

**FONTES ALTERNATIVAS DE MINERAIS E SACAROSE NA
MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA**

FRANCIELLE DE SOUZA GUIMARÃES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO DE 2016**

**FONTES ALTERNATIVAS DE MINERAIS E SACAROSE NA
MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA**

FRANCIELLE DE SOUZA GUIMARÃES

“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.^a D.Sc. Virginia Silva Carvalho

Coorientador: D.Sc. Clayton Debiasi

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO DE 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

78/2016

Guimarães, Francielle de Souza

Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola / Francielle de Souza Guimarães. – Campos dos Goytacazes, 2016.

85 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Fitotecnia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Virginia Silva Carvalho.

Área de concentração: Produção vegetal.

Bibliografia: f. 66-76.

1. *Ananas comosus* 2. SAIS MINERAIS PA 3. AÇÚCAR CRISTAL 4. ADUBOS COMERCIAIS I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Fitotecnia II. Título

CDD 634.774

FONTES ALTERNATIVAS DE MINERAIS E SACAROSE NA
MICROPROPAGAÇÃO DO ABACAXIZEIRO CV. PÉROLA

FRANCIELLE DE SOUZA GUIMARÃES

“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 18 de fevereiro de 2016

Comissão Examinadora:

Fernanda Vidigal Duarte Souza (D.Sc., Biologia Celular e Recursos Genéticos) –
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Prof^a. Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

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

Prof^a. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

*Ao coração mais puro e grato que conheço. À minha irmã, Mariana.
A ponte para o meu passado e quem provavelmente irá me ajudar
no futuro. Com todo meu amor. Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me amparem nos momentos difíceis, me darem força interior para superar as dificuldades, mostrarem os caminhos nas horas incertas e me suprirem em todas as minhas necessidades.

À minha orientadora Prof.^a D.Sc. Virginia Silva Carvalho, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser exemplo de profissional e de mulher a qual sempre fará parte da minha vida.

Aos meus pais, Taylor e Vânia e à minha irmã, Mariana, pelo carinho, paciência e incentivo. Sempre será por vocês, sempre! Todo amor que houver nessa vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura e também ao Sr. Felipe da cidade de Marataízes, pela disponibilização das mudas de abacaxizeiro 'Pérola' para realização dos trabalhos.

Aos professores Dr. Almy Junior, Dr. Clayton Debiasi, Dra. Marta Freitas e Dra. Fernanda Vidigal pela colaboração no trabalho.

Aos meus amigos, Andressa Leal Generoso e Rafael Walter, que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos, muito obrigada. Levarei vocês comigo para o resto da vida!

Aos meus colegas de laboratório, que sempre estiveram do meu lado, dando força e apoio.

Às amigas: Amanda, Laís, Sara e Ana Luísa e ao amigo Wagner, pela presença constante e fundamental na minha vida.

Ao Setor de Nutrição Mineral de Plantas, pela ajuda na realização das análises nutricionais, em especial ao Sr. Acácio, pela boa vontade e ajuda na condução dos trabalhos.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal, por ter disponibilizado os equipamentos para as análises fisiológicas. À Luciene, por me ajudar na coleta dos dados e análise dos resultados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Importância econômica do abacaxizeiro para o estado do Rio de Janeiro	5
3.2. Abacaxizeiro: Origem, aspectos botânicos, propagação e cultivares	6
3.3. Micropropagação	10
3.3.1. Micropropagação do abacaxizeiro	11
3.3.2. Estado da arte na micropropagação do abacaxizeiro	12
3.4. Nutrição e parâmetros fisiológicos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Experimento I	19
4.1.1. Fase I: Estabelecimento <i>in vitro</i>	19
4.1.2. Fase II: Multiplicação <i>in vitro</i>	22
4.1.3. Análises estatísticas	23
4.2. Experimento II.....	23

4.2.1. Fase II: Multiplicação <i>in vitro</i>	24
4.2.2. Fase III: Enraizamento <i>in vitro</i> das brotações.....	25
4.2.3. Fase IV: Aclimatização das mudas.....	26
4.2.4. Análise estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Experimento I.....	30
5.1.1. Fase I: Estabelecimento <i>in vitro</i>	30
5.1.2. Fase II: Multiplicação <i>in vitro</i>	33
5.2. Experimento II.....	37
5.2.1. Fase II: Multiplicação <i>in vitro</i>	37
5.2.2. Fase III: Enraizamento <i>in vitro</i>	43
5.2.3. Fase IV: Aclimatização das mudas.....	54
6. CONCLUSÕES	63
6.1. Experimento I.....	63
6.2. Experimento II.....	63
RESUMO E CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICES.....	77

RESUMO

GUIMARÃES, Francielle de Souza. Eng. Agrônoma, M.Sc.. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2016. Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. Orientadora: Prof.^a D.Sc. Virginia Silva Carvalho. Coorientador: D.Sc. Clayton Debiasi.

A insuficiência de mudas de qualidade é uma restrição para um maior desenvolvimento da abacaxicultura. A obtenção das mudas é feita a partir de lavouras comerciais, o que não garante sua qualidade fitossanitária. A micropropagação, embora resolva o problema, ainda possui um alto custo, inviabilizando seu uso pelos produtores. Com o objetivo de contribuir para a produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, este trabalho propôs a substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal nos meios de cultura. Foram feitos dois experimentos, ambos em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas fontes de sais minerais (reagentes PA e adubos comerciais) e duas fontes de carbono (sacarose PA e açúcar cristal). No primeiro experimento, avaliou-se o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* a partir de gemas axilares de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola. No estabelecimento *in vitro* os explantes foram avaliados quanto à sobrevivência, à massa da matéria fresca e número de folhas. Na fase de multiplicação foram avaliados a massa da matéria fresca e o número de brotações por explante. A substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal no preparo do meio de cultivo não influenciou na micropropagação do abacaxizeiro 'Pérola,' na fase de

estabelecimento e multiplicação *in vitro*. No segundo experimento, avaliou-se a multiplicação, o enraizamento *in vitro* e a aclimatização das mudas oriundas de brotações já estabelecidas *in vitro*. Ao final da fase de enraizamento *in vitro*, 50% das mudas de cada tratamento foram avaliadas em relação às variáveis número de folhas, volume radicular, massa da matéria fresca total, massa da matéria seca da parte aérea, da raiz e total, fluorescência da clorofila *a*, intensidade de verde e análises nutricionais. O restante das mudas foi levado para aclimatização em casa de vegetação, onde permaneceram por 45 dias. A fase de aclimatização seguiu os mesmos tratamentos da etapa *in vitro*. Ao final desta fase foram feitas todas as avaliações supracitadas, acrescentando altura da planta e área foliar. A substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal no preparo do meio de cultivo não influenciou a micropropagação do abacaxizeiro 'Pérola' para a maioria das variáveis analisadas, na fase de multiplicação e enraizamento *in vitro* e após 45 dias de aclimatização. Os sais minerais comerciais e o açúcar cristal podem substituir satisfatoriamente a sacarose PA na propagação *in vitro* do abacaxizeiro 'Pérola'.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, sais minerais PA, açúcar cristal, adubos comerciais.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Francielle de Souza. Agronomist, M.Sc.. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2016. Alternative sources of mineral salts and sucrose in micropropagation of pineapple cv. Pérola. Adviser: Virginia Silva Carvalho. Co-Adviser: Clayton Debiasi.

The lack of quality seedlings is a constraint to further development of pineapple culture. Obtaining seedlings it is made from commercial crops, which does not guarantee their phytosanitary quality. The micropropagation, though solve the problem, also has a high cost, preventing its use by producers. In order to contribute to the production of plantlets of pineapple, this paper proposed the replacement of minerals PA by commercial fertilizers and sucrose PA for crystal sugar in the culture media. We made two experiments, both in factorial 2 x 2, two sources of minerals (PA reagents and commercial fertilizers) and two carbon sources (sucrose PA and crystal sugar). In the first experiment, we evaluated the establishment and multiplication *in vitro* from axillary buds of pineapple cv. 'Pérola'. In establishing *in vitro* explants were evaluated for survival, the fresh weight and number of leaves. In the multiplication phase were evaluated the fresh weight and the number of shoots per explant. The replacement of minerals for commercial fertilizers PA and PA sucrose by crystal sugar in the preparation of the medium did not influence the micropropagation of pineapple 'Pérola' in the establishment phase and *in vitro* multiplication. In the second experiment, the multiplication was evaluated, *in vitro* rooting and acclimatization of seedlings coming from shoots established *in vitro*. At the end of *in vitro* rooting phase, 50% of the seedlings of each treatment were

evaluated in relation to the number of leaves variables, root volume, mass of the total fresh matter, dry matter of shoot, root and total fluorescence chlorophyll *a*, intensity of green and nutritional analysis. The rest of the seedling was taken to acclimatization in the greenhouse, where they remained for 45 days. The acclimatization phase followed the same treatments *in vitro* step. At the end of this phase were made all the above ratings, adding plant height and leaf area. The replacement of minerals PA by commercial fertilizers and PA sucrose by crystal sugar in the preparation of the medium did not influence the micropropagation of pineapple 'Pearl' for most of the variables in the multiplication phase and *in vitro* rooting and after 45 days acclimatization. Commercial minerals and crystal sugar can satisfactorily replace sucrose PA *in vitro* propagation of pineapple 'Pérola'.

