imersão permanente das brotações em meio líquido, associado a tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FCM) (Tcm, Figura 1A); 3) biorreatores de imersão temporária das brotações em frasco simples tipo Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF) (Figura 1B), e 4) biorreatores de imersão temporária das brotações em frascos duplos tipo Ralm<sup>®</sup> (BIT-RALM) (Figura 1C).



**Figura 10.** Diferentes sistemas de cultivo utilizados no alongamento e enraizamento *in vitro* de brotações de *Ananas comosus* L. Merr. cv. Turiaçu. 1) Sistemas de imersão permanente (SIP-FV e SIP-FCM), Tsm - tampas de polipropileno vedada sem orifícios cobertos por membranas permeáveis a gases, Tcm – tampa de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas permeáveis à gases (A); biorreatores de imersão temporária de frasco simples - Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF) (B) e biorreatores de imersão temporária de frascos duplos - Ralm<sup>®</sup> (BIT-RALM) (C). Barras: a: 1cm; b-c: 3cm.

Para a quantidade de brotações adotada em cada sistema de cultivo, adotou-se um valor de brotos por quantidade de volume de meio de cultura. Assim, em ambos os sistemas de imersão permanente (SIP-FV e SIP-FCM) foram inoculados dois explantes em frascos com capacidade de 350 ml e 50 ml de meio de cultura. Para o sistema de imersão temporária de frasco simples - Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF), foram inoculados oito explantes em 200 ml de meio de cultura. No sistema de imersão temporária de frascos

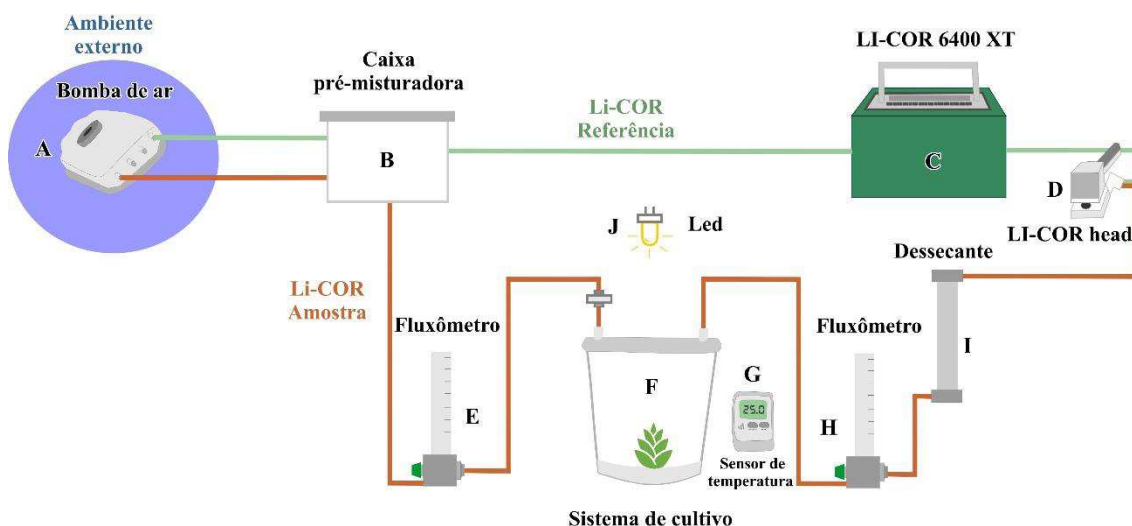
duplo Ralm<sup>®</sup> (BIT-RALM), foram utilizados 10 explantes em 250 mL de meio de cultura.

Nos sistemas de imersão permanente (SIP-FV e SIP-FCM), os frascos de cultivo foram vedados com tampas de prolipropileno. Nas tampas de polipropileno do sistema SIP-FCM, foram feitos dois orifícios, de 10 mm de diâmetro cada, cobertos por membranas permeáveis a gases. Estas membranas eram compostas por duas camadas de fita microporosa Missner<sup>®</sup> e um PTFE (politetrafluoroetileno) Poly<sup>®</sup> de  $0,05 \pm 0,01$  mm de espessura (Figura 1A), seguindo a metodologia proposta por Saldanha et al. (2012).

Os diferentes sistemas de cultivo foram mantidos na sala de crescimento com temperatura ajustada para  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16h com a intensidade da RFA de  $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proveniente de lâmpadas tubulares de diodos emissores de luz (LEDs) de cor branca (T8 Led, 20 w, Elgin, Brasil) e 8h no escuro. Em ambos os biorreatores de imersão temporária (BIT- PF e BIT-RALM), o tempo de imersão das brotações em meio de cultivo foi regulado por temporizador programado para um intervalo de três horas, mantendo os brotos em contato com o meio de cultura por 5 min.

## **2.2 Medição das trocas gasosas de planta inteira em sistemas de cultivo *in vitro***

Para a realização da medição das trocas gasosas nos diferentes sistemas de cultivo, foram realizados alguns ajustes e adaptações no sistema convencional de medição de trocas gasosas, para que fosse possível a avaliação de planta inteira, nas condições *in vitro*. Para isso, o sistema de medição de trocas gasosas foi composto por: uma bomba de ar (Hailea<sup>®</sup>, 10 L/min), mangueiras flexíveis de silicone (3 mm  $\varnothing$  interno), uma caixa pré-misturadora de policarbonato hermeticamente fechada (18  $\times$  16  $\times$  15 cm), dois fluxômetros (Protec<sup>®</sup>) (0 a 15 L/min), um cilindro desumidificador (47,1 cm<sup>3</sup>), um sensor de temperatura (Incoterm<sup>®</sup>) e um analisador de gás infravermelho (IRGA, Infrared Gas Analyzer, LI-6400 XT, Licor Ltda, USA) (Figura 2).



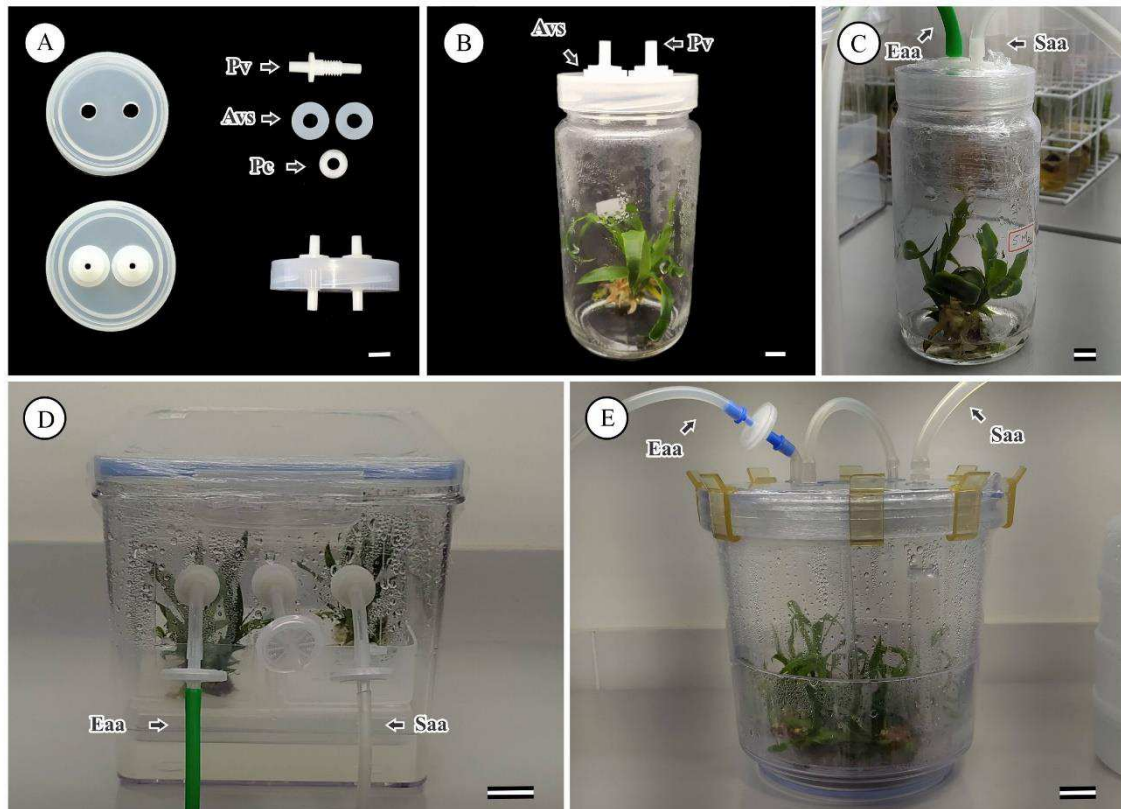
**Figura 11.** Esquema da avaliação das trocas gasosas de planta inteira em sistemas de cultivo *in vitro*. (A) Bomba de ar; (B) Caixa pré-misturadora; (C) Console (LI-COR 6400 XT); (D) Cabeça do IRGA; (E, H) Fluxômetro; (F) Sistema de cultivo a ser avaliado (Biorreator com brotos); (G) Sensor de temperatura; (I) Cilindro com dessecante; (J) fonte de luz proveniente de diodos emissores de luz (LEDs -  $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Esse sistema inicia-se com o acionamento da bomba (Figura 2A) com duas saídas de ar, localizada em ambiente externo ao laboratório, onde o ar (com  $\text{CO}_2$  ambiente) pressurizado circula através de mangueiras flexíveis de silicone. O ar da bomba segue dois destinos: na primeira saída, circula o ar de referência (LI-COR referência), no qual o fluxo de ar é direcionado para a caixa pré-misturadora (Figura 2B) para homogeneizar e estabilizar as concentrações do  $\text{CO}_2$  de referência. Ao sair da caixa pré-misturadora, o ar circula até o analisador de gases por infravermelho para medição da concentração de  $\text{CO}_2$ , obtendo-se as medidas do ar de referência (LI-COR® head) (Figura 2D).

Na segunda saída, o fluxo de ar é direcionado para a caixa pré-misturadora (Figura 2B) para homogeneizar e estabilizar as concentrações do  $\text{CO}_2$  de amostra (LI-COR® amostra), onde o ar é bombeado e segue para o primeiro fluxômetro (Figura 2E), ajustado a uma taxa de fluxo constante de  $4 \text{ L min}^{-1}$ . Em seguida, o fluxo de ar segue até a entrada nos sistemas de cultivo (Figura 2F), percorrendo uniformemente toda a parte aérea das plantas. Nesse momento, o sensor de temperatura (Figura 2G) faz a medição da temperatura do ar que circulou sobre as plantas. Ao sair do sistema de cultivo para ser analisado, o ar segue para o segundo fluxômetro (Figura 2H), no qual é ajustado a

uma taxa de fluxo constante de  $1 \text{ L min}^{-1}$ , posteriormente, este ar de amostra é levado até um cilindro contendo dessecante (Drierite<sup>®</sup>) (Figura 2I) para a retirada do vapor d'água, e segue para o analisador de gases por infravermelho IRGA (LI-6400 XT, Licor Ltda, USA). Para tanto, foi adotado um fluxo de  $1 \text{ L min}^{-1}$  para a entrada segura ao analisador de gás, que não pode passar de  $2 \text{ L min}^{-1}$  para evitar danos internos ao equipamento. Assim, as concentrações de  $\text{CO}_2$  de amostra puderam ser mensuradas (LICOR head) (Figura 2D), e as diferenças entre as medidas do ar de amostra e do ar de referência são utilizadas para o cálculo das trocas gasosas.

Em todos os sistemas de cultivo, a avaliação das trocas gasosas ocorreu aos 50 dias de cultivo *in vitro* em todos os sistemas de cultivo (Figuras 2 e 3) ainda em condições de sala de crescimento, com a finalidade de manter a avaliação nas condições de temperatura, umidade e RFA em que as plantas cresceram. Para permitir a avaliação nos sistemas de imersão permanente (SIP-FSM e SIP-FCM), foram utilizadas tampas de polipropileno com dois orifícios de 8 mm de diâmetro cada, no qual foram rosqueados dois parafusos de polipropileno vazados, acoplados com anéis de vedação de silicone na parte interna e externa da tampa (Figura 3A).



