

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE MUDAS DE  
ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA (*Ananas comosus* L.)

**CLARISSA RIBEIRO BAPTISTA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO – 2022

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE MUDAS DE  
ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA (*Ananas comosus* L.)

**CLARISSA RIBEIRO BAPTISTA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> D. Sc. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Maio – 2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

null.

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO IN VITRO DE MUDAS DE ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA (Ananas comosus L.) / Clarissa Ribeiro Baptista. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

65 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.  
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Fotoautotrófico. 2. In vitro. 3. Mixotrófico. 4. Multiplicação. 5. Ananas spp. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

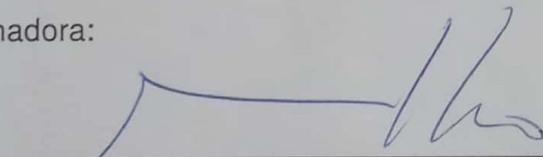
OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO *IN VITRO* DE MUDAS DE  
ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA (*Ananas comosus* L.)

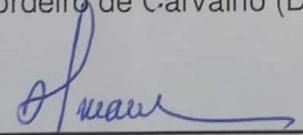
**CLARISSA RIBEIRO BAPTISTA**

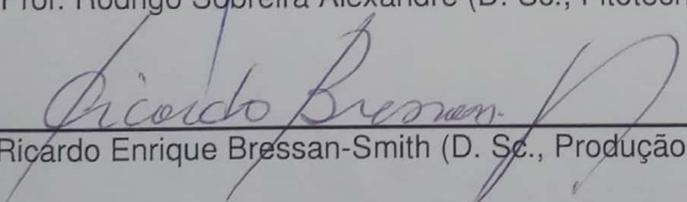
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

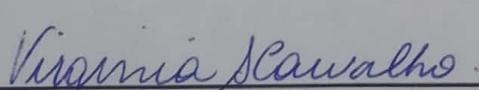
Aprovada em 31 de maio de 2022

Comissão Examinadora:

  
Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF

  
Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D. Sc., Fitotecnia) – UFES

  
Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF

  
Profª Virginia Silva Carvalho (D. Sc., Fitotecnia) – UENF  
(Orientadora)

A todos que participaram dessa caminhada comigo,  
*“Isso é o que estávamos procurando desde o dia em que nos conhecemos.  
Tempo. Isso é o que o paraíso realmente é – não é nem mesmo um lugar, na  
verdade. É apenas ter tempo suficiente com as pessoas que você ama.” – The  
Good Place*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me protegeu e colocou pessoas que me deram forças durante todo o caminho permitindo que eu conseguisse concluir esta etapa da minha vida;

A minha família. Meus pais Eliane e Maurício e meus irmãos Daniel e Deborah, por todo apoio e incentivo;

À Adrielle da Silva Tostes, por todo amor, parceria, paciência e compreensão. Por sempre estar presente, me incentivando e me fazendo sorrir mesmo nos períodos mais difíceis;

A meu amigo Pedro Marciano Ferreira Junior, pela amizade de tantos anos e que mesmo à distância, esteve a meu lado me apoiando e alegrando meus dias;

A meus amigos e colegas Laís, Luciana, Pedro Henrique, Ludimila, Willians, Leticia e Matheus, por sua amizade e momentos de descontração.

A minha orientadora e professora, Virginia Silva Carvalho, pela orientação, incentivo, amizade, apoio e confiança;

A Vinicius, Otalício, Lidiane, Fabrícia, Pedro, Larissa, Gabriel, Isis e Raquel meus companheiros e colegas de laboratório, por sua ajuda, e momentos de descontração durante todos esses anos. Em especial ao Renato, Roberta e Kissila, pela parceria de longa data e apoio que permitiram que eu conseguisse concluir meu trabalho;

A Delphim e Bruna, que durante seu período de estágio ajudaram na condução dos trabalhos;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela estrutura e oportunidade de realizar o curso de mestrado;

Ao professor Rodrigo Sobreira Alexandre, pela disponibilidade de participação da banca;

Ao professor Almy Junior Cordeiro de Carvalho, pela disponibilidade de participação da banca;

Ao professor Ricardo Enrique Bressan-Smith, pela disponibilidade de participação da banca;

Aos professores do curso pelos ensinamentos durante os dois anos de curso;

Ao professor Eliemar Campostrini e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, pela ajuda nas análises fisiológicas;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa nos dois anos de mestrado;

Por fim, a todos que, de forma direta ou indireta, me ajudaram na realização e conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Aspectos econômicos.....	3
2.2. Origem e morfologia da planta.....	4
2.3. Tipos de mudas .....	6
2.4. A cultivar Pérola.....	6
2.5. Cultura de tecidos vegetais.....	7
2.6. Micropropagação do abacaxizeiro.....	8
2.7. Membranas na micropropagação .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Material vegetal .....	12
3.2. Condução do experimento.....	12
3.2.1. Fase 1: Multiplicação .....	12
3.2.2. Fase 2: Enraizamento.....	13
3.2.3. Fase 3: Aclimatização das mudas.....	14
3.3. Avaliações .....	14
3.3.1. Determinação do índice de verde.....	14
3.3.2. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) e Índice Fotossintético ( <i>Photosynthetic Index</i> - PI).....	14
3.3.3. Determinação da altura da planta.....	15
3.3.4. Determinação do volume de raízes.....	15
3.3.5. Determinação da massa da matéria fresca.....	15
3.3.6. Determinação da massa da matéria seca .....	15
3.3.7. Escala de cores .....	15
3.4. Análises estatísticas .....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1. Fase 1: Multiplicação .....	17
4.2. Fase 2: Enraizamento.....	24
4.3. Fase 3: Aclimatização das mudas.....	31
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## RESUMO

BAPTISTA, Clarissa Ribeiro; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; maio, 2022; Cultivo *in vitro* de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em dois ambientes e tipos de vedações; Orientadora: D. Sc. Virginia Silva Carvalho.

O abacaxizeiro é uma planta perene de grande importância comercial e alimentar nos países de clima tropical e subtropical. A cultura de tecidos vegetais possui a capacidade de gerar mudas padronizadas e saudáveis, porém o ambiente controlado pode levar a alterações na anatomia e no metabolismo das plantas responsáveis por aumentar a mortalidade na fase de aclimatização das mudas. Objetivou-se com este trabalho otimizar a produção de mudas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), cv. Pérola *in vitro* por meio de alterações no ambiente de cultivo, concentração de sacarose e trocas gasosas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2x2 para as fases de multiplicação e enraizamento e em delineamento em blocos ao acaso para a fase de aclimatização. Foram testados dois tipos de vedação (tampas de polipropileno com membrana e sem membrana), em dois ambientes diferentes (sala de cultivo e casa de vegetação), em três diferentes concentrações de sacarose (0, 20, 40 g L<sup>-1</sup>). Foram avaliados: altura das plantas (cm); número de folhas; fluorescência da clorofila *a*; índice de verde; massa da matéria fresca total (g); massa da matéria seca da parte aérea (g), da raiz (g) e total (g) e volume radicular (m<sup>3</sup>). As brotações apresentaram, durante a fase de multiplicação, a necessidade de suplementação de sacarose no meio de cultura, uma vez que as brotações sem fonte exógena de

carbono apresentaram as menores médias para as variáveis avaliadas. O tipo de vedação e ambiente de cultivo não apresentaram diferença nesta fase para as diferentes variáveis avaliadas. Para a fase de enraizamento também foi evidenciado a necessidade do uso de uma fonte de carbono no meio de cultura. Notou-se também que o uso de tampas de polipropileno sem membrana associadas ao cultivo em casa de vegetação, foi capaz de gerar plantas de maior altura e número de folhas. Na fase de aclimatização, foi visto que as plantas não foram eficientes sob cultivo fotoautotrófico, porém apresentaram maior desenvolvimento e resposta fotossintética quando cultivadas sob cultivo fotomixotrófico. O tipo de vedação (com ou sem membrana) não apresentou diferença para o crescimento ou resposta fotossintética. Plantas cultivadas em casa de vegetação obtiveram maior eficiência fotoquímica, assim como maior acúmulo de biomassa, número de folhas, altura das plantas e acúmulo de biomassa para a parte aérea e radicular.

## ABSTRACT

BAPTISTA, Clarissa Ribeiro; M. Sc.; North Fluminense State University Darcy Ribeiro; may, 2020; *In vitro* cultivation of pineapple seedlings cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) in two growing environments and types of fences; Advisor: D. Sc. Virginia Silva Carvalho.

Pineapple is a perennial plant of great commercial and food importance in tropical and subtropical countries. The plant tissue culture has the ability to generate standardized and healthy seedlings, but the controlled environment can lead to changes in the anatomy and metabolism of plants which are responsible for increasing mortality in the acclimatization phase of seedlings. The objective of this work was to optimize the production of pineapple seedlings cv. Pérola *in vitro* through changes in the culture environment, sucrose concentration and gas exchange. The experiment was conducted in a completely randomized design in a 3x2x2 factorial scheme for the multiplication and rooting phases and in a randomized block design for the acclimatization phase. Two types of sealing were tested (polypropylene covers with membrane and without membrane), in two different environments (culture room and greenhouse), at three different sucrose concentrations (0, 20, 40 g L<sup>-1</sup>). The following were evaluated: plant height (cm), number of leaves, chlorophyll a fluorescence, green index, total fresh matter mass (g), shoot dry matter mass (g), root (g) and total (g) and root volume (mL). The pineapple plants cv. Pérola (*Ananas comosus* L.), during the multiplication phase, the need for sucrose supplementation in the culture medium was presented since plants with no sucrose in medium showed lower stats when compared to the ones with 20 and 40 gL<sup>-1</sup>. The type of sealing system and environment do not differ in this phase for number of leaves, number of buds and explant height. For the rooting phase, the need to use a carbon source in the culture medium was also evidenced. It was also noted that the use of polypropylene membrane associated with the cultivation at the greenhouse, was responsible for larger plants and greater number of leaves. In the acclimatization phase, it was seen that pineapple plants cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) were not efficient under photoautotrophic system, however,

they showed greater development and photosetic response when cultivated under photomyxotrophic system. The type of seal (with or without membrane) did not differentiate for growth or photosynthesis. Plants grown in greenhouse showed greater photochemical efficiency, as well as, greater number of leaves, plant height and biomass accumulation for the shoot and root.

## 1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro é uma planta nativa da América do Sul sendo vista primeiramente pelos europeus quando Colombo desembarcou na ilha, batizada por ele, de Guadalupe em 1493. Devido a sua adaptabilidade a diferentes climas e solos, o abacaxizeiro foi difundido por todo o globo terrestre sendo produzido em grande parte dos países de clima tropical e subtropical (Crestoni, 2010; FAO, 2022).

Entre os três maiores produtores mundiais, no ano de 2020, o Brasil foi responsável por produzir 2,5 milhões de toneladas de abacaxi, ficando em terceiro lugar no ranking e perdendo apenas para Filipinas em primeiro com 2,7 milhões de toneladas produzidas e Costa Rica em segundo com produção total de 2,6 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2022).