Keywords: *Ananas comosus*, PA minerals salts, crystal sugar, commercial fertilizers.

1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) é uma planta domesticada a partir da espécie selvagem *A. comosus* var. *ananassoides* no norte da América do Sul (Coppens D'eeckenbrugge e Duval, 2009). Entre sua domesticação e a conquista do continente americano, no século XV, esta espécie foi dispersa por toda América Tropical e parte da Subtropical. Quando houve o contato da espécie com os europeus existiu o interesse de comercializar a fruta com a Europa, primeiramente com o envio da fruta e da planta e depois, com o encurtamento das rotas comerciais, por meio de plantios fora das Américas (Patiño, 2002).

O Brasil, atualmente, é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma colheita que excede 40 milhões de toneladas anuais (Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2015). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de abacaxi, e em 2012, o País produziu 2.478.178 de toneladas do fruto.

A propagação de mudas do abacaxizeiro é feita de forma vegetativa, por meio de mudas denominadas coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão retiradas de lavouras comerciais (Pereira et al., 2006).

No entanto, o uso de mudas produzidas vegetativamente pode acarretar problemas para o plantio, devido à baixa qualidade fitossanitária que estas apresentam. Sendo assim, a micropropagação, também denominada de propagação vegetativa *in vitro*, apresenta-se como a aplicação mais prática e de maior impacto para o cultivo de mudas de abacaxizeiro por possibilitar a produção de mudas uniformes, com maior vigor, isentas de inúmeras pragas e doenças e

ainda por serem mais produtivas do que as convencionais (Grattapaglia e Machado, 1998).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos visando à micropropagação do abacaxizeiro com intuito de aperfeiçoar os protocolos existentes para esta cultura (Guerra et al., 1999; Praxedes et al., 2001; Teixeira et al., 2006; Costa et al., 2007; Athayde, 2012; Santos, 2012; Silva, 2013; Couto et al., 2014; Moraes et al., 2014; Mendes et al., 2015; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b; Pereira et al., 2015).

A técnica de micropropagação consiste na escolha do material vegetal, no seu estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* e, finalmente, na aclimatização das mudas formadas (González-Olmedo et al., 2005). O material vegetal a ser utilizado para o estabelecimento *in vitro* deve estar isento de doenças e pragas (Grattapaglia e Machado, 1990). É recomendável que se cultivem as plantas matrizes em condições controladas para garantir a qualidade fitossanitária do material de partida.

Para o êxito no estabelecimento do explante *in vitro*, alguns aspectos merecem atenção especial como: a idade fisiológica da planta matriz, além do tipo, tamanho e fase de desenvolvimento do explante a ser utilizado (Grattapaglia e Machado, 1998).

A fase de multiplicação tem como finalidade aumentar o número de brotações nos explantes. Esta é a fase de maior consumo de meio de cultura e de maior gasto de mão de obra (González-Olmedo et al., 2005).

Na fase de enraizamento das brotações, obtém-se a formação de uma planta completa (González-Olmedo et al., 2005).

Ao final do cultivo *in vitro*, as novas plantas formadas são aclimatizadas, ou seja, são adaptadas às condições *ex vitro*. As duas últimas fases podem ser fundidas em algumas culturas (Athayde, 2012).

Um dos fatores que dificultam a comercialização das mudas produzidas *in vitro* é o alto custo que as mesmas possuem ao final do processo quando comparadas com a muda produzida convencionalmente a campo.

Para que ocorra a diminuição de custos nas fases da micropropagação do abacaxizeiro, algumas soluções vêm sendo propostas como a redução de mão de obra com a utilização dos biorreatores (González-Olmedo et al., 2005) e redução de gasto de energia, com a utilização da luz natural (Braga et al., 2011). Com

relação ao meio de cultura para abacaxizeiro, a esterilização dos meios é alvo de pesquisas envolvendo, principalmente, o uso de agentes químicos como o hipoclorito de sódio, além da redução da sacarose no meio de cultura por meio do cultivo autotrófico (Teixeira et al., 2005; Teixeira et al., 2006; Mendes et al., 2015; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b; Pereira et al., 2015).

Outra forma de reduzir os custos no preparo dos meios de cultura para abacaxizeiro é substituir o ágar, principal agente geleificante e componente de maior custo do meio, por amidos de milho e mandioca (Costa et al., 2007; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b; Pereira et al., 2015).

Embora a sacarose também venha sendo substituída por outros componentes como açúcar cristal, rapadura e melado de cana-de-açúcar, na micropropagação da bananeira (Bernardi et al., 2004; Ribeiro et al., 2012; Ribeiro et al., 2013; Pereira, 2014), não há relatos na literatura para o abacaxizeiro.

Nos protocolos de micropropagação para abacaxizeiro, constata-se a predominância no uso de meio geleificado, utilizando-se sais minerais PA e sacarose PA (Albuquerque et al., 2000; Piza et al., 2001; Macêdo et al., 2003; Costa et al., 2007; Moraes et al., 2010; Athayde, 2012; Couto et al., 2014; Moraes et al., 2014).

Alguns autores, trabalhando com a micropropagação da bananeira, afirmam que determinados produtos utilizados no meio de cultura, como a sacarose PA e os sais PA podem ser substituídos nesta ordem por açúcar cristal ou melado de cana-de-açúcar e adubos comerciais, contribuindo para a diminuição dos custos (Ribeiro et al., 2012; Pereira, 2014). Na literatura ainda não há relatos quanto à substituição dos produtos PA pelos comerciais na micropropagação do abacaxizeiro.

Há um crescente interesse das biofábrica sem reduzir os custos de produção, conseqüentemente, reduzindo também o preço ofertado das mudas para os produtores. Assim sendo, este trabalho tem como objetivo estudar a substituição de sacarose PA e sais minerais PA por fontes comerciais de menor custo na micropropagação do abacaxizeiro 'Pérola'.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver meios de cultivo eficientes e de baixo custo para produção de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola micropropagadas, permitindo maior acesso dos produtores aos materiais propagativos de alta qualidade e por um preço mais acessível.

2.2. Específicos

- Avaliar a substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais no preparo dos meios de cultivo nas fases de estabelecimento do explante *in vitro*, multiplicação das brotações, enraizamento *in vitro* e aclimatização das mudas formadas;

- Avaliar a substituição da sacarose PA por açúcar cristal como fonte de carbono no preparo dos meios de cultivo nas fases de estabelecimento do explante *in vitro*, multiplicação das brotações, enraizamento *in vitro* e aclimatização das mudas formadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância econômica do abacaxizeiro para o estado do Rio de Janeiro

Conforme o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2015), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma colheita que excede 40 milhões de toneladas anuais.

Uma das culturas que contribuem para o crescimento econômico do país é o abacaxi. De acordo com a FAO, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de abacaxi. Em 2015, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), o país produziu 1.767.267 toneladas do fruto em uma área colhida de 67.027 ha.

Em território brasileiro, o Pará concentra a maior safra de abacaxi. Em 2014, o estado produziu 318 milhões de frutos em uma área colhida de 10.777 ha (IBGE, 2015). O município de Floresta do Araguaia, no estado do Pará, é o maior produtor do fruto no Brasil.

O estado do Rio de Janeiro é o segundo maior produtor da região Sudeste, atrás de Minas Gerais, com produção de 93,5 milhões de frutos, em uma área colhida de 4.121 ha, com rendimento médio de 29.285 frutos por hectare (IBGE, 2015). Apesar do estado do Rio de Janeiro ter pequena participação na produção brasileira de abacaxi, ele apresenta perfil adequado e condições climáticas bastante propícias ao cultivo dessa fruta (Ponciano et al., 2006).