**Figura 12.** Esquema da adaptação das tampas de polipropileno dos frascos para permitir a avaliação das trocas gasosas do abacaxi cv. Turiaçu *in vitro*. Tampa adaptada com parafusos vazados de polipropileno para entrada e saída de ar (A); Frasco de cultivo com plântula de abacaxi e tampa adaptada (B); Avaliação das trocas gasosas no frasco de cultivo (SIP-FV e SIP-FCM) (C); Avaliação das trocas gasosas no sistema de imersão temporária de frasco simples - Plantform® (BIT-PF) (D); Avaliação das trocas gasosas no sistema de imersão temporária de frasco duplo Ralm® (SIT-RALM) (E); Abreviaturas: Pv - parafuso vazado de polipropileno; Avs —Anel de vedação de silicone; Pc - Porca de polipropileno; Eaa – Entrada do ar de amostra; Saa – Saída do ar de amostra Barras: A-C: 1cm; D-E: 2cm.

Para realizar a medição das trocas gasosas nos sistemas de cultivo (SIP-FV e SIP-FCM) a tampa adaptada (Figura 3 A) foi trocada em fluxo laminar para posterior avaliação. A entrada de ar (ar de referência) ocorre por uma mangueira flexível de silicone e entram no frasco de cultivo por meio dos parafusos vazados de polipropileno mantidos na tampa dos frascos (Figura 3B), de modo que o fluxo de ar percorra uniformemente por toda a parte aérea das plantas ainda *in vitro*, no qual subsequentemente o ar de saída (ar de amostra) é levado ascendentemente até outra mangueira localizada na outra extremidade da tampa (Figura 3C), e assim o ar ser

analisado no IRGA. Para os biorreatores de imersão temporária (BIT-PF e BIT - RALM), as avaliações ocorreram normalmente nas próprias conexões de entrada e saída de ar que pressurizam o sistema (Figura 3D e 3E) respectivamente.

Para validar esta metodologia de medição das trocas gasosas de planta inteira *in vitro*, o ar de referência e de amostra foram registrados em diferentes tempos 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; e 20 minutos, com o intuito de monitorar e visualizar o momento de estabilização da leitura. Assim, o tempo de leitura, tanto do ar de referência quanto do ar de análise, foi de 20 minutos em cada repetição, (sistema de cultivo).

O ajuste das equações se deu a partir de modificações nas equações fornecidas pelo próprio manual do equipamento (LI-6400/LI-6400XT *Versão 6*), conforme descrito a seguir:

a) Taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A):

$$A = \frac{\Delta\text{CO}_2 \times F \times 10^{-3} \times 273}{60 \times 22,415 \times (T_c + 273) \times AF}$$

Em que:

$\Delta\text{CO}_2$  = Diferença entre a concentração de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) do ar de referência e a concentração do ar de amostra;

F = Taxa de fluxo de ar que passa pelo frasco de cultivo ( $\text{L min}^{-1}$ );

T<sub>c</sub> = Temperatura da câmara durante a medição ( $^{\circ}\text{C}$ );

22,415 = Constante do volume molar ( $\text{L mol}^{-1}$ ) dos gases na CNTP;

AF = Área foliar das plantas dentro dos sistemas de cultivo em m<sup>2</sup> (ou grama de matéria seca das folhas ou da parte aérea das plântulas dentro do sistema de cultivo). Os cálculos foram feitos com base na área foliar e os dados foram expressos em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

### 2.3 Delineamento experimental e variáveis analisadas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x4, com quatro sistemas de cultivo: frascos de vidro com imersão permanente das brotações em meio líquido associado a tampas de polipropileno vedadas (SIP-FV); frascos de vidro com imersão permanente das brotações em meio líquido associado à tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas permeáveis a gases (SIP-FCM); biorreatores de imersão temporária das brotações de frasco simples tipo Plantform<sup>®</sup> (BIT-PF); e biorreatores de imersão temporária das brotações de frascos duplos tipo Ralm<sup>®</sup> (BIT-RALM), associados a

quatro concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>), totalizando 16 tratamentos, com quatro repetições cada.

Aos 50 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA, cm), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR, cm), área foliar (AF, cm<sup>2</sup>), massa fresca e seca da parte aérea e radicular (MFPA, MSPA, MFR, MSR, g), rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), o índice fotossintético (PI), densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS), assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (A,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), índice SPAD, pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total, carotenoides, clorofila *a/b*, clorofila (*a+b*)/carotenoides ( $\mu\text{g mm}^{-2}$ ) e índice estomático (IE, %).

#### **2.4 Área foliar e variáveis de massa fresca e seca**

Aos 50 dias de cultivo *in vitro* (final do experimento), foram realizadas as variáveis área foliar (AF, cm<sup>2</sup>), no qual foi determinada utilizando o software Image J<sup>®</sup>. Para realização das análises das massas fresca da parte aérea (MFPA, g) e radicular (MFR, g), as plantas foram cortadas na altura do colo e logo em seguida, pesadas em balança analítica de precisão, sendo então acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas a estufa de circulação forçada de ar à 70 °C por 48 horas. Posteriormente, este material foi pesado para obtenção dos valores das massas secas da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR) (COUTO et al., 2014).

#### **2.5 Volume radicular**

Aos 50 dias de cultivo *in vitro* (final do experimento), foi avaliado o volume de raiz (cm<sup>3</sup>), realizada por meio da medição do deslocamento da coluna de água em proveta graduada, ou seja, colocando-se as raízes, após lavagem, em proveta contendo um volume conhecido de água (10 mL). Pela diferença, obteve-se a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades (1 mL = 1 cm<sup>3</sup>), segundo metodologia descrita por Basso (1999).



## 2.6 Eficiência fotoquímica e índice SPAD

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

No mesmo período, e na mesma folha utilizada na avaliação da emissão da fluorescência, foi analisado o índice SPAD, que mede a intensidade de cor verde das folhas, foi avaliado por meio do medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 (*Soil Plant Analysis and Development, Minolta, Japão*). Para isso, na folha, foram realizadas três leituras próximo a base, ao meio e ao ápice. Para esta variável, foi adotada a quinta folha contada a partir do ápice para a base das plantas.

## 2.7 Pigmentos fotossintéticos

Aos 50 dias do cultivo *in vitro* (final do experimento), os teores de pigmentos fotossintéticos foram determinados por meio do método espectrofotométrico de extração usando o solvente extrator orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), adaptado de Santos et al., (2008). Para isso, foram retirados cinco discos de 5 mm de diâmetro. Estes discos foram retirados na quinta folha contada a partir do ápice, e foram acondicionados em tubos de ensaio, contendo 5mL da solução de DMSO. Após, os discos foram mantidos no escuro por 48 h, em temperatura ambiente ( $\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (BEL Engineering, UV-M51 UV/Vis Spectrophotometer, Itália), usando as absorvâncias 480, 645 e 665 nm, e os os teores de clorofila e carotenoides totais calculados de acordo com as equações de Wellburn (1994):

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

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

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

A partir das equações supracitadas, foi possível obter os valores da concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, clorofila total, razão clorofila *a/b*, clorofila total/carotenoides.

## 2.8 Índice estomático

Para avaliar o índice estomático foi usado adesivo instantâneo (SuperBonder<sup>®</sup>), as lâminas foram montadas utilizando-se a impressão epidérmica abaxial da quinta folha a partir do ápice. O material foi analisado em microscópio Leica DME e fotografado com auxílio do aplicativo LAS EZ (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). As imagens foram processadas pelo *software* Image J<sup>®</sup> e o índice foi calculado de acordo com Cutter (1978):

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

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

## 2.9 Aclimação

Ao final dos 50 dias de cultivo *in vitro*, cinco plantas de cada tratamento foram conduzidas e cultivadas em casa de vegetação, localizada na Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, MA (Latitude: 2° 31' 51" Sul, Longitude: 44° 18' 24" Oeste). Para isso, as plantas, provenientes dos diferentes tratamentos do experimento supracitado, foram retiradas dos frascos de cultivo e lavadas em água corrente para remover os resíduos de meio de cultura aderido às raízes. As plantas foram transferidas para copos descartáveis de poliestireno, com capacidade total de 200 mL. Estes recipientes foram preenchidos com substrato comercial Pindstrup<sup>®</sup>, composto por 75% de turfa loira e 25% de turfa negra, com uma textura fina/média. Em condições de casa de vegetação, as plantas foram mantidas sob irrigação por sistema de microaspersão, acionado durante de 2 min a cada 3 h, das 6:00 às 18:00 horas. Após 30 dias de cultivo, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência (%) das plantas.

## 2.10 Análises estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e as diferenças significativas foram determinadas por análise de variância com dois fatores (ANOVA TWO-WAY). Para as médias de dados quantitativos aplicou-se regressão, e para dados qualitativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey HSD ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

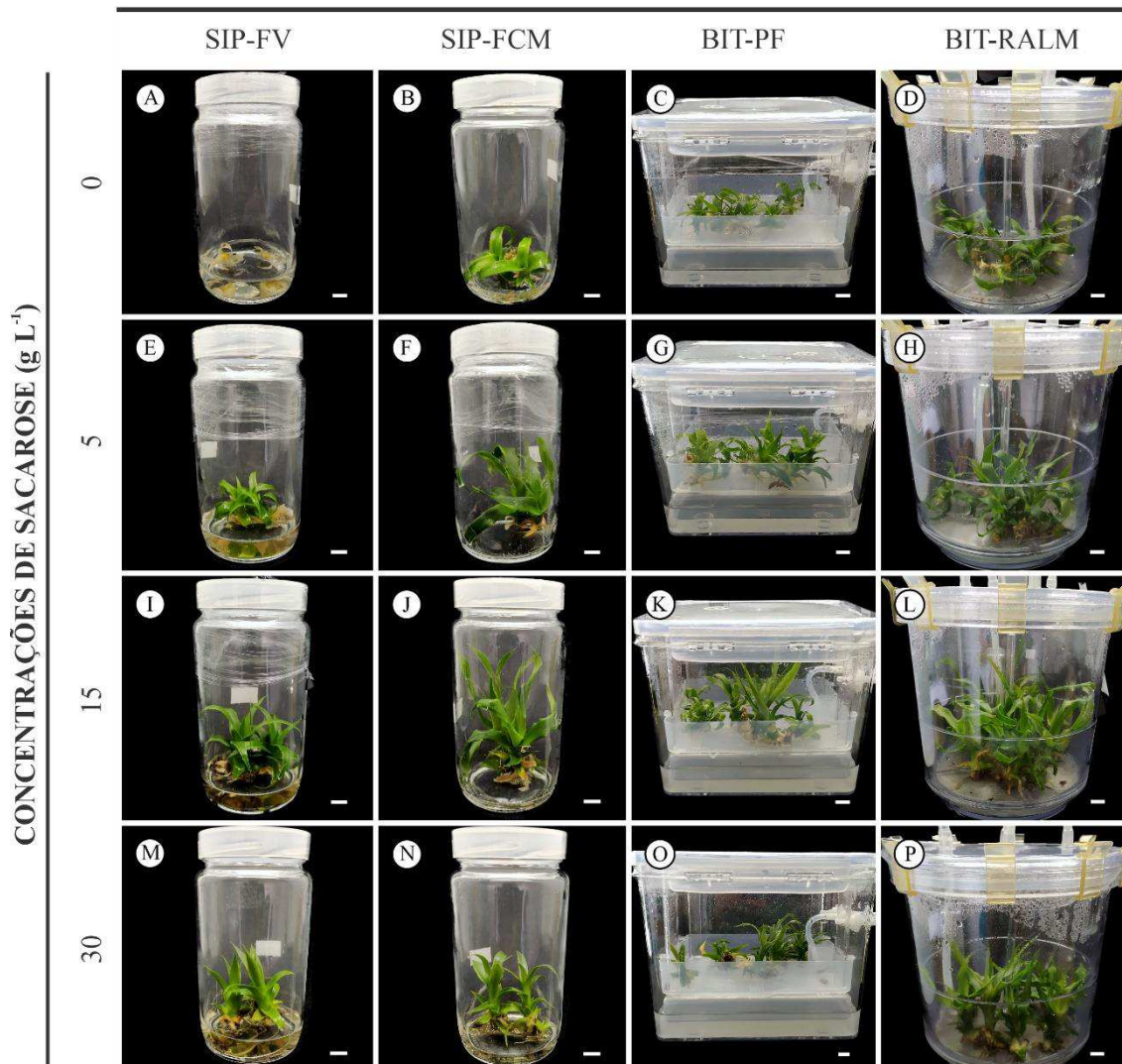
## 3. Resultados

A partir da análise de variância, foi possível observar que as variáveis comprimento de planta (cm), número de folhas, área foliar ( $\text{cm}^2$ ), volume de raiz ( $\text{cm}^3$ ), comprimento de raiz (cm), massa fresca da parte aérea (MFPA, g), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa fresca de raiz (MFR, g), massa seca de raiz (MSR, g) assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$ , clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenoide, clorofila total/carotenoide, rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ), densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS), índice fotossintético (PI), índice SPAD, índice estomático e sobrevivência (%), tiveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1 Parâmetros de crescimento

As plantas mantidas no sistema de cultivo (SIP-FV) em condições de meio de cultura sem adição de carboidrato ( $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose) não sobreviveram (Figura 4A), contrariamente ao observado nas restantes concentrações de sacarose em SIP-FV, e nos restantes sistemas de cultivo (em todas os valores os de sacarose), em que as plantas mantiveram o seu crescimento (Figura 4B a P).