As cultivares Smooth Cayenne e Pérola são conhecidas por serem as mais produzidas no mundo (Sampaio et al., 2011). Essas, no entanto possuem alta suscetibilidade a doenças como a fusariose (*Fusarium guttiforme*) (Reinhardt et al., 2018). A fusariose é responsável por perdas de 40% do rendimento e 20% dos frutos (Ventura, 2009).

A propagação do abacaxizeiro ocorre majoritariamente de forma assexuada devido a autoincompatibilidade de algumas cultivares sendo a propagação sexuada feita em casos de melhoramento genético (Cabral et al., 1993; Bartholomew, 2014; Souza et al., 2017).

A propagação vegetativa do abacaxizeiro produz, no entanto, em sua forma convencional, mudas de crescimento desuniforme e podendo possuir problemas de

caráter fitossanitário os quais prejudicam a produção e manutenção do plantio. A ocorrência de doenças e pragas pode ser vista em grande parte nos países produtores da fruta (Reinhardt et al., 2018).

A propagação *in vitro* tem a capacidade de produzir mudas saudáveis, de crescimento uniforme e em maior quantidade quando comparada a propagação convencional. Apesar das vantagens da propagação *in vitro* convencional, o ambiente controlado de cultivo pode levar a alterações na anatomia e no metabolismo das plantas (Fuentes et al., 2007; Couto et al., 2014).

Porém a propagação *in vitro* em escala comercial possui como limitante seu custo elevado para a obtenção de mudas com qualidade (Erig e Schuch, 2005).

A propagação convencional *in vitro* possui outro fator limitante que ocorre devido as mudanças fisiológicas e estruturais causadas pelas condições *in vitro*. A baixa troca gasosa e elevada umidade no interior do frasco, assim como a baixa luminosidade, a alta concentração de sacarose e de nutrientes no meio de cultura, levam a baixa eficiência fotossintética, mal funcionamento dos estômatos e redução da cera epicuticular (Hazarika, 2006).

Trabalhos têm sido desenvolvidos visando o aprimoramento das técnicas de produção de mudas do abacaxizeiro *in vitro* de modo a obter plantas com maior qualidade fisiológica e fitossanitária. O método de propagação *in vitro* fotoautotrófica com uso de luz natural, aumento das trocas gasosas e ausência de açúcar apresentou potencial para a substituição do método convencional em diferentes culturas de modo que as plantas produzidas a partir desse método apresentaram respostas fisiológicas positivas (Erig e Schuch, 2005; Saldanha et al., 2012; Barbosa, 2016; Alves 2021).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos econômicos

Segundo o IBGE no ano de 2020 o total de área plantada de abacaxi foi de 65,05 mil hectares. Já a área colhida foi de 64,79 mil hectares com produção de 1,64 milhão de frutos produzidos e com rendimento médio de produção de 25,27 mil frutos por hectare. Sendo a região Norte a que tem maior produção com 566,3 mil toneladas de abacaxi em 24,07 mil hectares de área colhida e rendimento médio de 23,52 mil Kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2022).

Entre os dez maiores produtores mundiais de abacaxi, no ano de 2020, o Brasil foi responsável por produzir 2,4 milhões de toneladas de abacaxi, ficando em terceiro lugar no ranking e perdendo apenas para Filipinas em primeiro com 2,7 milhões de toneladas e Costa Rica em segundo com produção total de 2,6 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2022).

Entre os anos de 2010 a 2020, a produção mundial e a área plantada de abacaxi tiveram aumentos expressivos até o ano de 2018 e apresentando quedas nos anos de 2019 e 2020. Já no Brasil a produção demonstrou altos e baixos durante esse mesmo período, em que sua menor produção ocorreu no ano de 2010 e seus picos de produção ocorreram nos anos de 2014, 2015 e 2018 (FAOSTAT, 2022).

No Brasil a maior produção se encontra no norte do país no estado do Pará com valor da produção equivalente a aproximadamente 552 milhões de reais e 357

milhões de frutos produzidos no ano de 2020. Segundo o IBGE (2022) há no estado do Rio de Janeiro, apenas seis cidades produtoras de abacaxi e com valor da produção de aproximadamente 153 milhões de reais e 143 milhões de frutos produzidos no ano de 2020. O maior produtor do estado do Rio de Janeiro é a cidade de São Francisco de Itabapoana com produção de frutos no valor de 128 milhões de reais no ano de 2020 enquanto a menor produção entre as cidades produtoras está em Cachoeiras de Macacu com valor da produção de 10 mil reais. A cidade de Campos dos Goytacazes é um dos maiores produtores do estado, sendo responsável por uma produção com valor equivalente a 6 milhões de reais no ano de 2020 (IBGE, 2022).

## 2.2. Origem e morfologia da planta

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) faz parte da família Bromeliaceae uma das famílias mais ecologicamente ricas e extensas da região neotropical que possui 78 gêneros e 3.646 espécies conhecidas (Butcher and Gouda, 2020). O planalto das Guianas localizado na Venezuela, as encostas andinas, a América Central e a Mata Atlântica no leste do Brasil são centros de diversidade e endemismo das bromeliáceas (Zizka et al., 2020).

O abacaxizeiro apresenta o metabolismo do tipo C3/CAM (Áragon et al., 2012). Plantas de metabolismo CAM facultativo são plantas que mantêm o metabolismo C3 quando em ambientes favoráveis, mas que alteram seu metabolismo para CAM em situações de estresse (Winter et al., 2019).

A temperatura considerada ideal para seu cultivo é de 22 a 26°C, sendo considerada ótima de 23°C a 24°C. Temperaturas acima de 30°C podem ser prejudiciais para o desenvolvimento da planta (FAO, 2022). Além disso, altas irradiações solares podem causar queimaduras de sol na infrutescência, gerando rejeição ao fruto por parte dos consumidores (Rabie and Mbatha, 2016).

Solos francos argilosos de textura média favorecem o desenvolvimento da planta, sendo considerados ideais para o cultivo. O abacaxizeiro possui a capacidade de se desenvolver em diferentes tipos de solo, sendo sensível a saturação de água no solo. A acidez ideal para o abacaxizeiro é na faixa de pH entre 4,5 e 6,5 (Reinhardt et al., 2018; FAO, 2022).

O abacaxizeiro pertence a classe Liliopsida, é uma planta perene e herbácea. Seu caule é curto, grosso e envolto por folhas sésseis e sobrepostas as quais formam uma densa roseta (Krauss, 1948). Sua haste floral possui formato claviforme, podendo medir de 25 a 50 cm de altura, 2 a 5 cm de largura na base e 5 a 8 cm de comprimento (Krauss, 1948; Collins, 1949; USDA, 2021).

As folhas são alongadas e podem conter espinhos (Reinhardt et al., 2018). Estas são classificadas de “A” até “F”, conforme a posição na planta, sendo organizado das folhas mais velhas para as mais novas, ou seja, da parte mais externa para a mais interna (Krauss, 1948).

A folha “D” é considerada a de maior importância para o manejo da cultura sendo a mais jovem entre as folhas adultas e, metabolicamente, a mais ativa de todas (Maleziex e Bartholomew, 2003; Maia et al., 2016).

O florescimento do abacaxizeiro é influenciado pelo comprimento dos dias, períodos de dias mais curtos e baixa temperatura noturna ou de alta nebulosidade, que reduzem a intensidade solar e aumentam o estresse hídrico podem induzir a floração natural do abacaxizeiro (Reinhardt et al., 2018). No entanto, esse pode ser induzido de forma artificial de maneira que a floração ocorra de forma sincronizada (Lin et al., 2007).

A infrutescência é formada mesmo que não ocorra a polinização. O abacaxizeiro é uma planta alto incompatível (Reinhardt and Cunha, 2006; Souza et al., 2017). A infrutescência é um sincarpo composta por um conjunto de bagas, e está localizado no caule, assim como os brotos (Crestoni, 2010). Ela é composta por aproximadamente 85% de água e 14% de açúcar o qual pode variar conforme a temperatura e irrigação. A massa por fruto pode variar de 1,5 a 1,8 kg e tem como rendimento total de frutos frescos entre 75 a 90 toneladas/ha (FAO, 2022).

O sistema radicular é fibroso, fasciculado e superficial (Krauss, 1948). A profundidade alcançada pelo sistema radicular do abacaxizeiro depende do tipo de solo. Quando em condições ideais, as raízes podem alcançar até 0,85 m de profundidade e atingir de 1 a 2 m de comprimento lateralmente (Reinhardt et al., 2018).

O desenvolvimento do abacaxizeiro é dividido em três fases: a primeira é conhecida como fase vegetativa e ocorre a partir do plantio e se encerra na diferenciação floral. Essa é a fase de maior crescimento vegetativo da planta, maior absorção e acúmulo de reservas. A segunda fase é a reprodutiva em que há o

desenvolvimento de flores e frutos e abrange desde a diferenciação floral até a maturação do fruto. A terceira e última é a fase propagativa que se inicia no final da fase reprodutiva e continua até o final do desenvolvimento das partes propagativas que dão origem as novas mudas como os rebentões e os filhotes (Reinhardt et al., 2002; Cunha, 2005).

### 2.3. Tipos de mudas

A propagação do abacaxizeiro é feita quase exclusivamente de forma vegetativa já que essas plantas apresentam alta incompatibilidade e, portanto, a reprodução de forma seminífera é feita apenas para fins de melhoramento genético (Cabral et al., 1993; Bartholomew, 2014; Souza et al., 2017).

Após a maturação da primeira infrutescência as plantas desenvolvem raízes em suas gemas axilares dando origem a novas brotações. Essas novas brotações podem dar origem a novos frutos (Reinhardt et al., 2018).

O abacaxizeiro produz naturalmente partes vegetativas que podem ser utilizadas para propagação. A produção de mudas do abacaxizeiro pode ser feita a partir de quatro diferentes partes da planta como: a coroa, os filhotes, os rebentões e os filhotes-rebentões (Franzon et al., 2010; Reinhardt et al., 2018).

Os filhotes são originários da base do pedúnculo, enquanto a coroa está localizada na parte superior dos frutos não sendo muito utilizada, pois são comercializadas junto aos frutos, os rebentões são originários de brotações de gemas do caule e já os filhotes-rebentões são brotações que ocorrem na região de conexão entre o caule e o pedúnculo (Krauss, 1948; Reinhardt et al., 2018).

### 2.4. A cultivar Pérola

Existem atualmente diversas cultivares de abacaxizeiro, entre elas estão: Gold, Pérola, Imperial, Vitória, IAC Fantástico, Jupi, Smooth Cayenne, entre outras. Destas, no entanto se destacam as cultivares Smooth Cayenne e Pérola conhecidas por serem as mais produzidas no Brasil (Sampaio et al., 2011).

No Brasil, a cultivar mais produzida é a Pérola, sendo essa, voltada principalmente para o consumo *in natura* da fruta. A planta possui porte ereto e folhas longas, que contém antocianina, com espinhos em sua borda distribuídos uniformemente nas bordas das folhas. Os frutos são ligeiramente cônicos, com

coroas grandes e eretas, casca amarelada e são suportados por pedúnculos longos. Sua polpa é esbranquiçada, com acidez moderada, rica em açúcares e em ácido ascórbico (Reinhardt et al., 2002; Pereira et al., 2009; Ramalho et al., 2009).