A maioria dos frutos colhidos no estado do Rio de Janeiro é produzida na região Norte Fluminense, que contribui com 98% da área plantada no estado. Nessa região destacam-se os municípios de São Francisco do Itabapoana (4.000

ha plantados), São João da Barra (148 ha) e Campos dos Goytacazes (128 ha) (IBGE, 2010).

Segundo dados do censo agropecuário realizado pelo IBGE, São Francisco do Itabapoana é o principal produtor de abacaxi do Rio de Janeiro, sendo responsável por 73% da produção do estado (IBGE, 2014).

Um dos fatores que contribuiu para o aumento da produção no estado do Rio de Janeiro foi a abundante mão de obra, sobretudo a familiar, que substituiu as lavouras de cana de açúcar pelas lavouras de abacaxi (IBGE, 2014).

A região Norte Fluminense sobreviveu, durante várias décadas, subordinada à monocultura da cana-de-açúcar, porém políticas de incentivo ao “desenvolvimento” criaram novas motivações na produção de culturas agrícolas irrigadas. Neste sentido, o programa Frutificar foi criado no ano 2000, como caminho de desenvolvimento para a agricultura dos municípios do interior do Rio de Janeiro. Com isso, o pequeno agricultor da baixada campista, que por várias gerações envolveu-se com a produção da cana e atividades complementares, passou a inserir-se em um novo ciclo produtivo, o da fruta (Crespo, 2004).

3.2. Abacaxizeiro: Origem, aspectos botânicos, propagação e cultivares

O abacaxizeiro pertence à classe Liliopsida e é uma planta herbácea e perene, da família Bromeliaceae, cujo gênero mais importante e conhecido é o *Ananas*, no qual está inserido o abacaxi (*Ananas comosus* L Merr). A família Bromeliaceae destaca-se por ser um dos principais elementos da flora brasileira, com vários gêneros endêmicos, alguns deles encontrados somente na Mata Atlântica (Souza e Wanderley, 2007).

O abacaxi é originário da América do Sul e a expansão do seu consumo foi acontecendo em paralelo às expansões marítimas. Após chegar à América Central, o abacaxi foi disseminado pelo mundo durante as grandes navegações, passando pela África ocidental, via Tomé e Príncipe, África oriental, passando por Madagascar e, finalmente, chegando às Índias e, posteriormente, levado à Europa (Crestani et al., 2010). O centro de diversidade genética do abacaxi está localizado na região central da América do Sul, abrangendo o Brasil, o Paraguai e a região andina (Leal e Coppens d'Eeckenbrugge, 1996).

A planta de abacaxizeiro é composta por um caule curto e grosso, considerado como talo por alguns autores. Ao redor do caule, as folhas crescem formando calhas estreitas e bem rígidas. O sistema radicular do abacaxizeiro é fasciculado, normalmente superficial (de 0 a 30 cm do solo) e fibroso. Em variedades comerciais, a planta mede de 1,0 a 1,2 m de altura e de 1,0 a 1,5 m de diâmetro quando adulta. As folhas são classificadas de acordo com a posição e formato, sendo distribuídas em A, B, C, D, E e F, onde as folhas mais externas (A) são as mais velhas e a mais interna é a mais jovem (F). Para o manejo da cultura, a folha D é a mais importante por se tratar da mais jovem entre as folhas adultas e possuir metabólitos mais ativos (Figura 1A) (Reinhardt et al., 2002).

Em se tratando de propagação vegetativa, o abacaxizeiro produz muda do tipo filhote (brotações do pedúnculo), filhote-rebentão (brotação da inserção do pedúnculo no caule), rebentão (brotação do caule), da coroa (no ápice do fruto) (Figura 1B) e, também, por seccionamento do caule e cultura de tecidos (Simão, 1998; Coelho et al., 2009).

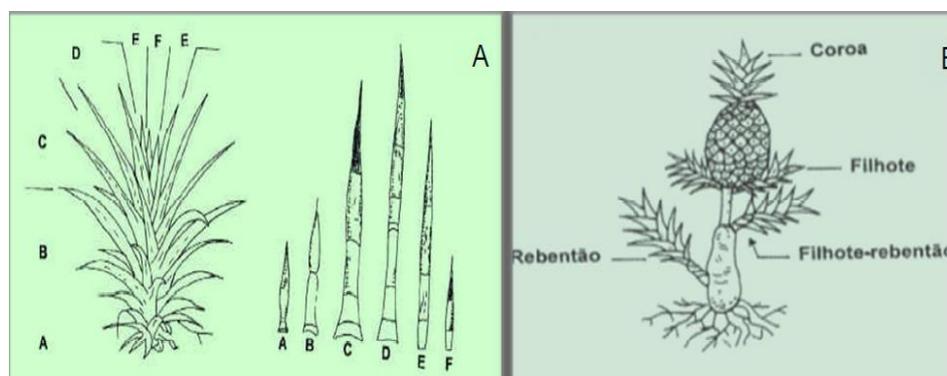


Figura 1. A - Distribuição das folhas do abacaxizeiro, de acordo com a idade (A – mais velha, F - mais jovem). B – Tipos de mudas utilizadas. Fonte: Cunha, 2003.

A planta possui três ciclos bem definidos, são eles: Fase vegetativa – também conhecida como crescimento vegetativo, que perdura do plantio à indução floral ou floração natural. Pode durar de 5 a 12 meses, variando conforme a variedade plantada e os tratamentos culturais administrados; Fase reprodutiva – ou formação do fruto, que dura de 5 a 6 meses; e fase propagativa – nesta fase, a produção das mudas do tipo filhote pode ir de 4 a 10 meses e as do tipo rebentão varia de 2 a 6 meses (Silva et al., 2004).

O fruto do abacaxizeiro é normalmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos fundidos entre si sobre o eixo central ou coração. A polpa geralmente apresenta cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, a massa média dos frutos gira em torno de um quilo, sendo 25% representado pela coroa. Essa coroa é formada por um tufo de folhas. Os rebentos ou mudas desenvolvem-se a partir de gemas axilares localizadas no caule (rebentões) e no pedúnculo (filhotes) (Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003).

As cultivares mais plantadas no mundo são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Spañola Roja, Pérola (Pernambuco) e Perolera. Cerca de 70% do plantio mundial é da cultivar Smooth Cayenne (Cunha, 2007).

As cultivares Smooth Cayenne e Pérola são as mais conhecidas e cultivadas no Brasil, ambas suscetíveis à fusariose, principal problema fitossanitário da cultura no País (Ramalho et al., 2009; Freitas et al., 2010).

A cultivar Smooth Cayenne possui frutos não adequados para o consumo *in natura*, pois a polpa apresenta elevada acidez. Contudo, os frutos são de ótimo tamanho e têm alta produtividade possuindo, assim, características propícias à industrialização (Cabral, 2000).

A cultivar Pérola é a mais plantada no Brasil, sendo a produção destinada principalmente para o consumo *in natura*, devido às suas qualidades organolépticas. Esta cultivar tem frutos menores que a cv. Smooth Cayenne que são levemente cônicos, variando de 1,0 a 1,5 kg, a polpa é branca e rica em suco, contendo elevado teor de açúcar e reduzida acidez (Cunha, 2007).

Algumas instituições de pesquisa, entre elas o INCAPER, IAC e a EMBRAPA, vêm lançando no mercado brasileiro novas cultivares resistentes a fusariose como as cultivares Vitória, IAC Fantástico e Imperial.

A cultivar Vitória foi desenvolvida pela EMBRAPA em parceria com o Instituto de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER, lançada em 2006, sendo originada do cruzamento entre 'Primavera' e 'Smooth Cayenne'. As plantas deste genótipo têm como vantagem a ausência de espinhos nas folhas, o que facilita os tratamentos culturais. A cv. Vitória produz frutos de excelente qualidade para o mercado e os mesmos apresentam polpa branca, elevados teores de açúcares (média de 15,8°Brix) e excelente sabor nas análises químicas e sensoriais. Os frutos obtidos podem ser destinados ao mercado de consumo *in natura* e para a agroindústria (Ventura et al., 2006).