## SISTEMAS DE CULTIVO



**Figura 13.** Crescimento das plantas de *Ananas comosus* cv. Turiagu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) nos vários sistemas de cultivo (SIP-FV, SIP-FCM, BIT-PF e BIT-RALM). Barras = 1cm.

Para interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de cultivo, as variáveis comprimento de planta e número de folhas tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Em ambas as variáveis, a maioria dos sistemas ajustaram-se ao modelo quadrático de regressão, exceto variável número de folhas, associado aos tratamentos com BIT-RALM (Figura 5). Com relação à variável comprimento de planta, os tratamentos BIT-RALM ( $R^2 = 97,41\%$ ), BIT-PF ( $R^2 = 96,12\%$ ) e SIP-FV ( $R^2 = 85,19\%$ ), tiveram um incremento no valor desta variável até a quantidade de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com posterior decréscimo na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para a variável número de folhas e na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, os tratamentos BIT – PF ( $R^2 =$

86,27%), SIP – FV ( $R^2 = 88,70\%$ ) e SIP – FCM ( $R^2 = 96,42\%$ ) tiveram o maior número de folhas.

Ainda para as mesmas variáveis o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas para a maioria das concentrações de sacarose, exceto na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose para variável número de folhas (Figura 5A e 5B).

Com relação à variável comprimento de planta, o tratamento BIT-RALM (8,08 cm) na concentração de  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, quando comparado aos tratamentos SIP-FCM e SIP-FV (5,05 e 0 cm, respectivamente), teve o maior comprimento de planta. Para a concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, quando comparadas ao tratamento SIP-FV (5,48 cm), o maior comprimento de planta foi observado nos tratamentos BIT-RALM (9,42 cm), BIT-PF (8,28 cm) e SIP-FCM (8,62 cm).

Para a concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose os tratamentos BIT-RALM (9,75 cm) e SIP-FCM (9,81 cm), em relação aos demais sistemas de cultivo, tiveram as maiores medias de altura de plantas. Para a concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose o tratamento BIT-RALM (7,50 cm) teve maior comprimento de planta, apenas quando comparado ao SIP-FV (5,22 cm). Quanto a variável número de folhas o tratamento BIT-RALM (13,25) apresentou maior comprimento de plantas para a concentração de  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose. Para a concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, a maior média de número de folhas foi para o tratamento BIT-RALM (12,5), que diferiu apenas do tratamento SIP-FCM (8,75). Para a concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose a maior média de número de folhas foi para o tratamento BIT-PF (13,25), que diferiu apenas do tratamento SIP-FCM (10) (Figura 5A e 5B).

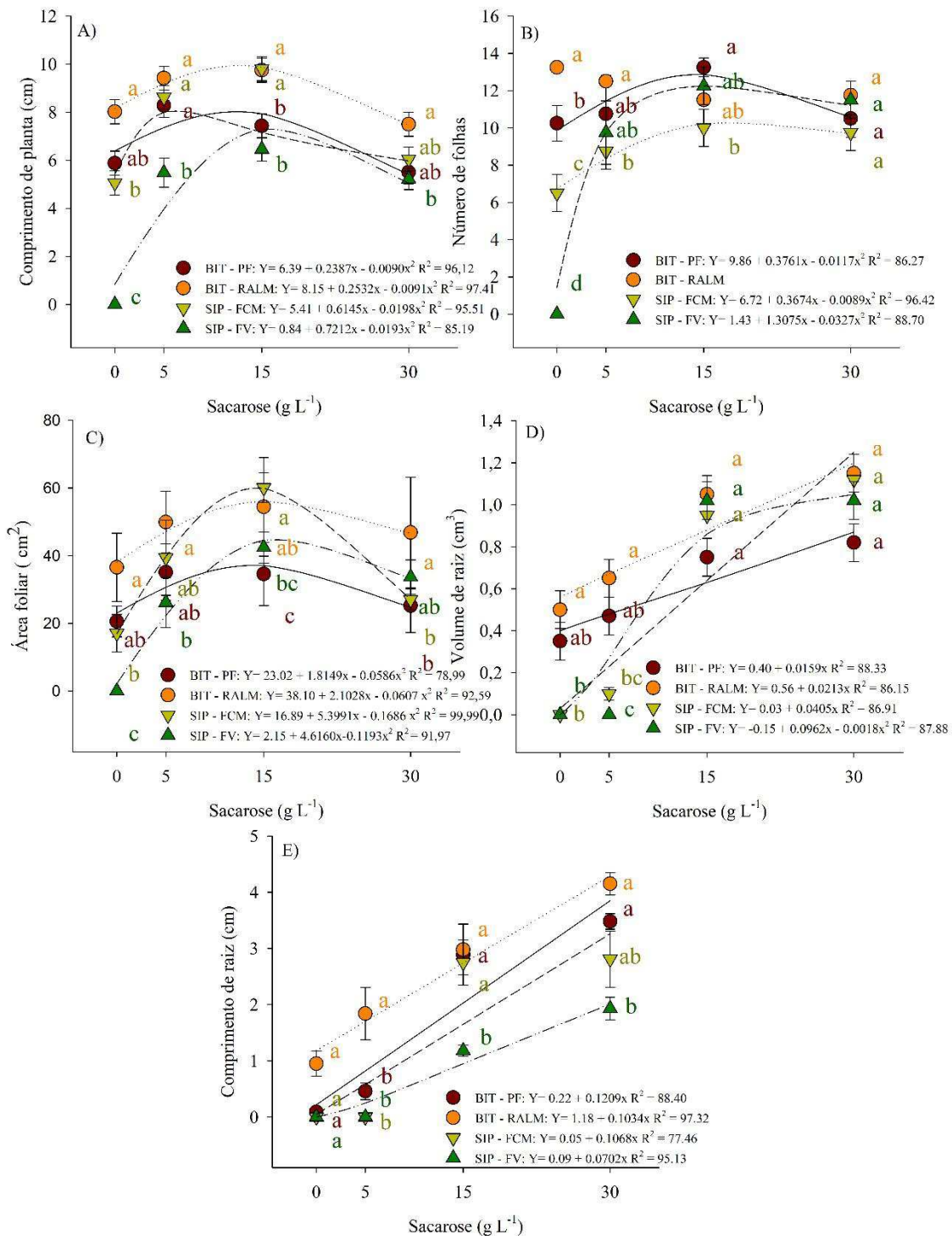
A área foliar também foi afetada pelas concentrações de sacarose, em todos os sistemas de cultivo, onde os maiores valores obtidos ocorreram na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (Figura 5C). Ainda para a mesma variável o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas para todas as concentrações de sacarose. O tratamento BIT-RALM apresentou as maiores medias de área foliar nas concentrações de  $0, 5$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose com (36,54, 49,90 e 46,83  $\text{cm}^2$ ), respectivamente.

As variáveis volume de raiz e comprimento de raiz foram influenciadas pelo fator concentração de sacarose (Figura 5D e 5E). Em ambas as variáveis a maioria dos sistemas ajustaram-se ao modelo quadrático de regressão, exceto o tratamento SIP-FV para a variável comprimento de raiz que se ajustou ao modelo de regressão linear ( $R^2 =$

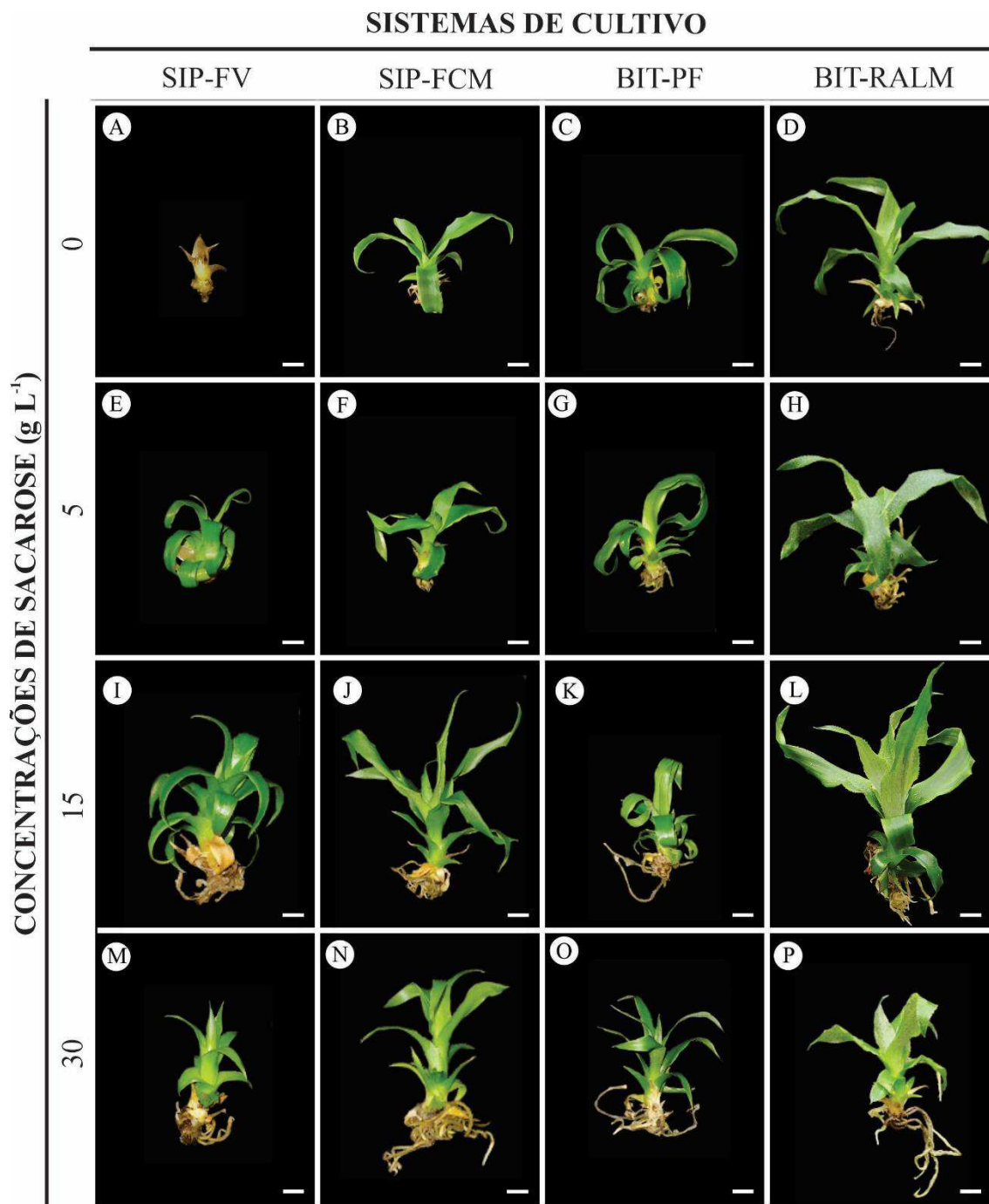
87,88). Tanto a variável volume de raiz quanto a variável comprimento de raiz apresentaram o aumento crescente em função do aumento da concentração de sacarose em todos os sistemas de cultivo (Figura 6A - 6P).