A cultivar Pérola produz pouca quantidade de mudas do tipo rebentão, que se originam de gemas axilares localizadas nas bainhas das folhas, e grande quantidade de mudas do tipo filhote, originadas de gemas axilares nas bainhas das brácteas do pedúnculo, o que torna estas o tipo de muda mais disponíveis e, portanto, as mais utilizadas no Brasil (Reinhardt et al., 2002; Ramalho et al., 2009).

Essa cultivar é altamente suscetível à fusariose, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme*, e ao nematoide das galhas (*Meloidogyne javanica*) e é hospedeira do nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*), porém apresenta resistência moderada à *Phytophthora* (Ramalho et al., 2009; Shamim et al., 2016; Reinhardt et al., 2018).

## 2.5. Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica biotecnológica que envolve o cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos de plantas em um meio de cultura nutritivo sob condições controladas de fotoperíodo, temperatura, umidade, densidade de fluxo de fótons, entre outros fatores (Carvalho, 2011).

A propagação *in vitro*, uma das técnicas da cultura de tecidos, permite, com o uso de pouco material vegetal, a obtenção de alto número de plantas aumentando, portanto, o número de mudas produzidas (Souza et al., 2009; Carvalho, 2011). Devido a sua aplicabilidade, a cultura de tecidos vegetais possui grande importância para as áreas agrícola, florestal, ornamental e medicinal devido a capacidade da técnica de multiplicação de indivíduos em larga escala, livres de agentes causadores de doenças e que também pode ser utilizada na conservação e intercâmbio de germoplasma, melhoramento de plantas, entre outros métodos (Carvalho, 2011; Yadav et al., 2019).

A micropropagação é feita em recipientes esterilizados, os quais, podem variar com a necessidade, o tipo de explante, a técnica utilizada, o tempo de cultivo entre outros. Os tubos de ensaio são utilizados universalmente na cultura de tecidos por possuírem aberturas estreitas as quais dificultam a contaminação. Porém, por possuírem baixa capacidade de plantas, podendo conter uma ou duas plantas por

frasco apenas, não são indicados para a propagação em larga escala (Prakash et al., 2004).

Podem ser utilizados também Erlenmeyers os quais são indicados para meios de culturas líquidos, placas de Petri plásticas ou vítreas em conjunto a frascos maiores para que sejam realizados posteriormente a multiplicação e alongação das mudas. Os frascos de vidro com tampa de polipropileno são, no entanto, os mais utilizados entre os citados devido a seu custo-benefício (Prakash et al., 2004).

Para a micropropagação são utilizados meios de cultura, os quais, podem ser líquidos ou semissólidos. Os tipos de meio e sua composição, quantidades de fitorreguladores e fonte de carbono, influenciam diretamente no desenvolvimento das mudas (Alvard et al., 1993; Atawia et al., 2016; Silva., 2016).

O uso de fitorreguladores no crescimento e desenvolvimento dos explantes para grande parte das plantas tem grande importância. As auxinas são fitorreguladores responsáveis por influenciar o tropismo e dominância apical nos explantes. Já as citocininas são responsáveis por regular a divisão celular, alterar a dominância apical gerando o crescimento das gemas laterais, além de regular o crescimento de caules e raízes. Esses fitorreguladores são responsáveis, portanto, por regular a morfogênese na cultura de tecidos (Carvalho, 2011; Atawia et al., 2016; Silva., 2016; Oliveira-Cauduro et al., 2017).

A micropropagação pode ser dividida em cinco fases sendo estas respectivamente: a escolha e o preparo da planta a ser micropropagada, o estabelecimento *in vitro* do material, a multiplicação das brotações e o enraizamento e alongamento das brotações. A última fase da micropropagação consiste na aclimatização a qual consiste na transferência das plantas do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (Cañal et al., 2001).

## 2.6. Micropropagação do abacaxizeiro

As cultivares mais consumidas atualmente no Brasil e no mundo são o Pérola e Smooth Cayenne, respectivamente, que são altamente suscetíveis a pragas e doenças que afetam diretamente a produção de abacaxi (Shamim et al., 2016).

A técnica de cultura de tecidos permite também que seja realizada a recuperação de plantas contaminadas por patógenos (Carvalho, 2011). A micropropagação do abacaxizeiro pode ser feita com o uso de diferentes partes da planta como partes das folhas, ápice caulinar e gemas axilares do abacaxizeiro (Albuquerque et al., 2000; Firoozabady e Moy, 2004; Soneji et al., 2008; Carvalho 2011; Omotoso, 2014).

O desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de cultura de tecidos é a melhor estratégia para a produção de abacaxizeiros de alta qualidade (Scherwinski-Pereira et al., 2012).

Segundo Reinhardt et al. (2018) e Be e Debergh (2006), desde o início dos trabalhos envolvendo a micropropagação do abacaxizeiro, técnicas vêm sendo aprimoradas nas áreas de genética e melhoramento, assim como na área de produção comercial. Atualmente, o desenvolvimento destes trabalhos está ligado ao aperfeiçoamento das técnicas de produção dentro das fases da micropropagação e da aclimatização como pode ser visto nos trabalhos de: Silva et al. (2014), Couto et al. (2016) e Guimarães (2016).

As formulações e tipos de meios para a micropropagação do abacaxizeiro variam segundo a cultivar utilizada sendo necessário o desenvolvimento de protocolos para cada uma. É por este motivo que diferentes formulações de meio de cultura vêm sendo estudadas em relação ao estado físico do meio, tipos e quantidades de fitorreguladores, concentração de sacarose, fontes de carbono, composição de sais minerais, entre outros (Escalona et al., 1999; Guerra et al., 1999; Cañal et al., 2001; Almeida et al., 2002; Barbosa et al., 2004).

Trabalhos envolvendo a consistência do meio de cultura, substituição das fontes de carbono, número de explantes por frasco, quantidade de fitorreguladores, uso de biorreatores, tem surgido como forma de reduzir os custos e otimizar a produção de mudas de abacaxizeiro micropropagadas (Escalona et al., 2003, Be e Deberg, 2006; Moreira et al., 2007; Hamad e Taha, 2009; Oliveira-Cauduro et al., 2017; Reis et al., 2018).

O abacaxizeiro possui o metabolismo do tipo C3/CAM. As plantas CAM são capazes de realizar a captação mais eficiente de dióxido de carbono quando comparadas com plantas C3 e C4, devido a sua capacidade de, quando há água disponível, abrir seus estômatos para captar o dióxido de carbono externo no período noturno e os fechar durante o período da manhã necessitando de menos

água que plantas com outro metabolismo com baixa disponibilidade hídrica. (Osmond, 1978; Pimentel et al., 1998; Ming et al., 2015).

Plantas de metabolismo do tipo CAM possuem como característica folhas suculentas relacionadas a captação e armazenamento de água, baixa densidade estomática, porém com alta capacidade de resposta, cutículas espessas, presença de cera epicuticular e raízes rasas. Essas características são estratégias para atenuar a seca e limitar a perda de água em condições de déficit hídrico (Niechayev et al., 2019).

Existe ainda a necessidade de maiores estudos sobre a micropropagação do abacaxizeiro envolvendo diferentes técnicas.

## 2.7. Membranas na micropropagação

Assim como descrito por Harizaka (2006), Saldanha et al. (2012) e Martins et al. (2020), distúrbios fisiológicos e modificações anatômicas foram vistos em plantas cultivadas sob condições heterotróficas. Isso ocorre, pois, nos frascos nos quais as plantas são cultivadas, há elevada umidade, baixas trocas gasosas entre o meio externo e o interno dos frascos e baixa incidência de luz artificial.

A umidade relativa no interior dos frascos pode ser influenciada pela temperatura, tipo de tampa e estado físico do meio de cultura utilizado (Ferreira. 2021). A elevada umidade no interior dos frascos reduz a transpiração e pode também reduzir o transporte de íons que dependem do fluxo de massa (Saldanha et al., 2012).

Erig e Shuch (2005) e Xiao et al. (2011) viram na propagação fotoautotrófica com luz natural um método de grande potencial para redução do custo de produção de plantas micropropagadas, assim como na produção de mudas com maior qualidade e maior sobrevivência na fase de aclimatização.

Batista et al. (2017) em seu trabalho com pimenteiras ornamentais verificaram que plantas de *Capsicum annuum* cultivadas em frascos vedados por tampas com membranas semipermeáveis apresentaram plantas mais vigorosas e melhores características anatômicas como sistema vascular bem desenvolvido e maior concentração de compostos fenólicos que aquelas cultivadas em frascos vedados com tampas sem membranas. Além de, apresentarem menor ocorrência de abscisão foliar, senescência, hiperidricidade e clorose.

Martins et al. (2020) evidenciaram os efeitos do cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico na anatomia e no fotossistema II de plantas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. (Bromeliaceae) propagadas *in vitro*. Plantas cultivadas em ambientes com maiores trocas gasosas apresentaram maior número de raízes em comparação às cultivadas em ambientes com menor troca gasosa independente da concentração de sacarose utilizada no meio de cultura.

O aumento da troca gasosa com o uso de membranas apresentou resultados positivos para *Vernonia condensata* promovendo crescimento, da taxa fotossintética e do metabolismo primário, reduzindo o estresse oxidativo (Fortini et al., 2021).

Como foi visto, o uso de membranas em outras culturas apresentou resultados positivos no cultivo *in vitro* de diversas culturas. Pode ser também ser explorado a migração do ambiente interno (sala de cultivo) em que há controle da temperatura e da intensidade luminosa para um ambiente externo (casa de vegetação) em que há menor controle sobre o ambiente durante as fases de multiplicação e enraizamento (Saldanha et al., 2012; Barbosa, 2016).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) e em casa de vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

#### 3.1. Material vegetal

Os explantes foram obtidos a partir de brotações no terceiro subcultivo pré-estabelecidas *in vitro* oriundos de abacaxizeiros cv. Pérola localizados em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA). Foram retirados 2/3 das folhas deixando as brotações com cerca de 1,0 cm de altura. A quebra da dominância apical foi realizada com o auxílio de um bisturi.

#### 3.2. Condução do experimento

##### 3.2.1. Fase 1: Multiplicação

Os explantes foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog 1962), vitaminas de White, 4,44  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de 6-benziladenina (BA) e 2,69  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido 3-indolilacético (ANA) e suplementado com 0, 20 e 40  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose PA, o pH foi ajustado para 5,7 e solidificado com 6  $\text{g L}^{-1}$  de ágar bacteriológico puro SIGMA® e autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm.

Foram distribuídos 40 mL de meio de cultura em cada frasco de vidro (65 x 125 mm). Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno sem e com duas perfurações de 1,0 cm de diâmetro cada, coberta com duas membranas. Cada membrana foi composta por duas camadas de fita micropore M (Missner and Missner<sup>®</sup>) e uma de politetrafluoretileno - PTFE (Amanco<sup>®</sup>) de  $0,05 \pm 0,01$  mm de espessura (Saldanha et al., 2012) estando a segunda localizada entre as camadas de membrana M.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), em um esquema fatorial 3x2x2, sendo três concentrações de sacarose PA (0, 20 e 40 g L<sup>-1</sup>), em dois ambientes (sala de cultivo e casa de vegetação), e dois tipos de vedações: tampa de polipropileno sem e com duas membranas porosas. O delineamento foi composto por 10 repetições, sendo cada uma composta por um frasco com seis brotações.