A cultivar IAC Fantástico foi lançada pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC em 2010. A planta de abacaxizeiro cv. IAC Fantástico é bastante vigorosa, resistente à fusariose, e as folhas apresentam espinhos somente na extremidade da borda foliar. O fruto é de tamanho mediano a grande, a polpa é saborosa, doce (média > 16°Brix), pouco ácida e de coloração amarelo intenso, servindo para o consumo *in natura* ou para a agroindústria (Spironello et al., 2010).

A cultivar Imperial, um híbrido resultante do cruzamento de ‘Perolera’ com ‘Smooth Cayenne’, lançado em 2003, pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, apresenta frutos que possuem coloração amarela, teores de açúcar elevados e excelente sabor nas análises sensoriais. O abacaxizeiro ‘Imperial’ não possui espinhos nas folhas. As características sensoriais e físico-químicas são apropriadas tanto para o consumo *in natura*, quanto para a industrialização (Cabral e Matos, 2005; Viana et al, 2013).

Mesmo com a inserção de novas cultivares resistentes a fusariose no mercado brasileiro, a cultivar Pérola continua sendo a mais atrativa para o produtor, apresentando melhores características para as variáveis doçura, maciez, odor, baixa acidez e sabor agradável, quando comparada a outras cultivares, todos esses atributos fazem com que a cultivar seja a preferida pelo produtor brasileiro (Reinhardt et al., 2004; Miguel et al., 2007).

Para aumentar as chances de êxito na exploração comercial do abacaxizeiro cv. Pérola, é fundamental o uso de material propagativo de alta qualidade para que ocorra maior produção da fruta exigida pelo mercado. Um dos métodos que contribuíram para esse aumento de qualidade e de produção da fruta é a cultura de tecidos vegetais com o uso da técnica de micropropagação. As mudas micropropagadas apresentam alta qualidade genética e fitossanitária. Com isso, o elevado potencial de produção de mudas sadias de abacaxizeiro torna a micropropagação a principal tecnologia de produção de material propagativo, porém, o elevado custo de produção destas mudas ainda inviabiliza sua utilização pelos produtores.

3.3. Micropropagação

A micropropagação é uma das técnicas relacionadas à cultura de tecidos vegetais utilizadas para a rápida multiplicação de plantas e baseia-se na totipotencialidade das células, sendo sinônimo de propagação vegetativa *in vitro*. Essa técnica permite a obtenção de uma grande quantidade de plantas, utilizando pequena quantidade de material vegetal original, restringindo ou minimizando a limitação que a baixa oferta de mudas constitui para a expansão das culturas (Souza et al., 2009).

Em comparação com as técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, dentre as quais a possibilidade de propagar rapidamente em larga-escala novos genótipos, produzir mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, permite a produção de mudas de espécies que não podem ser propagadas por outros métodos e a obtenção de plantas livres de doenças (Souza et al., 2009).

A micropropagação convencional é feita utilizando-se recipientes contendo meio de cultura solidificado com ágar ou outros agentes geleificantes, sais minerais e sacarose como fonte de carbono para o metabolismo das plantas, além do emprego de lâmpadas fluorescentes que fornecem um fluxo de fótons fotossintéticos (Fuentes et al., 2007).

Na micropropagação, várias fases foram definidas. A primeira é a escolha e o preparo da planta-matriz para introdução do material *in vitro*. Em seguida, vem a iniciação das culturas, ou seja, o estabelecimento do material vegetal *in vitro*. A multiplicação das brotações consiste em promover a proliferação de brotos e aumentar o número de gemas nos explantes. A última fase *in vitro* é o enraizamento e alongamento das brotações para que as plantas desenvolvam sua capacidade fotossintética e sejam capazes de sobreviver em condições naturais (González-Olmedo et al., 2005).

Auxinas e citocininas são as classes de fitoreguladores mais utilizadas na fase *in vitro*. A relação auxina/citocinina regula a morfogênese em cultura de tecidos. De modo geral, na ausência de citocinina praticamente não se observa a ocorrência de divisão celular. Altos níveis de auxina em relação aos de citocinina promovem a formação de raízes, enquanto altos níveis de citocinina em relação aos de auxina estimulam a formação da parte aérea. Uma relação intermediária

favorece o crescimento do tecido não diferenciado, comumente referido como calo (Skoog e Miller, 1957).

Finalmente, a última fase da micropropagação é a aclimatização, que é a transferência das mudas para condições de casa de vegetação. Nessa fase, ocorre o processo de adaptação do organismo vegetal da condição *in vitro* para a *ex vitro*, ou seja, da condição de laboratório para a de casa de vegetação (González-Olmedo et al., 2005).

3.3.1. Micropropagação do abacaxizeiro

A micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa de plantas realizada *in vitro*, utilizando estruturas propagativas denominadas explantes. Os mais utilizados são ápices caulinares e segmentos nodais (Carvalho et al., 2011). Este método vem se tornando uma alternativa viável para a propagação do abacaxizeiro, pois produz mudas vigorosas, livres de patógenos, em larga escala, em curto período de tempo e em espaços reduzidos. As mudas podem ser multiplicadas em qualquer época do ano, proporcionando homogeneidade nos tratamentos culturais e colheita (González-Olmedo et al., 2005). Além disso, estas apresentam maior vigor e facilidade no transporte e plantio (Lemos et al., 2001).

Vários artigos vêm sendo publicados sobre a micropropagação do abacaxizeiro, destacando-se o de Rangan (1984) *apud* Guerra (1999), que estabeleceu um dos primeiros protocolos para esta cultura. De acordo com Souza et al. (2009), a técnica de micropropagação vem sendo utilizada para multiplicar o abacaxizeiro em escala comercial, principalmente as novas cultivares lançadas no mercado. A micropropagação permite a rápida multiplicação destas cultivares em comparação aos métodos convencionais de propagação (Smith et al., 2003).

Na micropropagação do abacaxizeiro, uma grande variedade de formulações de meio de cultura tem sido usada com relação ao estado físico do meio, composição de sais minerais, tipos de fitoreguladores utilizados, concentrações de sacarose, etc. (Barboza, et al., 2004; Silva et al., 2007; Guerra et al., 1999; Couto et al., 2014). Essas diferentes formulações utilizadas refletem a exigência específica dos genótipos e dos explantes.

Atualmente, o principal entrave para a utilização das mudas micropropagadas é o elevado custo de produção, o que, muitas vezes, inviabiliza a aquisição destas mudas pelos produtores rurais.

A micropropagação é uma técnica de elevado custo quando comparada a produção de mudas por outros métodos. Em alguns casos, o custo de produção é tão elevado que o custo unitário da planta torna-se inviável economicamente.

Estes custos são atribuídos principalmente à necessidade de mão de obra especializada, ao elevado custo de manutenção das salas de crescimento com condições ambientais controladas onde são mantidas as plantas *in vitro* (Xiao e Kozai, 2006; Houllou-Kidoet al., 2009), além do elevado custo dos reagentes utilizados nos meios de cultura.

Sendo assim, na tentativa de buscar protocolos eficientes e com custo reduzido para a micropropagação do abacaxizeiro, alguns autores testaram metodologias como: emprego de biorreatores como forma de reduzir os custos com mão de obra (Silva, 2006), modificações na composição do meio de cultivo (Pereira et al., 2015), enraizamento *ex vitro* (Athayde, 2012), adição de CO₂ no frasco de cultivo (Mendes et al., 2015).

Diante disso, para que o uso da micropropagação na produção de mudas de abacaxizeiro se torne mais viável, economicamente, vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando a redução nos custos de produção das mudas, com o objetivo de viabilizar a aquisição das mudas pelos produtores rurais.

3.3.2. Estado da arte na micropropagação do abacaxizeiro

A produção comercial de mudas *in vitro* movimenta bilhões de dólares em todo o mundo, notadamente na Alemanha, Holanda, Inglaterra, Índia, Estados Unidos, entre outros países (Cid, 2010). No Brasil, uma das principais limitações para o maior acesso dos produtores as mudas micropropagadas é o seu elevado custo, ainda muito superior ao das mudas obtidas pelos métodos convencionais (Rocha, 2009). Esses custos são devidos ao elevado nível de investimentos dos laboratórios em infraestrutura, mão de obra especializada, gastos com reagentes, energia elétrica e na fase final do processo com a aclimatização das mudas (Carvalho et al., 2011).

Dessa forma, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de aperfeiçoar e reduzir os custos de produção destas mudas (Pereira et al., 1999; Pereira e Fortes, 2003; Pinho, 2003; Teixeira et al., 2005; Teixeira et al., 2006; Pereira et al., 2015; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b).