Ainda para as variáveis volume de raiz e comprimento de raiz o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas para a maioria das concentrações de sacarose (Figura 5D e 5E). Para a variável volume de raiz o tratamento BIT-RALM apresentou a maior média para a concentração de 0 e 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose (0,5 e 0,65cm<sup>3</sup>, respectivamente), diferindo apenas aos tratamentos SIP-FCM e SIP-FV (com ausência de raiz). Quanto ao comprimento de raiz, houve diferença significativa apenas para as concentrações de 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM mostrou-se superior aos demais sistemas de cultivo, apresentando plantas com maior comprimento de raiz (0,95 cm). Para a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (2,98 cm), BIT-PF (2,89 cm) e SIP-FCM (2,75 cm) não diferiram entre si, e as plantas apresentaram maior comprimento de raiz quando comparado ao tratamento SIP-FV (1,18 cm). Quando se avaliou dentro da concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (4,15 cm) e BIT-PF (3,98 cm) foram superiores apenas quando comparado ao SIP-FV (1,93 cm) (Figura 5D e 5E).



**Figura 14.** Comprimento de planta (cm) (A), número de folhas (B), área foliar (C) volume de raiz (cm<sup>3</sup>) (D), comprimento de raiz (cm) (E), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo in vitro, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose.



**Figura 15.** Plantas de *Ananas comosus* cv. Turiagu aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) nos vários sistemas de cultivo (SIP-FV, SIP-FCM, BIT-PF e BIT-RALM). Barras = 1cm.



Para a variável massa fresca da parte aérea (MFPA) houve diferença significativa para interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de cultivo (Figura 7A). O tratamento BIT-RALM ( $R^2 = 96,42\%$ ) ajustou-se ao modelo de regressão linear, enquanto os tratamentos SIP-FCM ( $R^2 = 99,87\%$ ) e SIP-FV ( $R^2 = 96,85\%$ ) ajustaram-se ao modelo de regressão quadrática (Figura 7A). Para os tratamentos BIT- RALM e SIP-FV houve o incremento crescente de massa fresca da parte aérea em função do aumento das concentrações de sacarose (Figura 6).

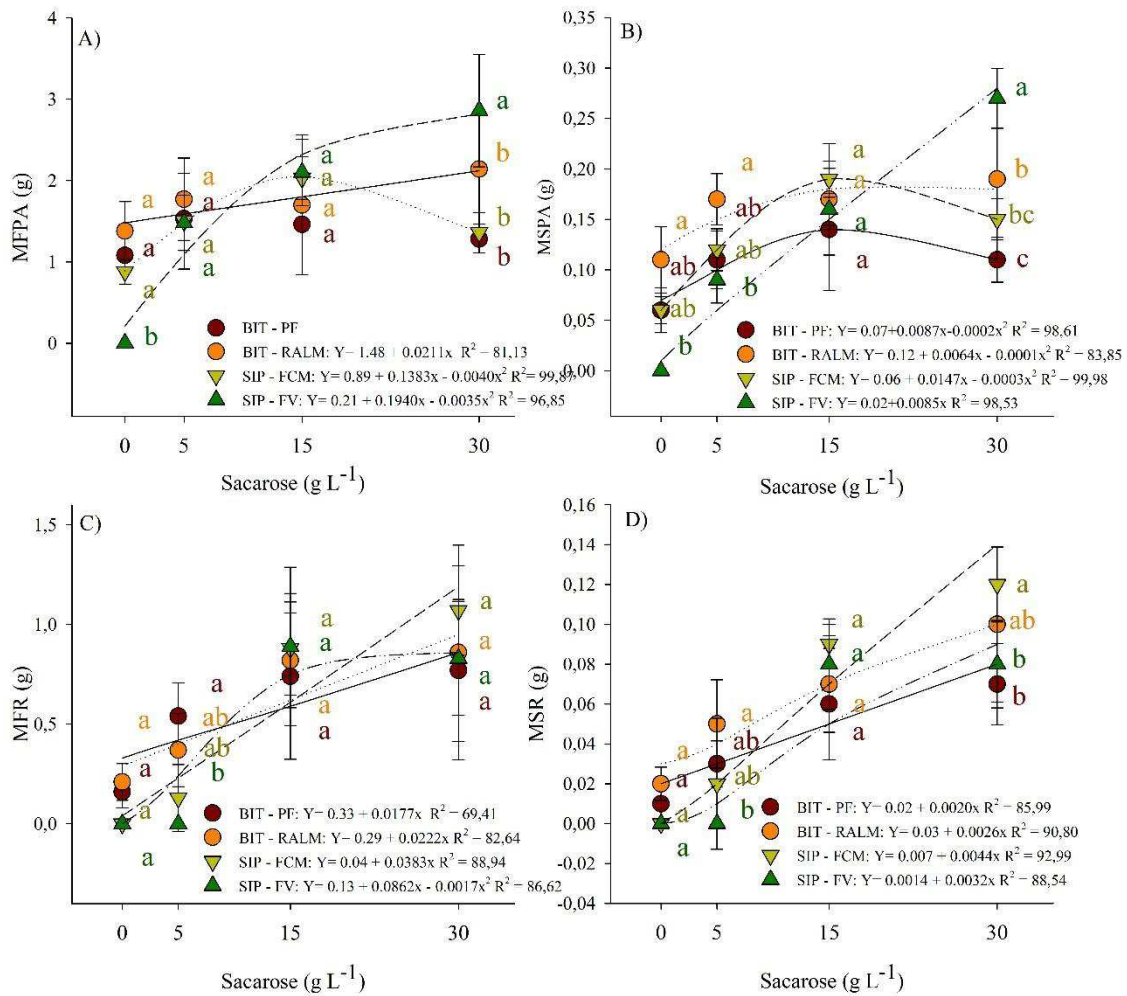
Para o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, houve diferenças significativas apenas para a concentrações de 0 e 30 g L<sup>-1</sup>. Para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> os tratamentos BIT- RALM (1,38 g), BIT-PF (1,08 g) e SIP-FCM (0,88 g) apresentaram maior incremento de biomassa fresca. Já na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> o tratamento SIP-FV (2,86 g) apresentou maior acúmulo de MFPA em relação aos demais sistemas de cultivo (Figura 9A)

A variável massa seca da parte aérea (MSPA) apresentou efeito significativo em função das concentrações de sacarose (Figura 7B). O tratamento SIP-FV ( $R^2 = 98,53$ ) ajustou-se ao modelo de regressão linear, enquanto os tratamentos BIT- RALM ( $R^2 = 83,35$ ), BIT-PF ( $R^2 = 98,61$ ) e SIP-FCM ( $R^2 = 99,99$ ) ajustaram-se ao modelo de regressão quadrática (Figura 9B). Para os tratamentos BIT- RALM, BIT-PF e SIP-FCM a curva de regressão teve o comportamento crescente da massa seca parte aérea até a concentração de 15 g L<sup>-1</sup>, no entanto, ao aumentar a concentração de sacarose para 30 g L<sup>-1</sup> os tratamentos BIT-PF e SIP-FCM apresentaram um pequeno decréscimo. O tratamento SIP-FV apresentou um aumento crescente em função do aumento da concentração de sacarose (Figura 7B).

Para o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, houve diferenças significativas apenas para a concentrações de 0, 5 e 30 g L<sup>-1</sup> (Figura 7B). Para as concentrações de 0 e 5 g L<sup>-1</sup> o tratamento BIT- RALM (0,11 e 0,17 g, respectivamente) apresentou as maiores médias de MSPA com diferenças significativas apenas em comparação com o tratamento SIP-FV (0 e 0,09 g, respectivamente). Para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> o tratamento SIP-FV (0,27 g) apresentou maior acúmulo de MSPA em comparação com os demais sistemas de cultivo.

As variáveis massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR) apresentaram diferença significativa para a interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de cultivo (Figura 7C e 7D). Para ambas as variáveis, e na maioria dos tratamentos, o modelo de regressão linear foi o de melhor ajuste, exceto para o tratamento SIP-FV ( $R^2 = 86,62 \%$ ), para a variável MFR, que se ajustou ao modelo de regressão quadrática. Para as variáveis MFR e MSR todos os sistemas de cultivo apresentaram acúmulo da biomassa de raiz em função do aumento da concentração de sacarose (Figura 6A - 6P).

Para o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, as variáveis MFR e MSR apresentaram diferenças significativas para as concentrações de sacarose. Para a variável MFR houve diferença significativa apenas para a concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , onde o tratamento BIT-PF (0,54 g) apresentou a maior média de MFR, com diferença significativa apenas em comparação ao tratamento SIP-FV (ausência de raiz). Já para a variável MSR as concentrações de 5 e  $30 \text{ g L}^{-1}$  apresentaram diferenças significativas entre os sistemas de cultivo. O tratamento BIT-RALM (0,05 g) apresentou a maior média de MSR na concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , apresentando diferenças significativas apenas em comparação ao tratamento SIP-FV (ausência de raiz). Na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$  o tratamento SIP-FCM (0,12 g) apresentou maiores médias de MSR, com diferença significativa em comparação aos tratamentos SIP-FSM (0,08) e BIT-PF (0,07 g) (Figura 7C e 7D).



**Figura 16.** Massa fresca da parte aérea (MFPA, g) (A), massa seca da parte aérea (MSPA, g) (B), massa fresca de raiz (MFR, g) (C), massa seca de raiz (MSR, g) (D), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. \*Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose.

### 3.2 Capacidade fotossintética

De modo geral, nas condições de cultivo *in vitro* do presente experimento, a metodologia utilizada na avaliação da assimilação de CO<sub>2</sub> de planta inteira se mostrou adequada (Figura 8).

Nas avaliações efetuadas no BIT-PF e no BIT-RALM, verificou-se que a assimilação de CO<sub>2</sub> reduziu com o tempo de avaliação (Figura 8). Para o tratamento SIP-FV, em todos os tempos de avaliação nas concentrações de 0, 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a curva permaneceu estável (Figura 8A). Contudo, tanto para o biorreator BIT-PF como para o BIT-RALM, e para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, houve uma respiração na luz (R<sub>L</sub>) de -20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, e a estabilização da leitura foi observada somente após 12,5 min (Figura 8C e 8D).