Os frascos foram mantidos em sala de cultivo com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro, irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e casa de vegetação localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do CCTA/UENF, com temperatura monitorada pelo datalogger Kimo – Kistock KM 110<sup>®</sup>.

Ao final de 40 dias foram avaliados: número de brotações, número de folhas, altura das plantas (cm) e escala de cores.

### 3.2.2. Fase 2: Enraizamento

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, em câmara de fluxo laminar os explantes utilizados na fase de multiplicação foram transferidos para o meio de cultura contendo os sais minerais do meio MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog 1962), e suplementado com 0, 20 e 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose PA, o pH foi ajustado para 5,7 e solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico puro Vetec<sup>®</sup> e autoclavados por 20 minutos a  $121^\circ\text{C}$  e 1,1 atm. Foram distribuídos 40 mL de meio de cultura em cada frasco de vidro (65 x 125 mm). Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno com e sem membranas porosas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3x2x2, sendo três níveis de sacarose PA (0, 20 e 40 g L<sup>-1</sup>), em dois ambientes (sala de cultivo e casa de vegetação), em dois tipos de vedações (tampa de polipropileno com e sem membrana porosa).

Após 30 dias, foram avaliados: a fluorescência da clorofila *a*, o índice de verde, o número de folhas, a altura das plantas (cm), a massa da matéria fresca total (g), massa da matéria seca da parte aérea (g), da raiz (g) e total (g).

### 3.2.3. Fase 3: Aclimatização das mudas

Após 30 dias, as plantas oriundas da fase de enraizamento *in vitro* foram levadas para a aclimatização em casa de vegetação em um delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial seguindo os mesmos tratamentos implementados na fase *in vitro*, com três repetições e cinco plantas por parcela. As mudas foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para remover os resíduos de meio de cultura aderido às raízes.

Após lavadas, as mudas foram plantadas em bandejas de polipropileno 6x5, com 15 células de aproximadamente 90 cm<sup>3</sup>, usando o substrato Basaplant Hortaliças<sup>®</sup> composto por turfa, casca de pinus, carvão, vermiculita e adubação inicial com NPK e micronutrientes. As mudas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada duas vezes ao dia.

As avaliações foram realizadas aos 140 dias de aclimatização.

Aos 140 dias de aclimatização foram avaliados: altura das plantas (cm); número de folhas; fluorescência da clorofila *a*; índice de verde; massa da matéria fresca total (g); massa da matéria seca da parte aérea (g), da raiz (g) e total (g) e volume radicular (m<sup>3</sup>).

## 3.3. Avaliações

### 3.3.1. Determinação do índice de verde

O índice de cor verde das folhas foi feito por meio do medidor portátil de clorofila modelo SPAD-502 (Minolta, Japão). As medições foram feitas em diferentes pontos evitando as nervuras e extremidades da folha.

### 3.3.2. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) e Índice Fotossintético (*Photosynthetic Index* - PI)

Para a avaliação da eficiência fotoquímica, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (Fv/Fm) e o Índice Fotossintético (PI) ( $PI = RC/ABS \times FV/F0$ )

x ET/(TR-ET), foram determinados na folha D, a mais metabolicamente ativa, por meio de um fluorímetro não-modulado, modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk).

A folha foi pinçada de forma que a região a ser avaliada permaneceu no escuro pelo período de 20 minutos, com finalidade de maior precisão dos centros de reações do fotossistema II (PSII). Para a leitura o equipamento incidiu um feixe de luz de 3500  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  com assistência de três diodos emissores de luz com comprimento de 650 nm.

### 3.3.3. Determinação da altura da planta

Para a determinação da altura das plantas, foi utilizado um paquímetro digital (Santec®). As medições foram realizadas da base da planta ao topo do caule.

### 3.3.4. Determinação do volume de raízes

A determinação do volume foi feita colocando-se as raízes em proveta graduada, contendo um volume conhecido de água. O volume da raiz foi definido pela diferença do volume no interior da proveta com a raiz e sem a raiz em seu interior.

### 3.3.5. Determinação da massa da matéria fresca

A massa da matéria fresca foi definida pela pesagem das plantas em balança analítica (Bel Engineering®) logo após serem retiradas do ambiente em que se encontravam (frascos ou bandejas).

### 3.3.6. Determinação da massa da matéria seca

As plantas foram divididas em sistema radicular e parte aérea, acondicionadas separadamente em sacos de papel identificados e foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 70°C até que fosse cessada a perda de água pelas partes. Posteriormente, essas foram pesadas em balança analítica.

### 3.3.7. Escala de cores

A avaliação da coloração das plantas foi feita por meio da classificação de um a quatro, segundo o quadro de cores correspondente. A classificação ocorreu da seguinte forma: quatro para verde, três para verde claro, dois para amarelo e um para marrom (para plantas mortas).

#### 3.4. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste inicial de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi feita a análise de variância (ANOVA), e os graus de liberdade dos tratamentos e suas interações foram desdobrados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Fase 1: Multiplicação

Ao final de 40 dias as brotações de *Ananas comosus* L. cv. Pérola foram analisadas e transferidas para o meio de enraizamento (Figura 1). A temperatura média durante esta fase em casa de vegetação foi de 26,6°C enquanto para sala de cultivo foi de 24,3°C. Em sala de cultivo a menor temperatura evidenciada pelo datalogger foi igual a 16,6°C, enquanto a maior foi de 39,2°C. Já em casa de vegetação a mínima e a máxima foram de 17,8 e 45,2°C, respectivamente. A umidade relativa média em casa de vegetação foi de 77,4% e na sala de cultivo foi de 50,7% e intensidade luminosa média foi de 760,4 e 160,7 lux, respectivamente.

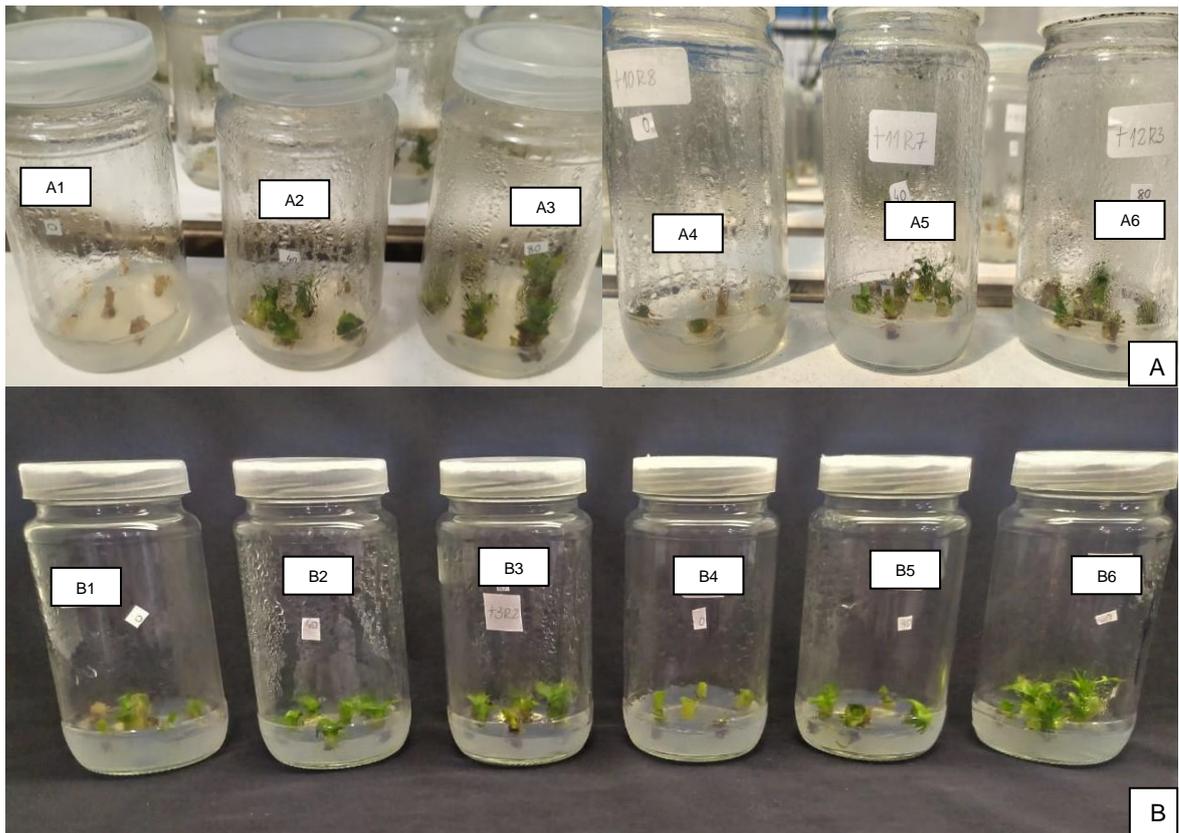


Figura 1 Explantes cultivados em diferentes ambientes (A) casa de vegetação em que (A1) Casa de vegetação + tampa sem membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (A2) Casa de vegetação + tampa sem membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (A3) Casa de vegetação + tampa sem membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (A4) Casa de vegetação + tampa com membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (A5) Casa de vegetação + tampa com membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (A6) Casa de vegetação + tampa com membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; e (B) sala de cultivo sendo (B1) Sala de cultivo + tampa sem membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (B2) Sala de cultivo + tampa sem membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (B3) Sala de cultivo + tampa sem membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (B4) Sala de cultivo + tampa com membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (B5) Sala de cultivo + tampa com membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (B6) Sala de cultivo + tampa com membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

O número de folhas apresentou efeito significativo para as três diferentes variáveis, mas sem que houvesse interação entre essas. Apesar da diferença de temperatura, umidade e intensidade de luz entre os ambientes, o número de folhas para plantas cultivadas em sala de cultivo e casa de vegetação não apresentaram diferença significativa entre elas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de desdobramento do número de folhas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função do ambiente de cultivo após 40 dias em meio para multiplicação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2021

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Média</b>
<b>Sala de cultivo</b>	1,23a
<b>Casa de vegetação</b>	1,12a
<b>C.V. (%)</b>	48,66

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Tampas com membranas permitem trocas gasosas maiores entre o interior e exterior do frasco quando comparadas a tampas de polipropileno sem membranas permeáveis a gases. No entanto, para a variável de número de folhas não foi visto diferença significativa entre elas (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de desdobramento do número de folhas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da vedação dos frascos após 40 dias em meio para multiplicação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2021

<b>Vedação</b>	<b>Média</b>
<b>Tampas sem membranas</b>	1,18a
<b>Tampas com membranas</b>	1,17a
<b>C.V. (%)</b>	48,66

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Os explantes cultivados nessa fase apresentaram menor quantidade de folhas no meio sem suplementação de sacarose, sendo vista a necessidade de suplementação de sacarose no meio. Plantas submetidas à concentração de 40 g L<sup>-1</sup> apresentaram diferença significativa entre as duas outras concentrações utilizadas (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de desdobramento do número de folhas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função das concentrações de sacarose após 40 dias em meio para multiplicação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2021