Para que ocorra a diminuição nos custos nas etapas da micropropagação do abacaxizeiro algumas soluções vêm sendo propostas, tais como: o uso de biorreatores, que tem por objetivo reduzir a mão de obra e aumentar a eficiência da micropropagação (González-Olmedo et al., 2005). O emprego da luz natural (Braga et al., 2011) que reduz os gastos com energia elétrica e que apresenta grande potencial para melhorar as condições fisiológicas das mudas *in vitro*, tornando a fase de aclimatização menos estressante (Mendes et al., 2015).

Com relação ao meio de cultura para abacaxizeiro, pesquisas vêm sendo conduzidas com o intuito de minimizar o custo de produção. Normalmente a esterilização do meio é feita em autoclaves, processo físico bastante dispendioso e que contribui para elevar os custos do processo. Além do alto consumo de energia elétrica, as autoclaves são equipamentos caros e por isso a sua substituição por outros métodos de esterilização é alvo de pesquisas, envolvendo, principalmente, o uso de agentes químicos como o hipoclorito de sódio (Teixeira et al., 2005; Teixeira et al., 2006; Pereira et al., 2015; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b).

Outra forma de redução de custos no preparo dos meios de cultura para abacaxizeiro é substituir o ágar, principal agente geleificante e componente de maior custo do meio, por amidos de milho e mandioca. Diversos trabalhos retrataram que é possível utilizar estas substâncias para solidificar os meios de forma eficiente e sem ocasionar danos às mudas micropropagadas (Costa et al., 2007; Pereira et al., 2015; Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b).

A sacarose, principal carboidrato usado no meio de cultura para abacaxizeiro, vem sendo substituída por outros componentes como açúcar cristal, rapadura e melado de cana de açúcar em trabalhos com outras culturas (Bernardi et al., 2004; Ribeiro et al., 2012; Ribeiro et al., 2013; Pereira, 2014). Bernardi et al. (2004) e Pereira (2014), trabalhando com micropropagação de bananeira cv. Maçã e Williams, respectivamente, verificaram que a substituição da sacarose por açúcar cristal como fonte de carbono não interferiu no número de brotos emitidos e no

desenvolvimento das mudas. Estes autores destacam que a sacarose PA pode ser substituída pelo açúcar cristal, reduzindo assim os custos como meio de cultura.

Em relação aos sais minerais usados para o preparo dos meios de cultura, normalmente são utilizados sais PA. Esses sais são utilizados por conterem quantidades reduzidas de impurezas, que minimizam possíveis influências de outras substâncias químicas no crescimento das plantas. Entretanto, grande parte dos componentes dos meios de cultura é disponibilizada comercialmente na forma de adubos solúveis, apresentando a mesma concentração do nutriente que o meio de cultura requer e com menor preço (Ribeiro et al., 2012).

Nos casos específicos dos nitratos de potássio e de amônio PA, além de serem reagentes de custo elevado, podem ser utilizados na produção de explosivos, fato que torna sua aquisição para qualquer finalidade, inclusive para o preparo de meios nutritivos, dependente de autorização do Ministério da Defesa (Brasil, 2004). Além disso, reagentes com alto grau de pureza são indispensáveis apenas para estudos de algum fenômeno específico *in vitro*, para a produção comercial de plantas em laboratórios, tal grau de pureza pode não ser necessário (Prakash et al., 2004). Dessa forma, os adubos solúveis disponíveis no mercado, a princípio, podem ser usados na micropropagação no preparo dos meios de cultura.

Pereira (2014), trabalhando com a micropropagação da bananeira cv. Williams, estudou a substituição dos sais minerais PA normalmente usados nos laboratórios e biofábricas por adubos solúveis comerciais. Constatou-se que os sais minerais PA podem ser substituídos por produtos comerciais sem ocasionar danos ao crescimento e ao aparato fotossintético das mudas ao final da fase *in vitro* e da aclimatização.

Portanto, os adubos minerais solúveis e o açúcar cristal têm potencial para serem empregados no preparo dos meios de cultivo. Assim, devido à enorme demanda de meio de cultura nas biofábricas, a substituição dos sais PA por adubos solúveis comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal, colaboraria na redução do custo de produção de mudas micropropagadas.

Assim sendo, é de grande importância o desenvolvimento de estudos que foquem na substituição de componentes do meio de cultura por fontes de menor custo, que possa contribuir para a redução no preço das mudas micropropagadas de abacaxizeiro e viabilizar sua aquisição pelos produtores.

3.4. Nutrição e parâmetros fisiológicos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro

O estado nutricional do abacaxizeiro tem uma grande influência no crescimento da planta e, conseqüentemente, na produção e na qualidade do fruto (Malézieux e Bartholomew, 2003).

O abacaxizeiro é considerado exigente em nutrientes minerais, requerendo quantidades que a maioria dos solos cultivados não consegue preencher integralmente. Um dos principais fatores que influenciam o desempenho adequado do abacaxizeiro são a nutrição que as plantas requerem e a adubação que é fornecida (Crisóstomo, 2009).

A cultura do abacaxizeiro requer para o desenvolvimento e crescimento das plantas, quantidades diferenciadas de macronutrientes que em ordem decrescente são: potássio (K), nitrogênio (N), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e fósforo (P). Para os micronutrientes são: cloro (Cl), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) (Aquino et al., 1986; Malavolta et al., 1997; Souza, 1999; Gonçalves e Carvalho, 2000, Ramos et al., 2011).

De maneira geral, pode-se considerar que o N e K são os nutrientes mais absorvidos pelo abacaxizeiro. A influência do N é maior na massa do fruto e do K, na qualidade do fruto (Souza, 1999).

A maioria dos dados publicados sobre a utilização de nutrientes *in vitro* foi gerada a partir de culturas em suspensão de células (Dougall, 1980; MacCarthy et al., 1980; McDonalde Jackman, 1989; Dougall e Frazier, 1989). As informações sobre a absorção de nutrientes em culturas (brotações) *in vitro* são limitadas e por isso trabalhos que elucidem esses valores são de fundamental importância.

De acordo com Correia (2006), vários fatores influenciam diretamente na absorção dos nutrientes pelas plantas, tais como a concentração e a espécie química, na qual os nutrientes estão disponíveis. As formas de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) e nítrica (NO_3^-) são as mais comumente utilizadas *in vitro*.

Diferenças nas condições fisiológicas e ambientais entre plantas *in vitro* e *in vivo* interferem na absorção de nutrientes. Essas diferenças relacionam-se com o tipo de material vegetal, ou seja, o explante utilizado, as condições ambientais de cultivo, sejam elas em sala de crescimento ou casa de vegetação e a composição

química e física do meio de cultura que sofrerá alterações de acordo com a espécie cultivada (Correia, 2006).

Na produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro são utilizados meios de cultivo que são combinações de nutrientes minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e fitoreguladores, com ou sem um agente geleificante. Eles devem fornecer às culturas as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e a sua constituição é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas.

A maioria das pesquisas com cultivo *in vitro* tem utilizado o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), que se caracteriza por apresentar concentração iônica total elevada, pois os teores dos nutrientes do meio de cultura MS são maiores em comparação a outros meios de cultura (Leifert et al., 1995) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do meio de cultura de Murashige e Skoog (1962).

CONSTITUINTES	QUANTIDADE EM mmol L ⁻¹
	Inorgânicos
NH ₄ NO ₃	20,61
KNO ₃	18,80
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,99
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5
KH ₂ PO ₄	1,25
KI	0,005
H ₃ BO ₃	0,1
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,07
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 ⁻⁵
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5 ⁻⁵
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278
Na ₂ EDTA2.H ₂ O	0,0373

O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais usado na micropropagação do abacaxizeiro (Guerra et al., 1999; Almeida et al., 2002; Moreira et al., 2003; Pasqual et al., 2008; Scherer et al., 2013).

Segundo Prakash et al. (2004), a utilização de reagentes PA no preparo de meios nutritivos para o cultivo de plantas deve-se ao fato de conterem quantidades reduzidas de impurezas, o que reduz a influência de outras substâncias químicas no desenvolvimento das plantas cultivadas. Entretanto, grande parte dos componentes dos meios de cultura é disponibilizada comercialmente na forma de adubos minerais solúveis, apresentando a mesma concentração do nutriente e com baixo custo de aquisição. O mesmo acontece com a sacarose PA, em que um produto vendido facilmente como o açúcar cristal pode ser utilizado na preparação dos meios de cultura, reduzindo o preço final das mudas.