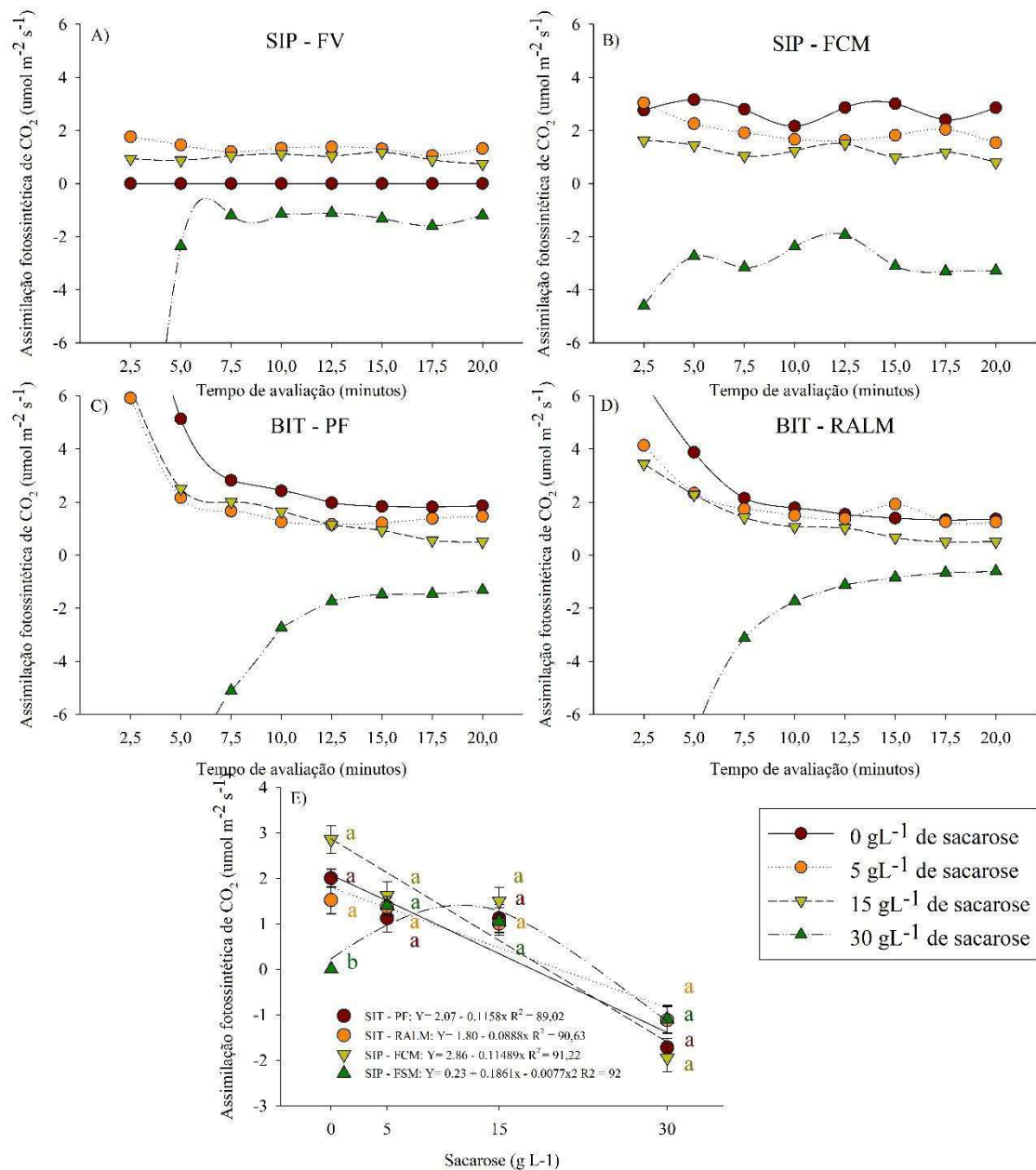
Para o tratamento SIP-FCM as curvas de assimilação fotossintética apresentaram pequenas oscilações durante os tempos de avaliação nas concentrações de 0, 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, todas as leituras permaneceram com valores positivos de assimilação fotossintética (Figura 8B). Já para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose os valores permaneceram negativos (R<sub>L</sub>) em todos os pontos da curva.

Para o tratamento BIT-PF, e para as concentrações de 0, 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, este apresentou uma curva de assimilação fotossintética decrescente até o tempo de 7,5 min, permanecendo estável e com valores positivos de assimilação fotossintética até os 20 minutos de avaliação (Figura 8C). Já para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose a curva de avaliação foi crescente até 12,5 min e manteve-se estável até os 20 minutos de avaliação, permanecendo com (R<sub>L</sub>) em todos os pontos da curva.

Para as concentrações de 0, 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o tratamento BIT-RALM apresentou a curva de assimilação fotossintética decrescente até o tempo de 10 min, permanecendo estável, e com a assimilação fotossintética até os 20 min de avaliação (Figura 8D). Já para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a curva de avaliação foi crescente até 12,5 minutos e manteve-se estável até os 20 minutos de avaliação, evidenciando uma R<sub>L</sub> em todos os tempos.

Para a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>, houve interação significativa entre os fatores sistema de cultivo e as concentrações de sacarose. O aumento da concentração de sacarose proporcionou o decréscimo linear da assimilação fotossintética para os tratamentos BIT-RALM (R<sup>2</sup> = 90,63), BIT-PF (R<sup>2</sup> = 89,02) e

SIP-FCM ( $R^2 = 91,22$ ) (Figura 8E). Para o tratamento SIP-FV ( $R^2 = 92,25$ ), ajustou-se a equação quadrática, em que na concentração de  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, houve morte das plantas. Ainda para o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro do fator concentração de sacarose, observou-se diferenças significativas apenas para a concentração de  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, onde os tratamentos BIT-RALM ( $1,52 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), BIT-PF ( $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e SIP-FCM ( $2,85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) foram superiores a o tratamento SIP-FV ( $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).



**Figura 17.** Curva de estabilização da leitura de assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> no abacaxizeiro cv. Turiaçu em função de diferentes tempos de avaliação para os diferentes tratamentos de sacarose, nos sistemas SIP-FV (A), SIP-FCM (B), BIT-PF (C) e BIT-RALM (D). Assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> de plantas *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes tipos de sistemas de cultivo e concentrações de sacarose (E). \*Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose.

Os valores do conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenoides, e da relação clorofila total/carotenoides totais, tiveram diferença significativa para a interação entre fatores sistema de cultivo e as concentrações de sacarose ( $p < 0,05$ ). Para a variável clorofila *a*, o aumento das concentrações de sacarose proporcionou o decréscimo linear no tratamento BIT-RALM ( $R^2 = 88,58$ ) (Figura 9A). Neste tratamento, houve maior concentração de clorofila *a* na concentração de 0 g L<sup>-1</sup> (62,22 µg mL<sup>-1</sup>). Para os tratamentos BIT-PF ( $R^2 = 76,54$ ) e SIP-FSM ( $R^2 = 93,78$ ) as equações se adequaram o modelo quadrático de regressão, em que a maior quantidade de clorofila *a* foi observada na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose com 45,14 e 49,99 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Ainda para a variável conteúdo de clorofila *a* no desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, observou-se diferenças significativas apenas para as concentrações de 0, 5 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 9A), onde para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM (62,22 µg mL<sup>-1</sup>) apresentou maior conteúdo de clorofila *a* em relação aos outros sistemas de cultivo. Para a quantidade de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM (61,10 µg mL<sup>-1</sup>) foi superior apenas aos tratamentos BIT-PF (46,73 µg mL<sup>-1</sup>) e SIP-FV (27,60 µg mL<sup>-1</sup>). Para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (40,93 µg mL<sup>-1</sup>), BIT-PF (38,70 µg mL<sup>-1</sup>) e SIT-FCM (46,66 µg mL<sup>-1</sup>), foram superiores ao tratamento SIP-FV (24,51 µg mL<sup>-1</sup>).

O conteúdo de clorofila *b*, nos tratamentos BIT-RALM ( $R^2 = 98,33$ ) e SIP-FV ( $R^2 = 99,22$ ), apresentou ajuste da regressão no modelo quadrático, onde as concentrações de sacarose apresentaram efeito significativo na quantidade de clorofila *b* dentro dos sistemas de cultivo (Figura 9B). No tratamento BIT-RALM a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou maior quantidade de clorofila *b* (6,82 µg mL<sup>-1</sup>) em relação as demais concentrações de sacarose.

Ainda para o conteúdo clorofila *b*, o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para a concentrações de 0 e 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, onde para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM (6,82 µg mL<sup>-1</sup>) e SIP-FCM (5,75 µg mL<sup>-1</sup>) (Figura 9B) apresentaram maior conteúdo de clorofila *b* em relação aos demais sistemas de cultivo. Para a quantidade de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose o BIT-RALM (6,17 µg mL<sup>-1</sup>), BIT-PF (5,03 µg mL<sup>-1</sup>) e SIP-FCM (5,30 µg mL<sup>-1</sup>) foram superiores ao tratamento SIP-FV (2,95 µg mL<sup>-1</sup>).

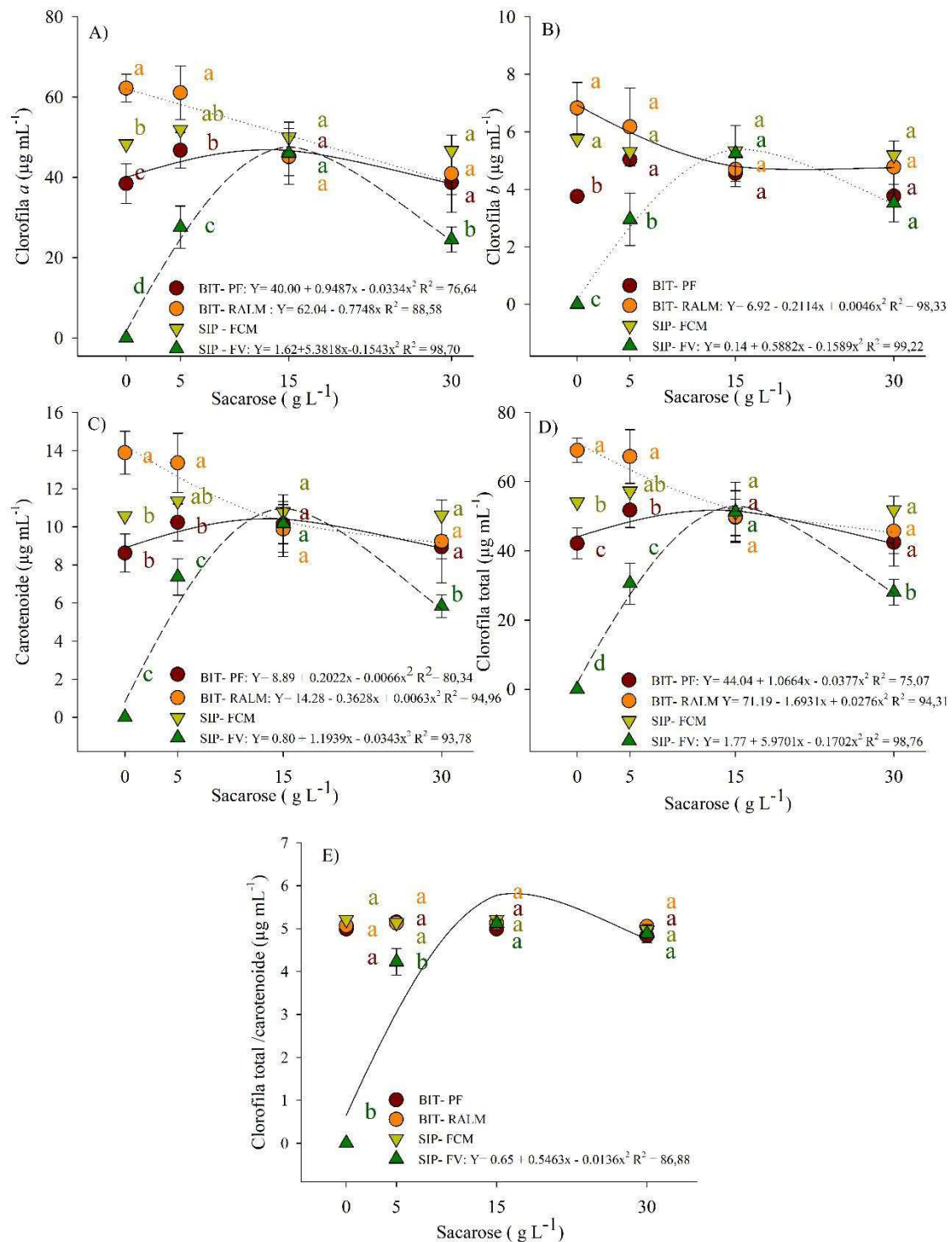
Quanto ao conteúdo de carotenoides e clorofila totais, o tratamento BIT-RALM ajustou-se ao modelo linear e os SIP-FV e BIT-PF ajustaram-se ao modelo quadrático, onde as concentrações de sacarose apresentaram efeito significativo na quantidade de carotenoide e clorofila total dentro dos sistemas de cultivo (Figura 9C e 9D). No tratamento BIT-RALM observou-se o comportamento decrescente, onde a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou maior quantidade de carotenoide (13,88 µg mL<sup>-1</sup>) e clorofila total (69,05 µg mL<sup>-1</sup>). Para o tratamento SIP-FV concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose resultou na ausência de carotenoide e clorofila total, apresentando o comportamento crescente da curva até a quantidade de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose (10,17 e 49,69 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e logo após a curva decresce na quantidade de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (5,83 e 28,03 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

Para as variáveis conteúdo de carotenoides e clorofilas totais, nos sistemas de cultivo e dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para a concentrações de 0, 5 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, onde para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose no tratamento BIT-RALM apresentou maior conteúdo de carotenoide e clorofila total (13,88 e 69,05 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) quando comparado aos demais sistemas de cultivo (Figura 9 C e 9D). Para a quantidade de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM (13,35 e 67,27 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e SIP-FCM (11,35 e 57,21 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) foram estatisticamente superiores quanto ao maior conteúdo de carotenoide e clorofila total em relação aos demais sistemas de cultivo. Para conteúdo de carotenoide e clorofila total na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose o BIT-RALM (9,23 e 45,70 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), BIT-PF (8,93 e 45,70 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e SIP-FCM (10,61 e 51,85 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), foram estatisticamente superiores a SIT-FV (5,83 e 28,03 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

Para a relação clorofila total/carotenoide, a análise de regressão mostrou-se significativa apenas para o tratamento SIP-FV (R<sup>2</sup>= 86,88) (Figura 9E) apresentando o comportamento crescente da curva até a quantidade de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose (5,12 µg mL<sup>-1</sup>) e logo após a curva decresce na quantidade de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (4,88 µg mL<sup>-1</sup>). Ainda para a variável clorofila total/carotenoide o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para a concentrações de 0 e 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, onde os tratamentos BIT-RALM (5,07 e 5,13 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), BIT-PF (4,99 e 5,15 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e SIP-FCM (5,21 e 5,14 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) foram superiores ao SIP-FV (0 e



4,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente) e apresentaram maior valores entre a relação do conteúdo clorofila total/carotenoide (Figura 9E).