<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	0,06 c
<b>20</b>	1,89 a
<b>40</b>	1,58 b
<b>C.V. (%)</b>	48,66

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

O número de brotações foi influenciado pela interação entre os três fatores estudados. Explantes em meio sem fonte exógena de carbono apresentaram menores médias significativamente independentemente do ambiente a que foram submetidos e tipo de vedação utilizada. A vedação dos frascos nos ambientes não apresentou diferença significativa entre as concentrações de sacarose em sala de cultivo. Já em casa de vegetação a concentração de 40 g L<sup>-1</sup> e tampas sem membranas, foi evidenciado diferença significativa entre as demais concentrações e vedações. O ambiente de cultivo utilizado, segundo a estatística, não apresentou diferença significativa nas condições desse experimento para esta fase (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de desdobramento do número de brotos de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo, tampa dos frascos com e sem membrana e meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose após 40 dias em meio para multiplicação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2021

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ambiente de Cultivo	
		Casa de vegetação	Sala de cultivo
Tampa Sem membranas	0	0,50 Aab <sub>u</sub>	0,75 Aab <sub>u</sub>
	20	2,08 Aaa <sub>u</sub>	1,48 Aaa <sub>u</sub>
	40	1,85 Aba <sub>u</sub>	2,29 Aaa <sub>u</sub>
Tampa com Membranas	0	0,13 Aac <sub>u</sub>	0,03 Aac <sub>u</sub>
	20	1,98 Aab <sub>u</sub>	2,02 Aab <sub>u</sub>
	40	4,47 Aaa <sub>u</sub>	2,92 Aaa <sub>u</sub>
<b>Médias</b>		<b>1,84</b>	<b>1,58</b>
<b>C.V. (%)</b>		48,49	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (ambiente de cultivo dentro de vedação e sacarose), minúscula na coluna (vedação dentro de ambiente e sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (sacarose dentro de ambiente e vedação), não diferem entre si pelo teste F e Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A altura das brotações foi influenciada pela interação entre os três fatores (Tabela 5). As plantas em casa de vegetação na concentração de 40 g L<sup>-1</sup> e tampas sem membranas apresentaram menor média significativa sendo comparado as mesmas condições, porém em sala de cultivo.

As plantas em meio de cultura sem sacarose, para os dois ambientes e para as duas tampas foram as de menor altura entre as observadas. As brotações ainda nas condições de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram entre elas diferença para a forma de vedação. As médias encontradas para tampas com e sem membranas indicam que as condições criadas por esse tipo de vedação, foram favoráveis ao crescimento dos explantes se comparado às plantas vedadas por tampas com membranas para as condições de temperatura, umidade e intensidade luminosa a qual foram submetidas (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de desdobramento da altura das brotações de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo, tampa dos frascos com e sem membrana e meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose após 40 dias em meio para multiplicação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2021

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ambiente de Cultivo	
		Casa de vegetação	Sala de cultivo
Tampa Sem membranas	0	10,43 Aaa	9,38 Aab
	20	13,67 Aaa	15,99 Aaa
	40	12,38 Baa	17,49 Aaa
Tampa com Membranas	0	1,74 Abb	0,26 Abb
	20	13,65 Aaa	14,97 Aaa
	40	14,05 Aaa	11,90 Aab
<b>Médias</b>		<b>10,99 A</b>	<b>11,66 B</b>
<b>C.V. (%)</b>		25,88	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (ambiente de cultivo dentro de vedação e sacarose), minúscula na coluna (vedação dentro de ambiente e sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (sacarose dentro de ambiente e vedação), não diferem entre si pelo teste F e Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Para a variável escala de cores ocorreu interação tripla entre os fatores (Tabela 6). Plantas verdes (escala 2, 3 e 4 aumentando a intensidade de verde nesta sequência) representam plantas saudáveis e vivas dentro das condições de cultivo a que foram submetidas. Enquanto que, as marrons representam plantas não saudáveis e mortas (escala 1).

A menor quantidade de plantas verdes foi vista na condição de ausência de sacarose. Para essa concentração de sacarose os explantes cultivados em frascos vedados por membranas apresentaram diferença significativa aos cultivados em vedação sem membrana. As plantas em casa de vegetação para as concentrações de 20 e 40 g L<sup>-1</sup> não apresentaram diferença significativa. Já para as mesmas concentrações em sala de cultivo, as plantas vedadas por tampas sem membranas apresentaram um maior número de plantas verdes, possivelmente possuindo melhor desempenho fotossintético (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de desdobramento da escala de cores das brotações de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo, tampa dos frascos com e sem membrana e meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose após 40 dias em meio para multiplicação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2021

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ambiente de Cultivo	
		Casa de vegetação	Sala de cultivo
Tampa Sem membranas	0	2,58 Aa <sub>a</sub>	2,38 Aa <sub>c</sub>
	20	3,00 Ba <sub>a</sub>	3,62 Aa <sub>a</sub>
	40	2,90 Aa <sub>a</sub>	3,17 Aa <sub>b</sub>
Tampa com Membranas	0	1,20 Ab <sub>b</sub>	1,02 Ab <sub>b</sub>
	20	3,12 Aa <sub>a</sub>	2,91 Ab <sub>a</sub>
	40	3,17 Aa <sub>a</sub>	2,63 Bb <sub>a</sub>
<b>Médias</b>		<b>2,67 A</b>	<b>2,62</b>
<b>C.V. (%)</b>		15,97	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (ambiente de cultivo dentro de vedação e sacarose), minúscula na coluna (vedação dentro de ambiente e sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (sacarose dentro de ambiente e vedação), não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2. Fase 2: Enraizamento

Após o período de 40 dias em meio de enraizamento, as mudas foram avaliadas. A temperatura média para esta fase foi de 23,3°C em casa de vegetação em que os valores máximos e mínimos atingidos foram respectivamente iguais a 40,9 e 13,7°C. A umidade relativa média nesse ambiente foi de 78,4% enquanto que a intensidade luminosa média foi de 488,0 lux. Já em sala de cultivo a temperatura média foi igual a 25,7°C e suas temperaturas máximas e mínimas de 30,1 e 21,4°C, respectivamente. A umidade relativa média foi de 48,6% e a intensidade luminosa foi de 137,3 lux.

O número de folhas na fase de enraizamento foi influenciado pela interação entre os três fatores. A menor quantidade de folhas foi encontrada para plantas em ambiente ausente de suplementação de sacarose, casa de vegetação e vedados por tampa com membranas. A ausência de membranas, resulta em menor troca gasosa, e a maior intensidade luminosa pode ter sido o responsável por esse resultado, já que quando comparadas a mudas sob as mesmas condições, mas cultivadas em sala de cultivo, as médias não apresentam diferença significativa a outras encontradas nas concentrações de 20 e 40 g L<sup>-1</sup> (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de desdobramento do número de folhas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre a vedação dos frascos e as diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ambiente de Cultivo	
		Casa de vegetação	Sala de cultivo
Tampa Sem membranas	0	8,59 Aaa	6,88 Aab
	20	9,07 Aaa	9,67 Aaa
	40	8,35 Aaa	9,50 Aaa
Tampa com Membranas	0	5,24 Abb	6,50 Aaa
	20	8,58 Aaa	7,78 Aba
	40	8,67 Aaa	6,26 Bba
<b>Médias</b>		<b>8,08</b>	<b>7,77</b>
<b>C.V. (%)</b>		24,55	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (ambiente de cultivo dentro de vedação e sacarose), minúscula na coluna (vedação dentro de ambiente e sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (sacarose dentro de ambiente e vedação), não diferem entre si pelo teste F e Tukey (P≤0,05).

A altura das plantas foi influenciada pela interação tripla dos fatores estudados e plantas cultivadas em sala de cultivo nessa fase apresentaram, para a vedação com membranas, os menores valores de 16,95 e 16,58 nas concentrações de zero e 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Esse fator pode ter sido influenciado pela baixa intensidade luminosa nesse ambiente já que quando comparados a plantas cultivadas em casa de vegetação a altura média das plantas apresentaram em condições semelhantes, maior valor (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de desdobramento da altura das plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ambiente de Cultivo	
		Casa de vegetação	Sala de cultivo
Tampa Sem membranas	0	22,69 Aab	19,06 Bab
	20	25,61 Aaab	22,95 Aaa
	40	27,05 Aaa	25,16 Aaa
Tampa com Membranas	0	22,63 Aab	16,95 Baab
	20	22,33 Abb	20,01 Aba
	40	28,25 Aaa	16,58 Bbb
<b>Médias</b>		<b>24,76</b>	<b>20,12</b>
<b>C.V. (%)</b>		14,32	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (ambiente de cultivo dentro de vedação e sacarose), minúscula na coluna (vedação dentro de ambiente e sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (sacarose dentro de ambiente e vedação), não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Plantas sob concentração de 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, obtiveram menor tamanho médio de suas raízes para as duas interações significativas dessa fase (Tabelas 9 e 10).

O crescimento radicular reduzido foi, possivelmente, a resposta das plantas a alta concentração de sacarose, onde nas condições apresentadas em casa de vegetação não foram favoráveis ao desenvolvimento radicular das mudas de abacaxizeiro (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre o ambiente de cultivo e as diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Ambiente de cultivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
<b>Casa de vegetação</b>	1,76 Ab	1,74 Aa	1,78 Aa	1,76
<b>Sala de cultivo</b>	2,04 Aa	1,91 Aa	1,20 Bb	1,72
<b>Média</b>	1,9	1,83	1,49	1,74

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F (P≤0,05).

O uso de membranas permeáveis a trocas gasosas quando associadas a maior concentração de sacarose deste experimento, não apresentou resultados positivos sendo a de menor volume dentre os tratamentos avaliados (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre a vedação dos frascos e as diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
<b>Tampa Sem membranas</b>	1,91 Aa	1,76 ABa	1,61 Ba	1,76
<b>Tampa com Membranas</b>	1,89 Aa	1,89 Aa	1,37 Bb	1,72
<b>Média</b>	1,9	1,83	1,49	<b>1,74</b>
<b>C.V. (%)</b>	16,4			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Para a variável massa da matéria fresca, plantas em frascos vedados por tampas sem membranas e em meio sem fonte de carbono exógeno, apresentaram menores médias quando comparadas a mudas nas concentrações de 20 e 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 11). No entanto, os menores valores encontrados ocorreram

para plantas cultivadas em frascos vedados por tampas com membranas (Tabela 12).

O cultivo fotoautotrófico para essa variável não apresentou efeito positivo. Sendo esse aproximadamente 20% menor que plantas em condições fotomixotróficas (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Análise de desdobramento da massa da matéria fresca de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Ambiente de cultivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
<b>Casa de vegetação</b>	1,21 Ba	2,56 Aa	2,69 Aa	2,12
<b>Sala de cultivo</b>	1,45 Ba	1,83 ABb	2,19 Ab	1,82
<b>Média</b>	1,28	2,20	2,44	1,97

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 12. Análise de desdobramento da massa da matéria fresca de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois tipos de vedação e diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
<b>Tampa Sem membranas</b>	1,12 Ba	2,45 Aa	2,71 Aa	2,09
<b>Tampa com Membranas</b>	1,54 Ba	1,19 ABb	2,16 Ab	1,63
<b>Média</b>	1,43	1,82	2,44	<b>1,87</b>
<b>C.V. (%)</b>	35,33			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

O acúmulo de biomassa está ligado a exposição de plantas em ambientes que permitam uma quantidade de trocas gasosas favoráveis ao aumento de taxas fotossintéticas (Xiao et al., 2011; Fortini et al., 2021). Os ambientes utilizados nesse trabalho, para essa fase, não diferiram significativamente nas médias (Tabela 13).