Os sais minerais comerciais e o açúcar cristal, utilizados como substitutos dos produtos PA, podem contribuir na redução do custo de produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro.

Os parâmetros fisiológicos mais descritos nos trabalhos são: fluorescência da clorofila *a* (valor F_v/F_m), intensidade de verde (valor SPAD) e índice fotossintético (PI).

A fluorescência da clorofila *a* tem sido utilizada no estudo do desempenho fotossintético das plantas, por ser um método muito sensível e não destrutivo que permite a análise qualitativa e quantitativa da absorção e do aproveitamento da energia luminosa pelo aparato fotossintético (Krause e Weis, 1991). Nessa avaliação são utilizados fluorômetros, cujas aplicações variam desde a rápida identificação de injúrias causadas ao aparato fotossintético, mesmo quando o sintoma ainda não é visível, até a análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta (Catunda et al, 2005).

Dados obtidos pela técnica de determinação da fluorescência sugerem que o principal alvo do dano fotoquímico é o fotossistema II (PSII). O decréscimo na razão fluorescência variável/ fluorescência máxima (F_v/F_m) é geralmente atribuído à inibição do centro de reação do PSII ou a redução da capacidade de transportar elétrons entre os fotossistemas. Isso protege o aparelho fotossintético dos possíveis danos, que possam ocorrer naturalmente, ou que sejam induzidos por fatores estressantes (Kolber et al., 1998).

O estresse oriundo das Interrelações das plantas com o meio ambiente pode, em várias situações, ser avaliado por meio da medição da fluorescência da clorofila *a*. Em plantas saudáveis e não estressadas, a relação F_v/F_m (rendimento quântico máximo do fotossistema II) tem valor aproximadamente de $0,80 \pm 0,05$. Todavia, quando as plantas se encontram sob condições adversas de meioambiente, essa relação decresce progressivamente (Jones, 1998).

Outro parâmetro também muito utilizado nas pesquisas com plantas é a determinação da intensidade de verde (SPAD). Um método, não destrutivo, chamado Clorofilômetro Soil Plant Analysis Development (SPAD, Minolta, Japão) é um dos mais utilizados atualmente. Trata-se de um equipamento portátil disponibilizado na década de 90 capaz de gerar grandezas relacionadas com os teores de clorofila, esse equipamento mede a transmissão de luz vermelha a 650 nm, quando ocorre absorção de luz pela molécula de clorofila, e de luz infravermelha, a 940 nm, sem absorção. Os valores obtidos são proporcionais ao teor de clorofila presente na folha (Markwell et al., 1995).

O índice fotossintético (PI), proposto por Strasser et al. (2000) tem sido considerado uma variável mais sensível que o F_v/F_m para, à maioria dos estresses abióticos e em diferentes culturas (Jiang et al., 2006, Christen et al., 2007). Enquanto a relação F_v/F_m reflete a máxima capacidade fotoquímica e se relaciona com o número de PSII ativos (Schreiber et al., 1986), a variável PI mostra a atividade do fotossistema I e II, servindo para detectar, de forma mais refinada, alterações no desempenho da planta sob condição de estresse que não causam modificações na relação F_v/F_m (Strasser et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento I

A etapa *in vitro* do experimento foi conduzida no Laboratório de Fitotecnia (LFIT), Setor de Horticultura do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ. O município situa-se na latitude 21°45'S e na longitude 41°20'W e possui altitude média de 11 metros.

4.1.1. Fase I: Estabelecimento *in vitro*

Mudas do tipo rebentão de *Ananas comosus* cultivar Pérola foram coletadas de abacaxizeiros cultivados no município de Marataízes – ES. O local situa-se na latitude 21°2'S e na longitude 40°49'W com uma altitude média de 19 metros. O material vegetal utilizado para o estabelecimento *in vitro* foram gemas axilares com aproximadamente 0,5 cm.

As mudas do tipo rebentão tiveram suas folhas mais externas retiradas e após este processo passaram por uma pré-limpeza, que constituiu na lavagem em água corrente com algumas gotas de detergente comercial por 20 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os caules (talos) foram desinfetados em álcool 70% (v/v) por um minuto, logo depois imersos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% (100 mL) com quatro gotas de Tween por 15 minutos e lavados em água desionizada autoclavada, por três vezes.

Em condições assépticas as gemas axilares (0,5 cm) foram retiradas dos caules (talos) com o auxílio de um bisturi e cultivadas *in vitro*. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 x 2, sendo duas fontes de sais minerais e duas fontes de carbono.

Tratamentos:

T1 – Meio MS com sais minerais PA + sacarose PA (controle);

T2 - Meio MS com sais minerais PA + açúcar cristal;

T3 - Meio MS com sais minerais comerciais + sacarose PA;

T4 - Meio MS com sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Os meios de estabelecimento dos explantes foram compostos pelos sais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ da fonte de carbono, 4,44 µmol L⁻¹ de 6-benziladenina (BA) e 8,40 µmol L⁻¹ de ácido 3-indolacético (AIA) solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®) e pH 5,7 aferido antes da adição do ágar. Foram utilizadas duas fontes de sais minerais no experimento, seguindo as mesmas proporções do meio MS: sais minerais PA e sais minerais comerciais (Tabela 2). Como fonte de carbono, foram utilizadas sacarose PA e açúcar cristal (Paineiras®). Foram colocados 10 mL de meio em tubos de ensaio (18x180mm), que posteriormente foram submetidos à esterilização em autoclave a 1,0 atm a 121°C por 15 minutos. No total foram inoculadas 100 gemas axilares por tratamento, cada gema foi acondicionada em um tubo de ensaio.

Os tubos com as gemas axilares foram mantidos em sala de cultivo à temperatura de 27 ± 2°C e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (OSRAM®, luz do dia) e fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro).

Tabela 2. Relação dos sais PA e dos produtos comerciais utilizados no preparo dos meios de cultivo para estabelecimento e multiplicação *in vitro* das brotações de abacaxizeiro, com as respectivas concentrações.

Elemento	Concentração			Fonte		Composição % dos nutrientes
	mmol L ⁻¹	Sais PA (g L ⁻¹)	PC (g L ⁻¹)	Meio MS	PC	
N	41,20 de N	1,6500	0,9220	NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amônio*	100% NH ₄ NO ₃
P	1,25	0,1700	0,1480	KH ₂ PO ₄	FertiMAP*	12% N e 60% P ₂ O ₅
K	18,80	1,9000	1,9700	KNO ₃	FertiNK*	45% K ₂ O e 12% N
Mg/S	1,50	0,3700	0,4050	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio*	9% Mg e 11,9% S
Ca	3,00	0,4400	0,4400	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio**	27% Ca e 21% Cl
B	0,10.10 ⁻³	0,0062	0,0064	H ₃ BO ₃	FertiBOR O*	17% B

Fonte: Pereira (2014). MS: Meio de cultivo Murashige e Skoog (1962); PC: Produto comercial; Sais PA: Sais puros para análise utilizados no preparo dos meios de cultivo convencionais. * Marca Heringer, ** Marca Calciosol.

Após 30 dias, as gemas foram avaliadas quanto à sobrevivência (porcentagem de explantes vivos). Em seguida, as gemas axilares que sobreviveram foram transferidas para frascos de cultivo de 65 x 125 mm com 40 mL de meio de estabelecimento, seguindo os mesmos tratamentos já citados. O experimento foi conduzido em DIC com seis repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco contendo quatro explantes, totalizando 24 explantes por tratamento.

Após 60 dias do início do estabelecimento *in vitro*, as brotações formadas foram avaliadas quanto à massa da matéria fresca total e o número de folhas e foram transferidas para o meio de multiplicação.

4.1.2. Fase II: Multiplicação *in vitro*

A multiplicação *in vitro* também seguiu o delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 x 2, sendo duas fontes de sais minerais e duas fontes de carbono, com quatro repetições constituídas por um frasco contendo quatro brotações, totalizando 16 explantes por tratamento.