**Figura 18.** Conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), carotenoide (C), clorofila total (D), clorofila total e carotenoides (E) de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de

sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose.

O rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ) apresentou diferenças significativas para interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de cultivo (Figura 10A). Para o desdobramento das concentrações de sacarose dentro de cada sistema de cultivo houve diferença nos tratamentos BIT-PF, SIP-FCM e SIP-FV. Para os tratamentos BIT-PF e SIP-FCM as concentrações de 0, 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, foram superiores em comparação a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 10A). Para o SIP-FV as concentrações de 5, 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose foram superiores em comparação a 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose devido a morte das plantas. Para o desdobramento do sistema de cultivo dentro de cada concentração de sacarose, as concentrações de 0 e 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, apresentaram os maiores valores de  $F_v/F_m$  para os tratamentos BIT-RALM (0,795 e 0,798, respectivamente) e SIP-FCM (0,805 e 0,705, respectivamente) quando comparado aos demais sistemas de cultivo. Para a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (0,807), SIP-FCM (0,808) e SIP-FV (0,801) foram estatisticamente iguais, sendo superiores apenas ao tratamento BIT-PF (0,776). Quanto à concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, os tratamentos BIT-RALM (0,8038) e SIP-FCM (0,790) apresentaram maiores valores de  $F_v/F_m$  quando comparado aos outros dois sistemas de cultivo (Figura 10A).

A densidade dos centros de reação ativos por unidade de absorção de fótons (RC/ABS) (Figura 10B) apresentou diferença significativa para interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de cultivo. Os tratamentos BIT-RALM ( $R^2=88,28$ ) e SIP – FV ( $R^2=90,16$ ) ajustaram-se ao modelo quadrático de regressão. Para o tratamento BIT- RALM a curva de regressão demonstrou pouca variação em função das concentrações de sacarose, apresentando seu ponto máximo da curva na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose (2,02). Para o tratamento SIP-FV a curva apresentou comportamento crescente até a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e logo após a curva estabiliza até a quantidade de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (1,59) (Figura 10B).

Ainda para a densidade dos centros de reação ativos por unidade de absorção de fótons (RC/ABS) (Figura 10B) o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das

concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para a concentrações de 0 e 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para a concentração 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, os tratamentos BIT-RALM (1,5668), SIP-FCM (1,5447) foram superiores apenas ao tratamento SIP-FV (0). Na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM (2,0217) foi significativamente superior aos demais sistemas de cultivo. Para a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento BIT-RALM (1,9951) foi superior apenas aos tratamentos BIT-PF (1,5553) e SIP-FV (1,3890).

Para o índice fotossintético (PI), os tratamentos BIT-RALM e SIP-FV ajustaram-se ao modelo quadrático de regressão ( $R^2=98,96$  e  $94,06$ , respectivamente), onde o tratamento BIT-RALM apresentou crescimento da curva até a concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose (4,61), com posterior decréscimo na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (3,81). O tratamento SIP-FV também apresentou o crescimento ascendente até concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (3,55) (Figura 10C).

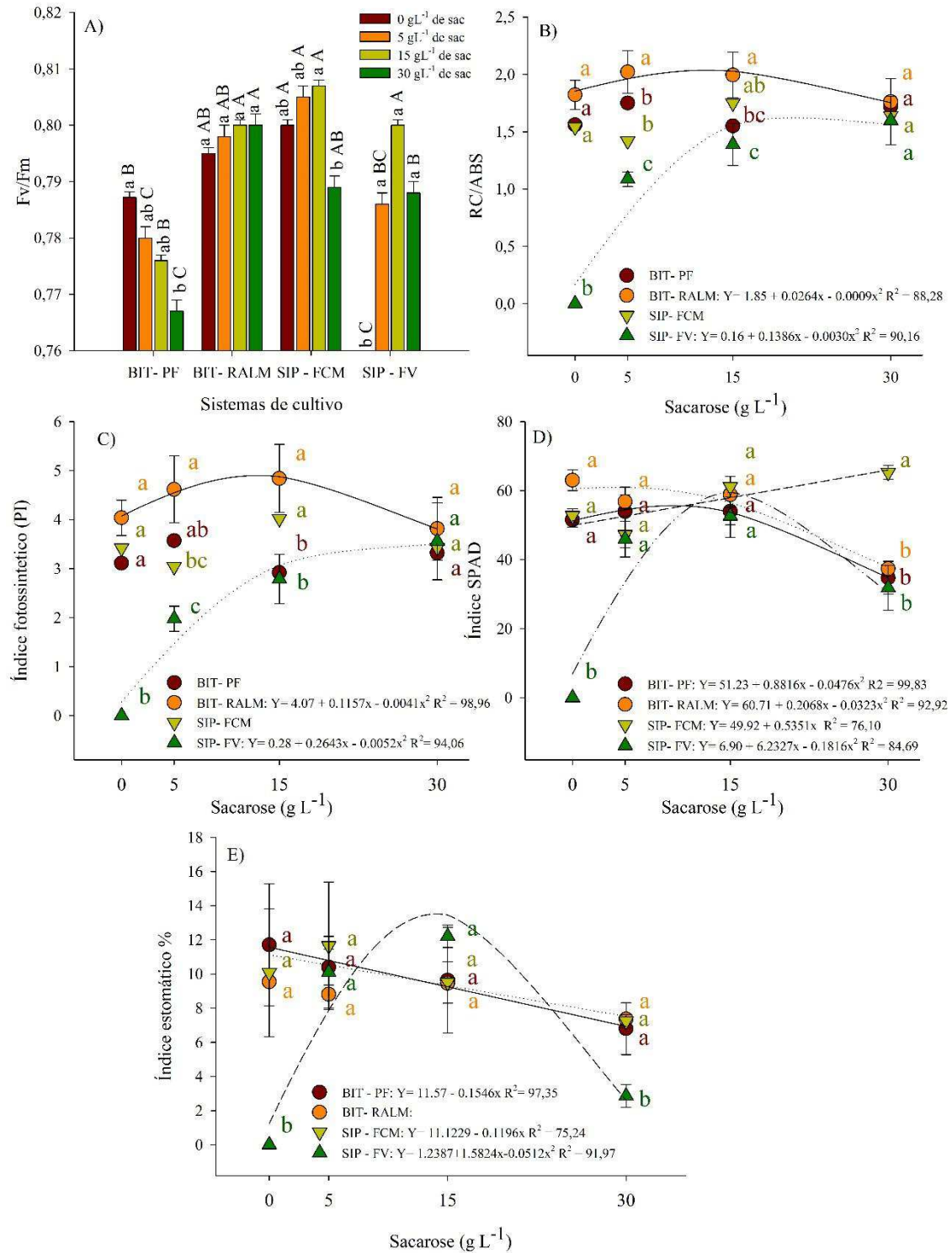
Ainda para a variável índice fotossintético (PI) o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para a concentrações de 0 e 5 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 10C). Para a concentração 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (4,03), BIT-PF (3,11) e SIP-FCM (3,42) apresentaram diferenças significativas quando comparado ao SIP-FV (0). Na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose o BIT-RALM (4,61) foi significativamente superior apenas aos SIP-FCM (3,04) e SIP-FV (1,97). Na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o tratamento BIT-RALM (4,83) e SIP-FCM (4,02) foram superiores aos tratamentos BIT-PF (2,92) e SIP-FV (2,78).

Com relação ao índice SPAD, houve diferença significativa para interação entre os fatores concentrações de sacarose e sistemas de cultivo (Figura 6D). Os tratamentos BIT-RALM ( $R^2 = 92,92$ ), BIT-PF ( $R^2 = 99,83$ ) e SIP-FV ( $R^2 = 76,10$ ) ajustaram-se ao modelo quadrático de regressão, enquanto o tratamento SIP-FV ( $R^2 = 84,69$ ) ajustou-se ao modelo linear. Os tratamentos BIT-RALM e BIT-PF apresentaram o comportamento decrescente da curva de regressão até a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para o tratamento SIP-FV o índice SPAD, apresentou o comportamento crescente da curva até a quantidade de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose com posterior decréscimo na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para o tratamento SIP-FV a variação das concentrações de sacarose resultou no aumento linear do índice SPAD.

Ainda para o índice SPAD o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para as concentrações de 0 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (63), BIT-PF (51,52) e SIP-FCM (52,77) apresentaram maiores valores de índice SPAD. Para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose o tratamento SIP-FCM (65,27) mostrou-se superior aos demais sistemas de cultivo (Figura 10D).

O Índice estomático apresentou diferença significativa para interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de cultivo (Figura 10 E). Os tratamentos BIT-PF ( $R^2 = 93,35$ ) e SIP-FCM ( $R^2 = 75,24$ ) ajustaram-se a modelo linear de regressão, enquanto que o tratamento SIP-FV ( $R^2 = 75,24$ ) ajustou-se a função quadrática. Para os tratamentos BIT-PF e SIP-FCM ocorreu a diminuição do índice estomático em função do aumento da concentração de sacarose. Para o tratamento SIP-FV observou-se o comportamento crescente da curva até a quantidade de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e em seguida diminuiu em função do aumento da concentração de sacarose para 30 g L<sup>-1</sup>.

Ainda para o índice estomático o desdobramento dos sistemas de cultivo dentro das concentrações de sacarose, apresentaram diferenças significativas apenas para as concentrações de 0 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para a concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (9,44%), BIT-PF (11,71%) e SIP-FCM (10,08 %) apresentaram maiores valores de índice estomático. Para a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose os tratamentos BIT-RALM (7,36%), BIT-PF (6,80%) e SIP-FCM (7,24 %) foram superiores ao tratamento SIP-FV (2,86 %) (Figura 10E).