Tabela 13. Médias de massa da matéria seca de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em diferentes ambientes de cultivo após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Média</b>
<b>Sala de cultivo</b>	0,02a
<b>Casa de vegetação</b>	0,02a
<b>C.V. (%)</b>	115,24

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

As mudas cultivadas em frascos sem membranas obtiveram maior média de massa da matéria seca total. O que pode ser considerado que nas condições de cultivo a qual foram submetidas, plantas em que a vedação não possuía membranas semipermeáveis a gases apresentaram maior taxa fotossintética que plantas em frascos vedados por tampas com membranas (Tabela 14).

Tabela 14. Médias de massa da matéria seca total de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em diferentes tipos de vedação após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Vedação</b>	<b>Média</b>
<b>Tampas sem membranas</b>	0,03 a
<b>Tampas com membranas</b>	0,02 b
<b>C.V. (%)</b>	115,24

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Entre as diferentes quantidades de sacarose, apenas os tratamentos suplementados com 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram diferença significativa e

apresentando maior acúmulo de biomassa quando comparados aos tratamentos com zero e 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 15).

Tabela 15. Médias de massa da matéria seca total de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em diferentes concentrações de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	0,01 b
<b>20</b>	0,02 b
<b>40</b>	0,04 a
<b>C.V. (%)</b>	115,24

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

O índice de verde nas folhas possui relação com a concentração de clorofila. O valor calculado pode também estar relacionado à disponibilidade de nitrogênio e estresse hídrico nas plantas (Buckland et al., 1991; Torres Neto et al., 2002). Plantas em frascos vedados com tampas com membranas apresentaram menores médias de índice de verde, possivelmente pela baixa concentração de CO<sub>2</sub> e mal desempenho fotossintético (Tabela 16).

Tabela 16. Análise de desdobramento do índice de verde de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre a vedação dos frascos e concentração de sacarose após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Vedação dos Frascos</b>	<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>			<b>Média</b>
	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	
<b>Tampa Sem membranas</b>	6,66 Aa	3,93 ABa	2,85 Ba	4,48
<b>Tampa com Membranas</b>	0,00 Ab	1,22 Ab	0,96 Ab	0,73
<b>Média</b>	3,33 B	2,56 A	1,91 A	<b>2,6</b>
<b>C.V. (%)</b>	160,99			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Não houve diferença significativa para as plantas cultivadas em casa de vegetação e em sala de cultivo para o índice de verde (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de desdobramento do índice de verde de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função do ambiente de cultivo após 40 dias de enraizamento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Média</b>
<b>Sala de cultivo</b>	2,42a
<b>Casa de vegetação</b>	2,78a
<b>C.V. (%)</b>	160,99

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.3. Fase 3: Aclimatização das mudas

Após 140 dias na fase de aclimatização (Figura 2), as plantas foram avaliadas para as diferentes variáveis e os resultados foram submetidos à análise de variância. A temperatura média em casa de vegetação durante esse período foi de 25,2°C em que a menor temperatura medida foi igual a 15,1°C e a maior de 45,42°C, a umidade relativa média foi de 79,7% e a intensidade luminosa média de 498,9 lux.



Figura 2. Mudanças recém-saídas da fase de enraizamento, plantadas em bandejas de polipropileno 6x5, com 15 células de aproximadamente 90 cm<sup>3</sup>, usando o substrato Basaplant Hortaliças<sup>®</sup> distribuídas em blocos ao acaso em casa de vegetação durante a fase de aclimatização. T1 - Sala de cultivo + tampa sem membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T2 - Sala de cultivo + tampa sem membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T3 - Sala de cultivo + tampa sem membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T4 - Casa de vegetação + tampa sem membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T5 - Casa de vegetação + tampa sem membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T6 - Casa de vegetação + tampa sem membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T7 - Sala de cultivo + tampa com membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T8 - Sala de cultivo + tampa com membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T9 - Sala de cultivo + tampa com membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T10 - Casa de vegetação + tampa com membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T11 - Casa de vegetação + tampa com membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T12 - Casa de vegetação + tampa com membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A resposta ao ambiente de cultivo apresentou diferença significativa para a fase de aclimatização para número de folhas. Plantas anteriormente cultivadas em casa de vegetação, ao passarem para a fase de aclimatização, obtiveram maior número de folhas decorrente de, provavelmente, maior rusticidade obtida pela exposição a alta intensidade luminosa e umidade relativa do ambiente na fase posterior (Tabela 18).

Tabela 18. Médias de número de folhas de *Ananas comosus* L. em dois ambientes de cultivo após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Média</b>
<b>Sala de cultivo</b>	11,20 b
<b>Casa de vegetação</b>	13,95 a
<b>C.V. (%)</b>	10,34

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Frascos vedados por tampas sem membranas realizam menor troca gasosa e possuem maior umidade (Barbosa, 2016). Plantas cultivadas em frascos sem membranas obtiveram um maior número de folhas na fase de aclimatização (Tabela 19).

Tabela 19. Médias de número de folhas de *Ananas comosus* L. em dois tipos de vedação após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Vedação</b>	<b>Média</b>
<b>Tampas sem membranas</b>	13,37 a
<b>Tampas com membranas</b>	11,79 b
<b>C.V. (%)</b>	10,34

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Plantas cultivadas *in vitro* em sacarose apresentaram maior número de folhas e volume radicular na fase de aclimatização (Tabelas 20 e 21).

Plantas em cultivo fotoautotrófico na fase de enraizamento, não obtiveram melhor desempenho para as variáveis de número de folhas e volume de raiz podendo ser resultado do mal funcionamento do aparato fotossintético ocorrido na fase anterior devido às condições de temperatura, umidade e intensidade luminosa aos quais esses foram submetidos (Tabelas 20 a 23).

Tabela 20. Médias de número de folhas de *Ananas comosus* L. em diferentes concentrações de sacarose após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	11,31 b
<b>20</b>	13,33 a
<b>40</b>	13,08 a
<b>C.V. (%)</b>	10,34

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 21. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e a vedação dos frascos após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	0,94 b
<b>20</b>	1,30 ab
<b>40</b>	1,37 a
<b>C.V. (%)</b>	34,72

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

O volume das raízes não apresentou diferença significativa para os ambientes (Tabela 22). Os tipos de vedação também não foram estatisticamente diferentes (Tabela 23).

Tabela 22. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e a vedação dos frascos após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Média</b>
<b>Sala de cultivo</b>	1,15 a
<b>Casa de vegetação</b>	1,25 a
<b>C.V. (%)</b>	34,72

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 23. Análise de desdobramento do volume radicular de plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e a vedação dos frascos após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Vedação</b>	<b>Média</b>
<b>Tampas sem membranas</b>	1,27 a
<b>Tampas com membranas</b>	1,13 a
<b>C.V. (%)</b>	34,72

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

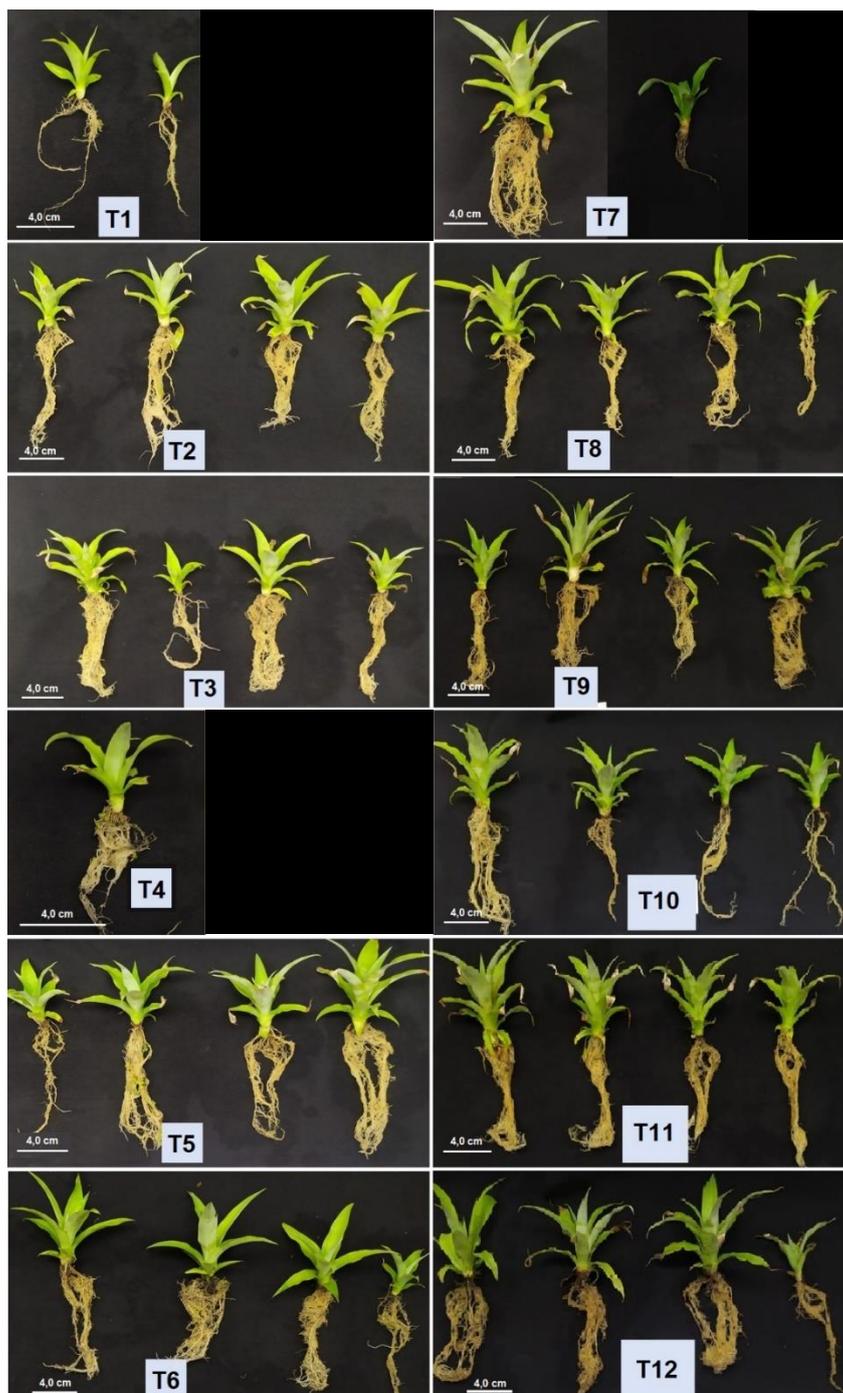


Figura 3. Plantas após 140 dias em fase de enraizamento. T1 - Sala de cultivo + tampa sem membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T2 - Sala de cultivo + tampa sem membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T3 - Sala de cultivo + tampa sem membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T4 - Casa de vegetação + tampa sem membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T5 - Casa de vegetação + tampa sem membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T6 - Casa de vegetação + tampa sem membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T7 - Sala de cultivo + tampa com membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T8 - Sala de cultivo + tampa com membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T9 - Sala de cultivo + tampa com membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T10 - Casa de vegetação + tampa com membranas + 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T11 - Casa de vegetação + tampa com membranas + 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose; T12 - Casa de vegetação + tampa com membranas + 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A maior média para a variável altura após a aclimatização, ocorreu para as mudas cultivadas *in vitro* em casa de vegetação em frascos vedados com tampas sem membranas (Tabela 24). As menores alturas nesta fase foram encontradas para plantas cultivadas em sala de cultivo e sem sacarose na fase *in vitro* (Tabela 25). Os resultados encontrados para altura concordam com os encontrados para vitalidade (Tabela 34 e 35) demonstrando que o crescimento está ligado a atividade dos fotossistemas I e II.