Os meios de multiplicação foram compostos pelos sais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ da fonte de carbono, 4,44 µmol L⁻¹ de BA e 2,69 µmol L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), e pH 5,7 aferido antes da adição do ágar. Foram utilizadas duas fontes de sais minerais no experimento, seguindo as mesmas proporções do meio MS: sais minerais PA e sais minerais comerciais (Tabela 2). Como fonte de carbono, foram utilizadas sacarose PA e açúcar cristal (Paineiras®). Foram colocados 40 mL de meio em frascos de cultivo de 65 x 125 mm, que posteriormente foram submetidos à esterilização em autoclave a 1,0 atm a 121°C por 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram retiradas dos frascos com meio de estabelecimento. Foram retirados 2/3 de cada folha deixando as brotações com cerca 1,0 cm de altura. Este procedimento foi realizado cuidadosamente para que não ocorressem danos às gemas axilares que formariam as novas brotações. Objetivando favorecer o desenvolvimento de brotações laterais, foi realizada a quebra da dominância apical das brotações. Este procedimento foi feito por meio da inserção da lâmina do bisturi no centro da brotação, no sentido vertical, de modo a destruir o meristema apical. Feito este procedimento, o material foi pesado em balança de precisão e foram colocadas quatro brotações em cada frasco com o meio de multiplicação e vedado com tampa de polipropileno.

Os frascos com as brotações foram mantidos na sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2°C e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes (OSRAM®, luz do dia) e fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro).

Em câmara de fluxo laminar, os frascos foram abertos e as brotações contadas, pesadas em balança de precisão e, em seguida, individualizadas com auxílio de bisturi. Objetivando favorecer o desenvolvimento de brotações laterais, foi realizada a quebra da dominância apical das brotações como anteriormente descrito. Após ser feito o corte de folhas e de raízes, as brotações foram pesadas novamente para avaliar o seu crescimento entre os subcultivos.

Foram realizados três subcultivos com intervalos de 30 dias, sendo avaliados a massa da matéria fresca e o número de brotações por explante a cada intervalo de tempo.

4.1.3. Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento I foram submetidos às pressuposições para análise da variância, averiguando-se a normalidade e homogeneidade pelos testes de Shapiro Wilk e Bartlett, respectivamente. Não havendo restrições, a análise de variância foi realizada de acordo com os delineamentos anteriormente descritos e os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2011).

Para as médias referentes ao número de brotações na etapa *in vitro* (fase de multiplicação), optou-se pela análise descritiva com médias e intervalo de confiança.

Para os dados de massa da matéria fresca aos 60 dias de estabelecimento *in vitro*, foram realizadas as transformações dos dados - Raiz quadrada de $Y + 0.5$ - $\text{SQRT}(Y + 0.5)$, pois estes não atenderam às pressuposições de normalidade e homogeneidade das variâncias. Esses dados foram reconvertidos para apresentação no texto.

4.2. Experimento II

A etapa *in vitro* do experimento foi conduzida no Laboratório de Fitotecnia (LFIT), Setor de Horticultura. A aclimatização foi realizada em casa de vegetação com cobertura de plástico (100 μm) e Sombrite® 35% na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ. O município situa-se na latitude 21°45'S e na longitude 41°20'W e possui altitude média de 11 metros.

4.2.1. Fase II: Multiplicação *in vitro*

As brotações de abacaxizeiro cv. Pérola foram provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura, situada na cidade de Cruz das Almas – BA e estavam no primeiro subcultivo *in vitro*.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 x 2, sendo duas fontes de sais minerais e duas fontes de carbono, com 10 repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco contendo quatro brotações, totalizando 40 explantes por tratamento.

Os meios de cultivo foram compostos pelos sais de MS e vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ da fonte de carbono, 4,44 µmol L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BA) e 2,69 µmol L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA), solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec®), e pH 5,7 aferido antes da adição do ágar. Foram utilizadas duas fontes de sais minerais no experimento, seguindo as mesmas proporções do meio MS: sais minerais PA e sais minerais comerciais. Como fonte de carbono, foram utilizadas sacarose PA e açúcar cristal (Paineiras®).

Tratamentos:

T1 – Meio MS com sais minerais PA + sacarose PA (controle);

T2 - Meio MS com sais minerais PA + açúcar cristal;

T3 - Meio MS com sais minerais comerciais + sacarose PA;

T4 - Meio MS com sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Foram colocados 40 mL de meio em frascos de cultivo de 65 x 125 mm que, posteriormente, foram submetidos à esterilização em autoclave a 1,0 atm por 121° C durante 20 minutos.

A relação dos sais do meio de cultivo MS e dos adubos comerciais utilizados, com as respectivas concentrações, está descrita na Tabela 2.

Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram retiradas dos frascos de origem e separadas. Foram retiradas 2/3 de cada folha deixando as brotações com cerca 1,0 cm de altura. Este procedimento foi realizado cuidadosamente para que não ocorressem danos às gemas axilares que formam as novas brotações. Após a limpeza, o material foi pesado em balança de precisão e foram colocadas quatro brotações em cada frasco com o meio de multiplicação que, posteriormente, foi tampado com tampa de polipropileno.

Os frascos com as brotações foram mantidos na sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (OSRAM®, luz do dia) e fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro).

Em câmara de fluxo laminar, os frascos foram abertos e as brotações contadas, pesadas em balança de precisão e, em seguida, individualizadas com auxílio de bisturi. Objetivando favorecer o desenvolvimento de brotações laterais, foi realizada a quebra da dominância apical das brotações. Este procedimento foi feito por meio da inserção da lâmina do bisturi no centro da brotação, no sentido vertical, de modo a destruir o meristema apical.

Após o corte de folhas e de raízes, as brotações foram pesadas novamente para avaliar o seu crescimento entre os subcultivos.

Foram realizados três subcultivos com intervalos de 30 dias, sendo avaliados a massa da matéria fresca e o número de brotações por explante a cada intervalo de tempo.

4.2.2. Fase III: Enraizamento *in vitro* das brotações

Após os três subcultivos as brotações formadas foram transferidas para o meio de enraizamento, de mesma composição que o meio de multiplicação, exceto pela ausência dos fitoreguladores.

A etapa de enraizamento foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, mantendo o esquema fatorial 2×2 , com 10 repetições, cada uma sendo constituída por um frasco com quatro brotações. Os tratamentos foram os mesmos da etapa de multiplicação.

Em câmara de fluxo laminar, as brotações foram retiradas do meio de multiplicação, separadas e pesadas. Os frascos com as brotações foram levados para sala de crescimento, nas condições anteriormente descritas, onde permaneceram por 30 dias.

Ao final da fase de enraizamento *in vitro*, 50% das mudas de cada tratamento foram avaliadas em relação às variáveis: produção de massa da matéria fresca durante os 30 dias de enraizamento *in vitro* (g), número de folhas, volume radicular (mL), massa da matéria fresca total (g), massas da matéria seca da parte aérea (g), das raízes (g) e total (g), fluorescência da clorofila *a*, índice de verde e análises nutricionais.

4.2.3. Fase IV: Aclimatização das mudas

Após os trinta dias em meio de enraizamento *in vitro*, os 50% restantes das mudas de cada tratamento foram aclimatizadas em casa de vegetação nas condições descritas anteriormente.

O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados com os quatro tratamentos já citados e quatro repetições, sendo cada parcela constituída de cinco plantas.

As mudas foram retiradas dos frascos e lavadas cuidadosamente para remoção dos resíduos de meio de cultivo aderido ao sistema radicular.

As mudas foram plantadas em bandejas de polipropileno, com 15 células de aproximadamente 90 cm³, usando o substrato Basaplant Hortaliças® que contém turfa, casca de pinus, carvão, vermiculita e adubação inicial com NPK e micronutrientes. Quinze dias após o plantio, as mudas foram adubadas com 3,0 mL por planta de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) (apud RESH, 1997). Este procedimento foi repetido semanalmente com auxílio de uma pipeta. As mudas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada, sendo as plantas regadas duas vezes a cada 24 horas.

Após quarenta e cinco dias, foram avaliados: taxa de sobrevivência (%), número de folhas, altura das plantas (cm), fluorescência da clorofila *a*, índice de verde, área foliar (mm²), massa da matéria fresca total (g), massa da matéria seca da parte aérea (g), da raiz (g) e total (g), volume radicular (mL) e análise nutricional.

Produção de massa da matéria fresca durante os 30 dias de enraizamento *in vitro*

Esta variável foi determinada pela diferença entre a massa da matéria fresca das plantas formadas, ao final de 30 dias de enraizamento *in vitro* e a massa da matéria fresca das brotações, ao final da fase de multiplicação (tempo zero do enraizamento).

Determinação da fluorescência da clorofila a

A fluorescência da clorofila a foi determinada por meio de um fluorímetro não-modulado, modelo Pocket PEA Chlorophy II Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk).