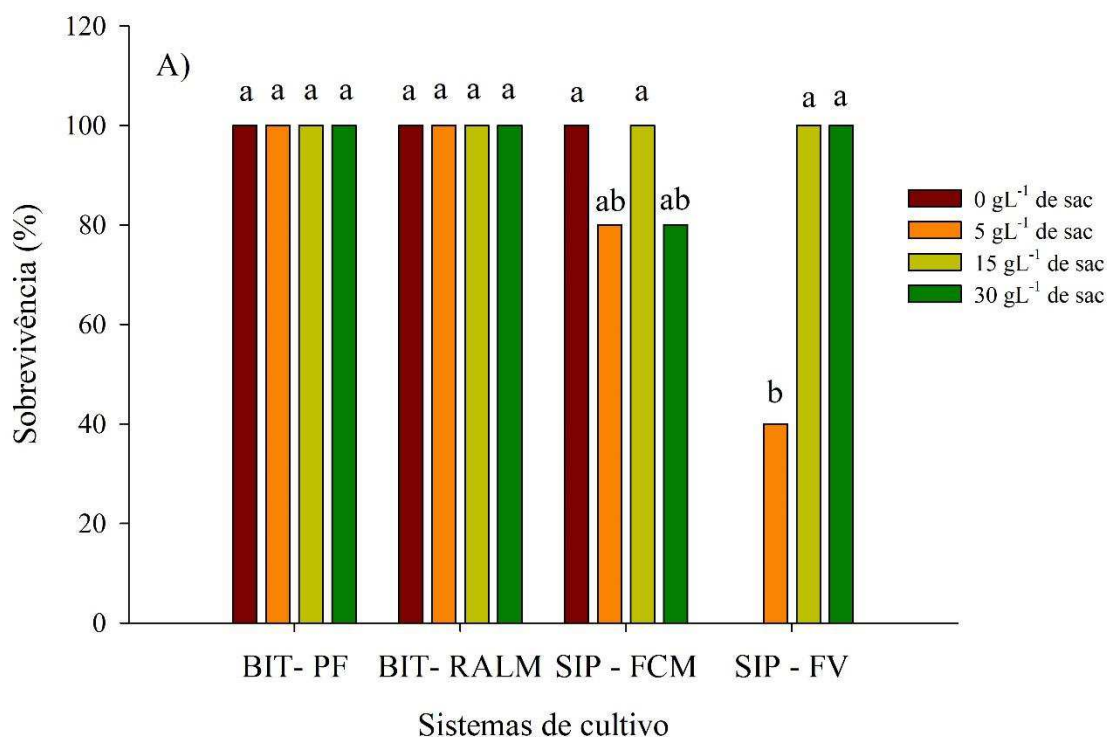


**Figura 19.** Rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ). (A), densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS) (B), Índice fotossintético (PI) (C), Índice SPAD (D) Índice fotossintético % (E), de plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem

estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose.

### 3.3 Aclimação

Para a porcentagem de sobrevivência das plantas nas condições *ex vitro*, houve diferença significativa entre o sistema de cultivo e a concentração de sacarose. Os tratamentos BIT-RALM e BIT-PF em todas as concentrações de sacarose, apresentaram 100% de sobrevivência das plantas. O tratamento SIP-FV com 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose diferiu significativamente dos demais tratamentos com apenas 40% de sobrevivência das plantas, exceto quando comparado ao tratamento SIP-FCM nas concentrações de 5 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose que apresentaram uma taxa de 80% de sobrevivência das plantas (Figura 11).



**Figura 20.** Porcentagem de sobrevivência das plantas de *Ananas comosus* cv. Turiaçu, aos 30 dias de cultivo *ex vitro*, provenientes de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* e concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD, a 5% de probabilidade dentro de cada concentração de sacarose.

#### 4. Discussão

Em relação às concentrações de sacarose do meio e dos diferentes sistemas cultivo *in vitro*, as plantas de *Ananas comosus* cv. Turiacu tiveram diferentes respostas. Estas respostas foram relacionadas ao crescimento e a capacidade fotossintética. Os resultados mostraram que esta cultivar possui potencial para cultivo fotoautotrófico, visto que, na ausência de sacarose, o crescimento das plantas somente foi possível nos tratamentos que permitiam a troca de gases entre o ambiente externo e o interior do frasco de cultivo.

As variáveis de crescimento como comprimento de planta, número de folhas e a área foliar são características importantes das plantas na condição *in vitro*. Nos sistemas de biorreatores de imersão temporária (BIT- RALM e BIT-PF), quando comparados ao sistema de imersão permanente e frasco de cultivo com tampas vedadas (SIP-FV), foi observado o aumento nos valores dessas variáveis. O uso de biorreatores de imersão temporária elevou o crescimento das plantas, devido aos fluxos periódicos de ar no interior dos frascos, uma vez que este movimento de ar renova a atmosfera interna do sistema o que pode resultar no aumento da produção de biomassa (NASRI et al., 2019). Os resultados obtidos estão em linha com Saldanha et al. (2012), mostrando que as trocas gasosas nos frascos de cultivo aumentam a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> e a alocação de fotoassimilados que é direcionada para a parte aérea das plantas crescidas *in vitro*. Em contrapartida no SIP-FV 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, devido à vedação dos frascos, as taxas de transpiração e de fotossíntese são baixas, o que ocasiona a redução acentuada do crescimento das plantas. Além disso, em frascos vedados, a alta umidade relativa dentro do frasco de cultivo reduz a transpiração e a ausência de trocas gasosas impede a entrada de CO<sub>2</sub> o que limita esse gás nos sítios de carboxilação da Rubisco (KOZAI, 1991, KOZAI et al, 1997, KOZAI, 2010).

Para as variáveis comprimento da maior raiz e volume de raiz, quanto maior a quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultura, independentemente do sistema de cultivo, maior comprimento e o volume das raízes, o que demonstra que a sacarose é crucial para o processo de rizogênese. Em contrapartida, no tratamento BIT-RALM e na concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose (sistema fotoautotrófico), quando comparado aos tratamentos SIP-FCM e SIP-FV, as plantas tiveram maior volume de raiz. Os níveis crescentes de sacarose resultaram no aumento da biomassa *in vitro* do abacaxizeiro. Este

fato demonstra que, independentemente do sistema de cultivo, a disponibilidade de sacarose no meio de cultura supriu as necessidades metabólicas das plantas. Assim, verifica-se que o aumento da biomassa vegetal no cultivo *in vitro* está relacionado tanto à incorporação de sacarose no meio de cultura quanto na otimização das trocas gasosas (XIAO et al., 2011). De acordo com Wolf et al. (1998), em plantas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro*, quando esta espécie foi cultivada em 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura, a assimilação de carbono heterotrófico foi cerca de 50% do carbono do tecido.

No presente estudo, e em todos os sistemas de cultivo, o aumento das concentrações de sacarose reduziu a assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> das plantas de *A. comosus*. Este fato sugere a presença de retrocontrole (feed-back) negativo da concentração de sacarose no meio de cultivo sobre a sua produção através do metabolismo de assimilação fotossintética (COUTO et al., 2014). Adicionalmente, a maior disponibilidade de sacarose no meio de cultura pode ter promovido a inibição e/ou produção de enzimas-chave da fotossíntese, contribuindo para a formação de um aparato fotossintético disfuncional ou inibido por saturação (HAZARIKA, 2006; MCCARTHY et al., 2016).

Na condição de imersão permanente e frasco de cultivo com tampa vedada (SIP-FV) e com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a planta inicial não manteve o seu crescimento. Em relação a mortalidade da planta (figura 6A), esta mortalidade pode ser explicada pelas condições limitadas das trocas gasosas, o que dificulta a saída do etileno, concentrando-o nas células e induzindo a senescência foliar (AYUB et al., 2019). Além disso, o sistema propagação convencional em que se tem ausência de trocas gasosas, neste ambiente a assimilação fica muito limitada pela concentração muito reduzida de CO<sub>2</sub> em presença da RFA. A ausência da sacarose pode ser o fator principal que impossibilitou o crescimento das plantas nessas condições (DEC CETI 2004; AYUB et al., 2019).

Em contrapartida, nos sistemas que permitem as trocas gasosas como os BIT-RALM, BIT-PF e SIP-FCM, as plantas com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose mantiveram o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*, e isso demonstra que nestes recipientes as plantas de abacaxi apresentam potencial fotoautotrófico. Nos biorreatores de imersão temporária, os explantes ficam em contato com o meio de cultivo durante curtos períodos, suficientes para as plantas absorverem a água, os nutrientes e os reguladores



de crescimento vegetal (GEORGIEV et al., 2014). Além disso, a aeração forçada dentro do sistema proporciona aos explantes um ambiente com elevadas trocas gasosas, resultando em melhores condições de crescimento e desenvolvimento da parte aérea, além de desenvolver o aparato fotossintético das plantas (PEREIRA - LIMA et al., 2012).

Os maiores teores de pigmentos fotossintéticos do abacaxizeiro ocorreram nos sistemas com a presença das trocas gasosas, e a maior concentração de pigmentos fotossintéticos foi verificado para o tratamento BIT-RALM. Isso sugere, que os sistemas que possibilitam as trocas gasosas e favorecem uma adequada concentração de CO<sub>2</sub> no interior do sistema de cultivo, estimulam a fotoautotrofia das plantas e consequentemente, resulta na maior concentração de pigmentos fotossintéticos (KOZAI E KUBOTA 2001; MOHAMED e ALSADON, 2010). Além disso, menores concentrações de etileno no interior dos sistemas cultivo que permitem as trocas gasosas, pode igualmente estar relacionado a maior biossíntese de pigmentos nesses sistemas (KOZAI, 2010). De fato, diversos autores associam a maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> dentro do sistema de cultivo com o aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos, como observado em *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2012; 2013), *Lippia alba* (Batista et al., 2017) e *Prunus cerasifera* (NASRI, et al., 2019).

Na condição de imersão permanente e frasco de cultivo tampa vedada (SIP-FV) com 0 e 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, as plantas tiveram menores concentrações de pigmentos fotossintéticos, isso sugere que as plantas nesse sistema estão sob intensa condições de estresse, o que pode apresentar o crescimento comprometido por meio da redução tanto da sacarose quanto das trocas gasosas. Em algumas situações de estresse, as clorofilas totais são destruídas com maior intensidade que os carotenoides (HENDRY et al., 1987). Assim, a razão entre a concentração de clorofila total e a de carotenoides pode ser usada como uma variável sensível na avaliação de danos nas folhas das plantas (FREIRE, 2009). Os valores reduzidos de clorofila podem ser associados ao funcionamento anormal do complexo antena, pois estes pigmentos fotossintéticos são responsáveis pela energia interceptada e capturada pelo complexo antena, bem como pelos centros de reação, e assim a energia é direcionada para processo fotoquímico (MAXWELL e JOHNSON, 2000; SCHREIBER et al., 2002).

O valor do Índice SPAD avalia a intensidade da cor verde nas folhas, e é relacionado com a concentração de colorofila total nas folhas (SILVA et al., 2011). Nos sistemas que permitem as trocas gasosas, e quando comparado ao sistema de imersão

permanente e frasco de cultivo com tampas vedadas (SIP-FV), e  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, estes tiveram maiores valores do índice SPAD. A otimização da entrada de  $\text{CO}_2$  no interior dos sistemas de cultivo estimula o aumento das taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, aumenta a intensidade de verde nas folhas (WALTER, 2019).

Para a avaliação do rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), existe uma faixa adequada de eficiência que varia de 0,75 a 0,85, na qual os valores dentro desta faixa mostram que o aparato fotoquímico associado ao PSII está com uma atividade adequada. Essa variável associada a emissão da fluorescência da clorofila pode ser usada como um indicador de estresse das plantas, estresse este que pode afetar diretamente a atividade do fotossistema II (DIAS e MARENCO, 2007). Outra forma de avaliar a atividade dos FS I e II, é por meio do índice fotossintético (PI), que fornece uma informação quantitativa sobre o estado atual da atividade fotoquímica da planta sobre condições de estresse (YANG et al., 1996; STRASSER et al. 2000). Além disso, esse índice integra três componentes independentes que lhe conferem maior precisão para avaliar danos no FS II, que são: a densidade dos centros de reação ativos (RCs), a eficiência no transporte de elétrons após  $Q_a$  ter sido reduzida e a probabilidade de que um fóton absorvido seja capaz de reduzir  $Q_a$  (STRASSER et al., 2000). Desta forma, a variável PI é capaz de identificar precocemente danos no aparato fotossintético das plantas por ser uma variável mais precisa que o componente  $F_v/F_m$  (RIPLEY et al. 2004).

A medição da fluorescência da clorofila *a* é uma ferramenta útil, não invasiva e rápida para examinar a eficiência fotossintética das plantas, pois alterações na fluorescência do FSII tem sido correlacionada com as mudanças na assimilação de  $\text{CO}_2$  (BAKER, 2008). A eficiência fotquímica potencial/máxima, avaliada em folhas adaptadas à escuridão ( $F_v/F_m$ ) ou real, em folhas expostas á luz ( $F_v'/F_m'$ ), do FSII pode assim ser usada para caracterizar o funcionamento do aparelho fotossintético (ROHÁČEK, 2002; BAKER, 2008).