Tabela 24. Análise de desdobramento da altura de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e a vedação dos frascos, após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos frascos	Ambiente de cultivo		Média
	Sala de cultivo	Casa de vegetação	
Tampa sem membranas	32,92 Ba	44,73 Aa	38,83
Tampa com membranas	34,19 Aa	37,06 Ab	35,63
<b>Média</b>	33,56	40,90	<b>37,23</b>
<b>C.V. (%)</b>		10,24	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 25. Análise de desdobramento da altura de plantas de abacaxizeiro cv Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo e concentrações de sacarose, após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Ambiente de cultivo	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
Casa de vegetação	39,90 Aa	41,38 Aa	41,41 Aa	40,90
Sala de cultivo	27,01 Bb	36,74 Ab	36,92 Aa	33,56
<b>Média</b>	33,46	39,06	39,17	<b>37,23</b>

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

O acúmulo de biomassa está ligado a exposição de plantas em ambientes que permitam uma quantidade de trocas gasosas favoráveis ao aumento de taxas fotossintéticas (Xiao et al., 2011; Fortini et al., 2021). Plantas provenientes do cultivo *in vitro* em sala de cultivo (Tabela 26) e em meio sem fonte exógena de carbono (Tabela 27), obtiveram menor acúmulo de biomassa na parte aérea.

Tabela 26. Médias de massa da matéria seca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em dois ambientes de cultivo após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Média</b>
<b>Sala de cultivo</b>	0,31 b
<b>Casa de vegetação</b>	0,52 a
<b>C.V. (%)</b>	26,31

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 27. Médias de massa da matéria seca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em diferentes concentrações de sacarose após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média</b>
<b>0</b>	0,33 b
<b>20</b>	0,47 a
<b>40</b>	0,44 a
<b>C.V. (%)</b>	26,31

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Os tipos de vedação utilizados nesse trabalho, não diferiram significativamente em suas médias para as variáveis de massa da matéria seca da parte aérea (Tabela 28) e de raiz (Tabela 29).

Tabela 28. Médias de massa da matéria seca da parte aérea de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em dois tipos de vedação após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Vedação</b>	<b>Média</b>
<b>Tampas sem membranas</b>	0,47 a
<b>Tampas com membranas</b>	0,35 a
<b>C.V. (%)</b>	26,31

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

Tabela 29. Médias de massa da matéria seca da raiz de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em dois tipos de vedação após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Vedação</b>	<b>Média</b>
<b>Tampas sem membranas</b>	0,17 a
<b>Tampas com membranas</b>	0,15 a
<b>C.V. (%)</b>	29,43

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

O menor acúmulo de biomassa radicular foi observado para as plantas cultivadas em sala de cultivo e sem sacarose, devido, provavelmente, ao baixo desempenho fotossintético apresentado nessas condições (Tabela 30).

Tabela 30. Médias de massa da matéria seca da raiz de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em dois ambientes de cultivo após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

<b>Ambiente de cultivo</b>	<b>Sacarose (g L<sup>-1</sup>)</b>			<b>Média</b>
	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	
<b>Casa de vegetação</b>	0,20 Aa	0,21 Aa	0,17 Aa	0,19
<b>Sala de cultivo</b>	0,06 Bb	0,14 Ab	0,18 Aa	0,13
<b>Média</b>	0,13	0,18	0,18	0,16

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

O menor índice de verde foi encontrado na interação entre o meio sem sacarose e vedação de tampa com membranas possivelmente pelo baixo desempenho fotossintético (Tabela 31). Os ambientes não apresentaram diferença estatística entre as médias para esta variável (Tabela 32).

Tabela 31. Análise de desdobramento do índice de verde de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre a vedação dos frascos e concentração de sacarose após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
<b>Tampa Sem membranas</b>	28,09 Aa	24,58 Aa	23,62 Aa	25,43
<b>Tampa com Membranas</b>	16,40 Bb	23,90 Aa	25,18 Aa	21,83
<b>Média</b>	22,25	24,24	24,40	<b>23,63</b>
<b>C.V. (%)</b>	14,61			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Tabela 32. Análise de desdobramento do índice de verde de plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função de dois ambientes de cultivo após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Ambiente de cultivo	Média
<b>Sala de cultivo</b>	23,95 a
<b>Casa de vegetação</b>	23,31 a
<b>C.V. (%)</b>	14,61

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste F (P≤0,05).

Nesta fase a interação tripla ocorreu apenas para relação Fv/Fm (tabela 33). Essa relação é utilizada para indicar o estresse devido a alterações da funcionalidade do Fotossistema II (PS II) por fatores bióticos ou abióticos. Segundo Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), a relação Fv/Fm para plantas não submetidas a estresse podem ter valores entre 0,75 e 0,85.

Nenhum dos valores de  $F_v/F_m$ , no final da aclimatização, foi igual ou maior que 0,75, demonstrando que não houve um bom funcionamento do PSII para nenhum dos tratamentos. O tratamento que mais se aproximou dos valores de plantas não estressadas ocorreu para o tratamento em casa de vegetação em que não há suplementação de sacarose e é vedado por tampas sem membranas. As mudas cultivadas em sala de cultivo, sem fonte externa de carbono e vedado por tampas com membranas apresentaram baixa funcionalidade do fotossistema II (Tabela 33).

Tabela 33. Análise de desdobramento da relação  $F_v/F_m$  de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois ambientes de cultivo, frascos com e sem membrana e meios com diferentes concentrações de sacarose após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Ambiente de Cultivo	
		Casa de vegetação	Sala de cultivo
Tampa Sem membranas	0	0,74 Aaa	0,72 Aaa
	20	0,68 Aaa	0,70 Aaa
	40	0,69 Aaa	0,66 Aaa
Tampa com Membranas	0	0,61 Abb	0,35 Bbb
	20	0,71 Aaa	0,68 Aaa
	40	0,68 Aaab	0,64 Aaa
<b>Médias</b>		<b>0,69</b>	<b>0,63</b>
<b>C.V. (%)</b>		<b>6,57</b>	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha (ambiente de cultivo dentro de vedação e sacarose), minúscula na coluna (vedação dentro de ambiente e sacarose), e minúscula sublinhada na coluna (sacarose dentro de ambiente e vedação), não diferem entre si pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

O parâmetro mais utilizado da fluorescência de clorofila é o índice fotossintético (PI) fornece informações quantitativas sobre o estado geral das plantas e sua vitalidade (Kalaji et al., 2016). O índice fotossintético é também chamado de “vitalidade” já que este mostra o desempenho da planta em condições de estresse de forma mais elaborada, mostrando a atividade dos fotossistemas I e II (Christen et al., 2007; Vettorazzi et al., 2019; Bussotti et al., 2020).

Após 140 dias em aclimatização, a fluorescência da clorofila *a* apresentou ter sido influenciada pela interação vedação e ambiente de cultivo e pela interação

entre a quantidade de sacarose e o tipo de vedação dos frascos. Para as duas interações a vedação de tampas com membranas foi um fator comum entre as menores médias dos tratamentos. As tampas com membranas permitem maior troca gasosa com o interior e exterior do frasco e, portanto, menor concentração no interior do frasco (Tabela 34).

Tabela 34. Médias do índice fotossintético (PI) de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em dois ambientes de cultivo após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos frascos	Ambiente de cultivo		Média
	Sala de cultivo	Casa de vegetação	
Tampa sem membranas	0,86 Aa	0,86 Aa	0,86
Tampa com membranas	0,44 Bb	0,75 Aa	0,60
<b>Média</b>	0,65	0,81	<b>0,73</b>
<b>C.V. (%)</b>		24,15	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Plantas cultivadas sob condição de baixa concentração de sacarose e ausência de suplementação de carbono, apresentaram médias significativamente inferiores quando comparados com frascos vedados por tampas sem membranas as quais se encontram em um ambiente com maior concentração de CO<sub>2</sub> e menor estresse (Tabela 35).

Tabela 35. Médias do índice fotossintético (PI) de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) em função da interação entre dois tipos de vedação e concentrações de sacarose após 140 dias de aclimatização. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Vedação dos Frascos	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			Média
	0	20	40	
<b>Tampa Sem membranas</b>	0,97 Aa	0,87 ABa	0,75 Aa	0,86
<b>Tampa com Membranas</b>	0,32 Bb	0,81 Aa	0,65 Aa	0,59
<b>Média</b>	0,65	0,84	0,70	<b>0,73</b>
<b>C.V. (%)</b>	24,15			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

As plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.), apresentaram durante a fase de multiplicação, a necessidade de suplementação de sacarose no meio de cultura já que plantas sem fonte exógena de carbono apresentaram as menores médias para as variáveis avaliadas. O tipo de vedação e ambiente de cultivo não apresentaram diferença nesta fase para as diferentes variáveis avaliadas.

Para a fase de enraizamento, nas plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.), também foi evidenciado a necessidade do uso de uma fonte de carbono no meio de cultura. Notou-se também que o uso de membrana de polipropileno sem membrana associadas ao cultivo em casa de vegetação, foi capaz de gerar plantas de maior altura e número de folhas.

No final da fase de aclimatização, pode-se concluir que as plantas de abacaxizeiro cv. Pérola (*Ananas comosus* L.) não foram eficientes sob cultivo fotoautotrófico, porém apresentaram maior desenvolvimento e resposta fotossintética quando cultivadas sob cultivo fotomixotrófico. O tipo de vedação (com ou sem membrana) não apresentaram diferença para o crescimento ou resposta fotossintética. Plantas cultivadas em casa de vegetação obtiveram maior eficiência fotoquímica quando aclimatizadas em casa de vegetação, assim como maior acúmulo de biomassa, número de folhas, altura das plantas e acúmulo de biomassa para a parte aérea e radicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, C. C., Camara, T. R., Menezes, M., Willadino, L., Meunier, I., and Ulisses, C. (2000). Shoot tip *in vitro* culture of pineapple for fusarium elimination. *Shoot Tip in Vitro Culture of Pineapple for Fusarium Elimination*, 57(2), 363–366. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162000000200027>
- Almeida, W. A. B. D., Santana, G. S., Rodriguez, A. P., and Costa, M. A. P. D. C. (2002). Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24, 296-300.
- Alvard, D., Cote, F., and Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/bf00040116>
- Alves, J. P. (2021) Morfofisiologia do abacaxizeiro cv. Pérola em cultivo fotomixotrófico *in vitro* e em condição *ex vitro*. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Balsas – MA, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA 66p
- Atawia, A. R., Abd El-Latif, F. M., El-Gioushy, S. F., Sherif, S. S., and Kotb, O. M. (2016). Studies on micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research*, 5(2), 224-232.