Neste trabalho com abacaxizeiro Turiaçu, as respostas foram semelhantes entre as variáveis  $F_v/F_m$ , PI e RC/ABS. Em todos os sistemas de cultivo as plantas não apresentaram danos ao FSII com valores de  $F_v/F_m$  e PI superiores a 0,75 e 0,5, respectivamente. Exceto, na condição de imersão permanente e frasco de cultivo com tampas vedadas (SIP-FV) com  $0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (sistema fotoautotrófico), onde as plantas tiveram danos ao seu aparato fotossintético. De acordo com Couto et al. (2014)

os valores acima de 0,75 de  $F_v/F_m$  e 0,5 de PI demonstram alta eficiência na maquinaria fotoquímica em plantas de *A. comosus*.

O aumento da concentração de sacarose diminuiu o índice estomático da folha, e os tratamentos em que se otimizou as trocas gasosas, e na ausência de sacarose (sistema fotoautotrófico), tiveram um maior índice estomático. Vahdati et al. (2017) relataram que o aumento na concentração de  $CO_2$  no interior dos frascos de cultivo contribui para a formação de estômatos menores, com menor tamanho de poro, foram funcionais e com um melhor controle da perda de água.

A porcentagem de sobrevivência das plantas no ambiente *ex vitro*, mostrou que que as condições otimizadas pelos sistemas de cultivo *in vitro*, que permitiram as trocas gasosas, aumentaram as taxas de sobrevivência das plantas nas condições ambientais da casa de vegetação. De acordo com Vahdati et al. (2017) o aumento da concentração  $CO_2$  no headspace do frasco de cultivo altera o funcionamento estomático e melhorou a aclimação *ex vitro* de plantas de *Juglans regia*. Além disso, as plantas cultivadas em sistemas que permitem trocas gasosas melhora a função estomática por meio do aumento da concentração de  $K^+$  nas células-guarda e do aumento do teor de ABA livre nas folhas (MAJADA et al., 1997; VAHDATI et al., 2017).

Em contrapartida, o tratamento SIP-FV na concentração de  $5\text{ g L}^{-1}$  de sacarose teve uma baixa taxa de sobrevivência (40%). No entanto, nas concentrações de 15 e  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose, todas as plantas sobreviveram. A resposta heterotrófica e a ausência das trocas gasosas durante o crescimento *in vitro* geralmente promovem uma menor espessura de cutícula, reduzida funcionalidade estomática e heterogeneidade no tamanho do estômato (ALINIAEIFARD et al., 2020), bem como a taxa de transpiração no início da aclimação de plantas *in vitro* é comumente muito alta (CHAARI-RKHIS et al., 2011; HAZARIKA, 2006). Ainda, de acordo com ZHANG et al. (2009), estas plantas cultivadas no sistema tradicional de cultivo podem ser fotossinteticamente inativas, e com estômatos pouco funcionais. O reduzido teor ABA foliar tem sido sugerido como causa do insuficiente funcionamento estomático, e alta perda de água em plantas (ARVE et al., 2013; FANOUREAKIS et al., 2011). Isso se deve à capacidade limitada da planta de produzir ABA, devido à baixa taxa de transpiração evaporativa (ou seja, frascos vedados) (ALINIAEIFARD e VAN MEETEREN, 2014). No entanto, se as

condições ambientais forem adequadas e a função estomática inicial for melhorada, a sobrevivência e o crescimento durante o período de aclimação podem ser melhoradas (VAHDATI et al., 2017).

## **5. Conclusões**

Nosso estudo demonstrou que abacaxizeiro cv. Turiaçu possui potencial fotoautotrófico, devido ao adequado crescimento das plantas na ausência de sacarose e com a utilização dos sistemas que possibilitam as trocas gasosas.

Os sistemas de cultivo em biorreatores de imersão BIT-RALM e BIT-PF possibilitaram a maior taxa de sobrevivência das plantas nas condições *ex vitro*, evidenciando que a entrada ativa de CO<sub>2</sub> no sistema possibilita maior rusticidade ainda *in vitro* das plantas de abacaxi.

## Referências

- ALINIAEIFARD, S.; ASAYESH, Z. M.; DRIVER, J.; VAHDATI, K. Stomatal features and desiccation responses of Persian walnut leaf as caused by *in vitro* stimuli aimed at stomatal closure. **Trees**, 34, n. 5, p. 1219-1232, 2020.
- ALINIAEIFARD, S. & VAN MEETEREN, U. Natural variation in stomatal response to closing stimuli among *Arabidopsis thaliana* accessions after exposure to low VPD as a tool to recognise the mechanism of disturbed stomatal functioning. **Journal of Experimental Botany**. v. 65, p. 6529-6542, 2014.
- ARVE, L.E.; TERFA, M.T.; GISLEORD, H.R.; OLSEN, J.E. & TORRE, S. High relative air humidity and continuous light reduce stomata functionality by affecting the ABA regulation in rose leaves. **Plant, Cell & Environment**. v. 36, p. 382-392, 2013.
- AYUB, R. A.; SANTOS, J. V.; JUNIOR, L. A. Z.; SILVA, D. M.; CARVALHO, T. C.; GRIMALDI, F. et al. Concentração de sacarose e volume do meio líquido no crescimento e desenvolvimento in vitro de amoreira-preta cv. Tupy em sistemas de imersão temporária. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. 1-8 2019.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BASSO, S. M. S. Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. E *Lotus* L. 1999. 268 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- BATISTA, D.S.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; SALDANHA, C.W.; OTONI, W.C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017.
- CHAARI-RKHIS, A., M. MAALEJ, N. DRIRA, AND A. STANDARDI. 2011. Micropropagation of olive tree (*Olea europaea* L.) cv. 'Oueslati'. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. v. 35, p. 403-412, 2011.
- COUTO, T. R.; SILVA, J. R.; MORAES, C. R. D. O.; RIBEIRO, M. S.; NETTO, A. T.; CARVALHO, V. S.; CAMPOSTRINI, E. Photosynthetic metabolism and growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) cultivated *ex vitro*. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, n. 3, p. 333-339, 2016.
- COUTO, T. R.; SILVA, J. R.; TORRES NETTO, A.; CARVALHO, V. S.; CAMPOSTRINI, E. Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados in vitro em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 459-466. 2014.
- CUTTER, E. G. Plant anatomy: cells and tissues. Part I. London: William Clowes and Sons. p. 315. 1978.
- DECCETTI, S.F.C. (2004) Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 93f, 2004.

- DIAS, D.P.; MARENCO, R.A. Fotossíntese e fotoinibição em mogno e acariquara in função da Luminosidade e Temperatura foliar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 305-311, 2007.
- FANOURLAKIS, D., CARVALHO, S.M., ALMEIDA, D.P. & HEUVELINK, E. Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal functioning. **Physiologia Plantarum**. v. 142, p. 274-286, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FREIRE, S.C.V. Fluorescência da clorofila a em diferentes fases do desenvolvimento e qualidade dos frutos de três genótipos do maracujazeiro cultivados no norte do estado do Espírito Santo. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Espírito Santo, 88f. 2009.
- GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; & BLEY, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in life sciences**, v. 14, n. (6), p. 607-621, 2014. .
- GONCALVES, J. F. C.; SILVA, C. E.; GUIMARAES, D. G.; BERNARDES, R. S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 89-98, 2010.
- HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.
- HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae** v.108, p. 105-120, 2006.
- KOZAI, T., KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, p. 525-537, 2001.
- MAJADA, J.P.; M.A. FAL AND R. SANCHEZ-TAMES. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 33, p. 62-69, 1997.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 51, p. :659-668, 2000.
- MCCARTHY, A.; CHUNG, M.; IVANOV, A.G.; KROL, M.; INMAN, M.; MAXWELL, D.P.; HÜNER, N.P. An established *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta cell suspension culture accumulates chlorophyll and exhibits a stay-green phenotype in response to high external sucrose concentrations. **Journal of Plant Physiology**, v. 199, p. 40-51, 2016.
- MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**. v. 123, p.295-300, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15. p. 473-47. 1962.
- NASRI, A.; BAKLOUTI, E.; BEN ROMDHANE, A.; MAALEJ, M.; SCHUMACHER, H. M.; DRIRA, N.; FKI, L. Large-scale propagation of Myrobolan (*Prunus cerasifera*)

in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 144-153, 2019./02/09/ 2019.

PEREIRA LIMA, G. P.; SILVA CAMPOS, R. A. DA.; GOMES, L.; J.R., T., & VIANELLO, F. Polyamines, gelling agents in tissue culture, micropropagation of medicinal plants and bioreactors. **Recent Advances in Plant in Vitro Culture**. 2012.

RIPLEY, B.S.; REDFERN, S.P.; DAMES, J. Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll fluorescence kinetics. **South African Journal of Science**, v. 100. P. 615-618. 2004.

ROHÁČEK, Karel. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v. 40, n. 1, p. 13-29, 2002.

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

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

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

SCHREIBER, U.; MULLER, J. F.; HAUGGL, A., GADERMANN, R. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. **Photosynthesis Research**, v. 74, p. :317—330, 2002. .

SILVA, MARCELO CLEÓN DE CASTRO ET AL. Índice SPAD em função de diferentes horários e posições no folíolo da batata sob fertilização nitrogenada. **Revista Ciência Agronômica**. 2011, v. 42, n. 4, p. 971-977, 2011.

VAHDATI, K.; ASAYESH, Z. M.; ALINIAEIFARD, S.; & LESLIE, C. Improvement of Ex Vitro Desiccation through Elevation of CO<sub>2</sub> Concentration in the Atmosphere of Culture Vessels during In Vitro Growth . **HortScience**, v. 52, n. 7, p. 1006 1012, 2017.

WALTER, RAFAEL. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento de *Capsicum annuum* : superação de barreiras pós-zigóticas, produção de genótipos em larga escala e protocolo para obtenção de haploides /. Tese (doutorado) - Campos dos Goytacazes, RJ, 164 f, 2019.

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

WOLF, S.; KALMAN-ROTEM, N.; YAKIR, D.; & ZRV, M. Autotrophic and heterotrophic carbon assimilation of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* L) plants. **Journal of Plant Physiology** v. 153, n. 5, p. 574-580, 1998.

YANG, F., MOSS, L. & PHILLIPS, G. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**. v. 14, p. 1246—1251, (1996).

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



## Capítulo IV

---

### Considerações finais

## 1. Considerações finais

O abacaxi cv. Turiçu apresenta grande potencial para ser propagado por técnicas da micropropagação, e o protocolo inédito proposto neste estudo demonstrouse eficiente na desinfestação e estabelecimento *in vitro* bem como pode servir de base para futuros estudos da biotecnologia da espécie. Além disso, foi relatado pela primeira vez que a utilização dos biorreatores de imersão temporária é uma alternativa para a micropropagação comercial do abacaxizeiro cv. Turiçu.

O explante de ápice caulinar de abacaxi cv. Turiçu inoculado em meio MS + 2  $\mu$ M ANA + 8  $\mu$ M BAP apresenta melhores respostas ao estabelecimento *in vitro*.

Os resultados demonstram que o abacaxi Turiçu utilizando o biorreator de imersão temporária Platform (BIT-PF) com adição do meio de cultura MS + 2  $\mu$ M ANA + 12  $\mu$ M BAP apresenta melhores respostas quanto as taxas de multiplicação, com grande potencial para a produção de plantas em larga escala.

Nosso estudo demonstrou que abacaxizeiro cv. Turiçu possui potencial fotoautotrófico, visto o bom desenvolvimento das plantas na ausência de sacarose e com a utilização dos sistemas que possibilitam as trocas gasosas.

O BIT-RALM e BIT-PF possibilitaram o maior desenvolvimento e rusticidade para as plantas de abacaxi nas condições *ex vitro*. Além disso, a diminuição da sacarose do meio de cultivo aumentou a eficiência fotoquímica das plantas.

O sistema de avaliação das trocas gasosas portátil pode fornecer uma medida, confiável, imediata e não destrutiva da assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> das plantas nas condições *in vitro*.



*Emitido em 01/02/2024*

**DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 341/2024 - DPARQ (11.14.68.07.05)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 01/02/2024 17:37)*

CRISTIANE DE JESUS PEREIRA GASPAR

SECRETARIO III

866500

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sis.sig.uema.br/documentos/> informando seu número:  
**341**, ano: **2024**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **01/02/2024** e o código de  
verificação: **6aa7df3c86**