- Bartholomew, D.P. (2008) Estimating plant weights. *Pineapple News* 15, 2–6. Available at: <http://www.ishhorticulture.org/workinggroups/pineapple/PineNews15.pdf>
- Bartholomew, D. P. (2014). History and perspectives on the role of ethylene in pineapple flowering. *Acta Horticulturae*, 1042, 269–283. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2014.1042.33>
- Barbosa R.R.N. (2016) Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF 84p
- Batista, D. S., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M. do, Saldanha, C. W., and Otoni, W. C. (2017). Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural*, 47(3). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr2015024>
- Be, L. V., and Debergh, P. C. (2006). Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). *South African Journal of Botany*, 72(2), 191-194.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreibers, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- Bussotti, F., Gerosa, G., Digrado, A., and Pollastrini, M. (2020). Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large scale plant ecological studies. *Ecological Indicators*, 108, 105686.
- Butcher, D., and Gouda, E. (2020). The new bromeliad taxon list. Utrecht: *The Netherlands: University Botanic Gardens*. Retrieved from <http://bromeliad.nl/taxonList/>
- Cabral, J. R. S., de Matos, A. P., and da Cunha, G. A. P. (1993). Selection of pineapple cultivars resistant to fusariose. *Acta Horticulturae*, (334), 53–58. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1993.334.5>

- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., and Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 1, 3–9. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&dq=intitle:Fisiolog?a+del+cultivo+in+vitro#0>
- Carvalho, A. C. P. P., De, Torres, A. C., Braga, E. J. B., De Lemos, E. E. P., Souza, F. V. D., Peters, J. A., ... and Câmara, T. R. (2011). Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 7(1), 30-60.
- Collins, J. L. (1949). History, taxonomy and culture of the pineapple. *Economic Botany*, 3(4), 335–359. Doi:10.1007/bf02859162.
- Cunha, G. A. P. (2005). Applied aspects of pineapple flowering. *Bragantia*, 64(4), 499–516.
- Couto, T. R., da Silva, J. R., de Oliveira Moraes, C. R., Ribeiro, M. S., Netto, A. T., Carvalho, V. S., and Campostrini, E. (2016). Photosynthetic metabolism and growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) cultivated *ex vitro*. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 28(3), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0062-x>
- Christen, D., Schonmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Defago, G. (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60:504-514.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., and Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39(6), 651–656. <https://doi.org/10.1079/IVP2003473>
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2022). Disponível em: <http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/pineapple/en/> Acesso em 28/10/2022

- Ferreira, L. S., Generoso, A. L., Carvalho, V. S., de Assis Figueiredo, F. A. M. M., Walter, R., Ferraz, T. M., ... and Campostrini, E. (2021). Better light spectral quality and thermal amplitude inside the greenhouse stimulate growth and improve acclimatization of *in vitro*-grown *Cattleya warneri* T. Moore. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 57(6), 883-896.
- Firoozabady, E., and Moy, Y. (2004). Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(1), 67–74. <https://doi.org/10.1079/IVP2003494>
- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., and Santamaría, J. M. (2007). Low exogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. *Acta Horticulturae* (Vol. 748, pp. 151–155).
- Guerra, M. P., Dal Vesco, L. L., Pescador, R., Schuelter, A. R., and Nodari, R. O. (1999). Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 1557-1563.
- Guimarães F. S. (2016) Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF 98p
- Hamad, A. M., and Taha, R. M. (2009). Effect of explants density on the *in vitro* proliferation and growth of separated and cluster shoots of Smooth Cayenne pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(4), 313–317. <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.313.317>
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108(2), 105-120.
- IBGE. Banco de Dados Agregados. Rio de Janeiro: SIDRA, 2015. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acesso em: 28 de abril. 2022.

- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., ... and Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 1-11.
- Krauss, B.H. (1948) Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr. I. Introduction, organography, the stem and the lateral branch or axillary buds. *Botanical Gazette* 110, 159–217.
- Lin, C. H., Maruthasalam, S., Shiu, L. Y., Lien, W. C., Loganathan, M., Yu, C. W., ... and Chen, Y. Y. (2007). Physical and chemical manipulation of flowering in pineapple. In *VI International Pineapple Symposium 822* (pp. 117-124).
- Maia, V. M., Oliveira, F. S., Pegoraro, R. F., Souza, B. A. M., Ferreira, L. B., and Aspiazú, I. (2016). Vegetative growth stages of irrigated 'Pérola' pineapple. *Acta Horticulturae*, (1111), 275–280. doi:10.17660/actahortic.2016.1111.39
- Martins, J. P. R., de Almeida Rodrigues, L. C., Santos, E. R., Gontijo, A. B. P. L., and Falqueto, A. R. (2020). Impacts of photoautotrophic, photomixotrophic, and heterotrophic conditions on the anatomy and photosystem II of *in vitro*-propagated *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Sm. (Bromeliaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 56(3), 350-361.
- Ming, R., VanBuren, R., Wai, C. M., Tang, H., Schatz, M. C., Bowers, J. E., Yu, Q. (2015). The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature Genetics*, 47(12), 1435–1442. <https://doi.org/10.1038/ng.3435>
- Moreira, M. A., Fraguas, C. B., de Carvalho, J. G., and Pasqual, M. (2007). Micropropagation of pineapple cv. Perola with urea as nitrogen source TT - Ureia como fonte alternativa de nitrogênio na micropropagação de abacaxizeiro cv. Pérola. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 29(Suppl. S), 689–693.
- Murashige T., and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497

- Niechayev, N. A., Pereira, P. N., and Cushman, J. C. (2019). Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM). *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 74-85.
- Oliveira-Cauduro, Y., Lopes, V. R., De Bona, C. M., de Alcântara, G. B., and Biasi, L. A. (2017). Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 12(2), 53.
- Omotoso, S. O. (2014). Performance of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) plantlets as influenced by types and weights of propagule. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 3(11), 373-378.
- Osmond, C. B. (1978). Crassulacean acid metabolism: A curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 379–414.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002115>
- Osmond, C. B., and Holtum, J. A. M. (1981). Crassulacean acid metabolism. In *Photosynthesis Academic Press*,. 283-328.
- Pereira, M. A. B., Siebeneichler, C. S., Lorençoni, R., Adorian, G. C., da Silva, J. C., Garcia, R. B. M., de Brito, R. F. F. (2009). Qualidade do fruto de abacaxi comercializado pela cooperfruto - Miranorte - To. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(4), 1048–1053.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-29452009000400018>
- Prakash, S., Hoque, M. I., and Brinks, T. (2004). Culture media and containers. *Low cost options for tissue culture technology in developing countries, FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna*, 29-40.
- Rabie, E. C., and Mbatha, B. W. (2016). Evaluation of the efficacy of Eclipse® in reducing sunburn in ‘Queen’ pineapple of South Africa. *Acta Horticulturae*, (1111), 241–248. doi:10.17660/actahortic.2016.1111.35

- Ramalho, A. R., Vieira Junior, J. R., Fernandes, C. D. F., Rocha, R. B., Marcolan, A. L., and Cassaro, J. D. (2009). Características das cultivares de abacaxizeiros cultivadas no estado de Rondônia. *Embrapa Rondônia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*. p. 1-6.
- Reinhardt, D. H., Cabral, J. R. S., da Silva Souza, L. F., Sanches, N. F., and De Matos, A. P. (2002). Pérola and Smooth Cayenne pineapple cultivars in the state of Bahia, Brazil: growth, flowering, pests, diseases, yield and fruit quality aspects. *Fruits*, 57(1), 43-53.
- Reinhardt, D. H. R. C., Bartholomew, D. P., Souza, F. V. D., de Carvalho, A. C. P. P., de Pádua, T. R. P., Junghans, D. T., de Matos, A. P. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018302>
- Reis, C. O. D., Silva, A. B. D., Landgraf, P. R. C., Batista, J. A., and Jacome, G. A. R. (2018). Bioreactor in the micropropagation of ornamental pineapple. *Ornamental Horticulture*, 24(2), 182-187.
- Saldanha, C.W., Otoni, C.G., Azevedo, J.L.F., Dias, L.L.C., do Rêgo, M.M., Otoni, W.C. (2012) 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*, 110(3):413–422.
- Sampaio, A. C., Fumis, T. D. F., and Leonel, S. (2011). Crescimento vegetativo e características dos frutos de cinco cultivares de abacaxi na região de Bauru-SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 816-822.
- Shamim, M., Kumar, M., Ranjan, T., Ranjan, R., Kumar, A. K. P., Kumar, V., Kumar, P. (2016). Importance of micropropagation in pineapple for disease free plantlets and rapid multiplication. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 359-362.
- Silva, A. D., Correa, V. R. S., Togoro, A. H., and Silva, J. D. S. (2014). Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. *Bioscience Journal*, 30(2), 380-386.

- Silva, A. B Da., Pasqual, M., De Castro, E. M., Ramos, J. D., Braga, F. T., and De Araújo, A. G. (2016). Luz natural, sacarose e fitorreguladores na anatomia foliar e crescimento *in vitro* de abacaxizeiro micropropagado. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 8(1-2), 1-9.
- Souza, E. H., Souza, F. V. D., Rossi, M. L., Packer, R. M., Cruz-Barros, A. A. V., and Martinelli, A. P. (2017). Pollen morphology and viability in bromeliaceae. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 3067–3082. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170450>
- Soneji, J. R., Rao, P. S., and Mhatre, M. (2002). *In vitro* regeneration from leaf explants of pineapple (*Ananas comosus* L, Merr). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 11(2), 117–119. <https://doi.org/10.1007/BF03263147>
- USDA, NRCS. The plants database, 2006. Disponível em: <http://plants.usda.gov> acessado em 16 de março de 2021
- Vettorazzi, R. G., Carvalho, V. S., Teixeira, M. C., Campostrini, E., Da Cunha, M., de Matos, E. M., and Viccini, L. F. (2019). Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. *Scientia Horticulturae*, 256, 108603.
- Winter, K., Sage, R. F., Edwards, E. J., Virgo, A., and Holtum, J. A. (2019). Facultative crassulacean acid metabolism in a C3–C4 intermediate. *Journal of Experimental Botany*, 70(22), 6571-6579.
- Xiao, Y., Niu, G., and Kozai, T. (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105: 149-158.
- Yadav, S., Nagaraja, T. E., Lohithaswa, H. C., and Shivakumar, K. V. (2019). Effect of temperature, humidity and light intensity on micropropagated sugarcane (*Saccharum Species Hybrid*) Genotypes. *Sugar Tech*. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00779-w>
- Zizka, A., Azevedo, J., Leme, E., Neves, B., da Costa, A. F., Caceres, D., and Zizka, G. (2020). Biogeography and conservation status of the pineapple family

(Bromeliaceae). Diversity and Distributions, 26(2), 183–195.  
<https://doi.org/10.1111/ddi.13004>