Com o auxílio de pinças, uma folha de cada planta foi adaptada ao escuro por 30 minutos para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos” e a perda de calor fosse mínima. Todas as medições foram realizadas entre 9h e 10h da manhã. A fluorescência inicial (F_0) foi obtida com luz modulada de baixa intensidade ($< 0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para não induzir efeito na fluorescência variável. A fluorescência máxima (F_m) foi determinada por um pulso de luz saturante de 0,3 s de duração, com frequência de 20000 Hz. A fluorescência variável (F_v) foi determinada pela diferença entre F_0 e F_m . Esse pulso permite o fechamento dos centros de reação do PSII. Com os valores de F_v e F_m , foi obtida a relação F_v/F_m .

Determinação do índice de verde

O índice de cor verde das folhas foi determinado por meio do medidor portátil de clorofila modelo SPAD-502 (Minolta, Japão). As medições foram feitas em cinco diferentes pontos do limbo foliar, direcionados a parte mediana evitando-se as nervuras e as extremidades da folha.

Determinação da altura da planta

Para a determinação da altura das plantas, utilizou-se um paquímetro digital (Santec®), sendo as medições sempre realizadas a partir da base da planta.

Determinação da área foliar

A área foliar foi medida com o auxílio do aparelho modelo Licor 3100, cuja leitura se dá em tempo real, ou seja, a área é medida no momento em que a folha passa pelo sensor. Seu visor apresenta medidas de no mínimo $1,0 \text{ mm}^2$ e resolução de até $0,1 \text{ mm}^2$ (LI-COR, 1996).

Determinação do volume de raízes

A determinação do volume foi realizada colocando-se as raízes em proveta graduada, contendo um volume conhecido de água. Pela diferença, obteve-se a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades ($1\text{ mL} = 1\text{ cm}^3$), segundo metodologia descrita por Basso (1999).

Determinação da massa da matéria fresca

A massa da matéria fresca foi realizada pela pesagem das plantas em balança analítica (Bel Engineering®) logo após terem sido retiradas dos frascos de cultivo (etapa *in vitro*) e da casa de vegetação (aclimatização).

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 se atingisse massa constante. Em seguida foram pesadas em balança de precisão.

Análises nutricionais

Após a secagem, as folhas foram maceradas, com o auxílio de um almofariz. Em seguida, o material moído foi submetido à digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio para a determinação do teor de nitrogênio (N) pelo método de Nessler (Malavolta et al., 1997).

Para a determinação dos teores de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e boro (B), o material foi submetido à uma pré-digestão com 2,0 mL de ácido nítrico (65%) e 2,0 mL de peróxido de hidrogênio (30%) por pelo menos quatro horas. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por uma hora, com aumento gradual da temperatura em aproximadamente 20°C por hora, até atingir 160°C . Alcançada esta temperatura, foi deixado evaporar todo o líquido e em seguida foram adicionados 10,0 mL de ácido nítrico 0,5%. Os tubos foram agitados e, após 24 horas de repouso, o sobrenadante foi coletado para

quantificação dos teores de nutrientes em ICPE-9000 (Plasma Atomic Emission Spectrometer) (Peters, 2005). Foram feitas amostras constituídas de quatro mudas (repetições) por tratamento para a análise. Foram pesados 100 mg de cada amostra.

4.2.4. Análise estatística

Os dados obtidos no experimento 2 foram submetidos às pressuposições para análise da variância, averiguando-se a normalidade e homogeneidade pelo teste de Shapiro Wilk e Batlet, respectivamente. Não havendo restrições, a análise de variância foi realizada de acordo com os delineamentos anteriormente descritos e os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2011).

Para as médias referentes ao número de brotações na fase *in vitro* (etapa de multiplicação), massa da matéria seca da raiz (análises biométricas-fase *in vitro*) e fluorescência da clorofila *a* – F_v/F_m (aclimatização), optou-se pela análise descritiva com médias e erro padrão.

Para os dados de índice fotossintético (fase *in vitro*) e massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total, área foliar e índice fotossintético (aclimatização), foram realizadas as transformações dos dados - Raiz quadrada de $Y + 0,5$ - $\text{SQRT}(Y + 0,5)$, pois estes não atenderam às pressuposições de normalidade e homogeneidade das variâncias. Esses dados foram reconvertidos para apresentação no texto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I

5.1.1. Fase I: Estabelecimento *in vitro*

Na fase de estabelecimento das gemas axilares, oriundas de mudas do tipo rebentão de lavouras comerciais, a porcentagem de sobrevivência dos explantes de todos os tratamentos foi baixa. A maior porcentagem de sobrevivência foi encontrada no tratamento que apresentava os sais e a sacarose PA (T1) (34%), seguida do tratamento com sais comerciais e sacarose PA (T3) (30%), ficando os tratamentos com sais PA e açúcar cristal (T2) e sais comerciais e açúcar cristal (T4) com a mesma porcentagem (24%).

Nesta fase, foi observado um maior número de gemas oxidadas e mortas do que contaminadas. A concentração de NaClO utilizada na desinfestação das gemas axilares (2,5%) pode ter sido excessiva para estes explantes. Piza et al. (2001) obtiveram 97,2% de descontaminação de gemas axilares de abacaxizeiro em água sanitária comercial (Q-Boa[®]) a 20% e apenas 12,90% de gemas oxidadas e mortas. Domini et al. (2005) recomendam que seja utilizada uma solução de NaClO com a menor concentração possível de cloro ativo, para evitar danos ao tecido do explante. Neste trabalho, por terem sido utilizadas mudas oriundas de uma lavoura comercial de abacaxizeiro, optou-se por um método mais drástico de desinfestação que, embora tenha reduzido a contaminação, foi excessivo, levando a oxidação e morte das gemas axilares.

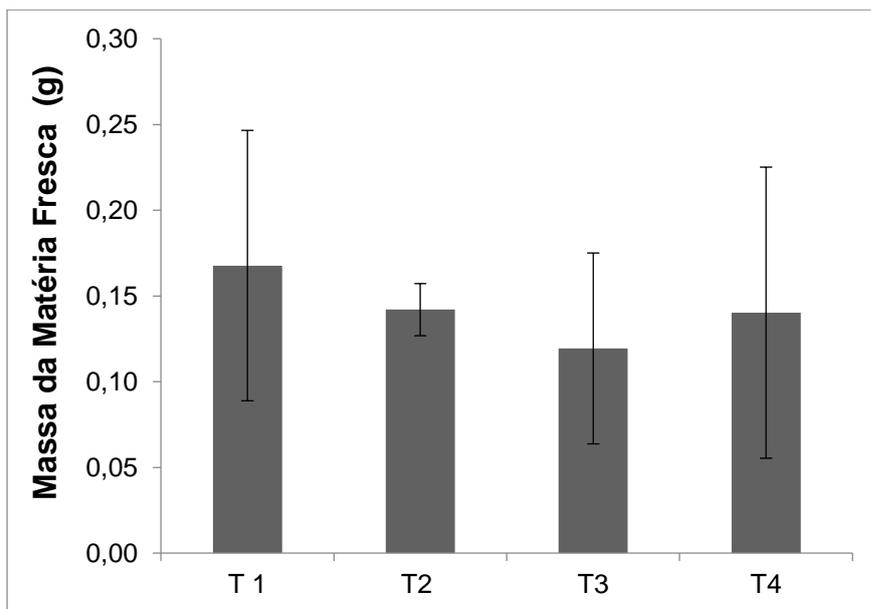
Após sessenta dias de estabelecimento *in vitro*, foi possível observar que os fatores sais minerais e sacarose não apresentaram significância para as variáveis massa da matéria fresca e número de folhas e que não houve interação entre eles (Tabela 3). Este resultado indica que os adubos comerciais e o açúcar cristal podem substituir os sais e a sacarose PA, sem prejuízo para o estabelecimento *in vitro* das gemas axilares de abacaxizeiro cv. Pérola.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as variáveis massa da matéria fresca (MF) (g) e número de folhas (NF) em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', após 60 dias de estabelecimento *in vitro*, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		MF	NF
Sais (S)	1	0,0027 ^{ns}	0,5859 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	0,0001 ^{ns}	0,2109 ^{ns}
S x Sac	1	0,0028 ^{ns}	0,0651 ^{ns}
Resíduo	20	0,0056	1,0286
Média geral		0,1401	6,5729
C.V. (%)		30,08	15,43

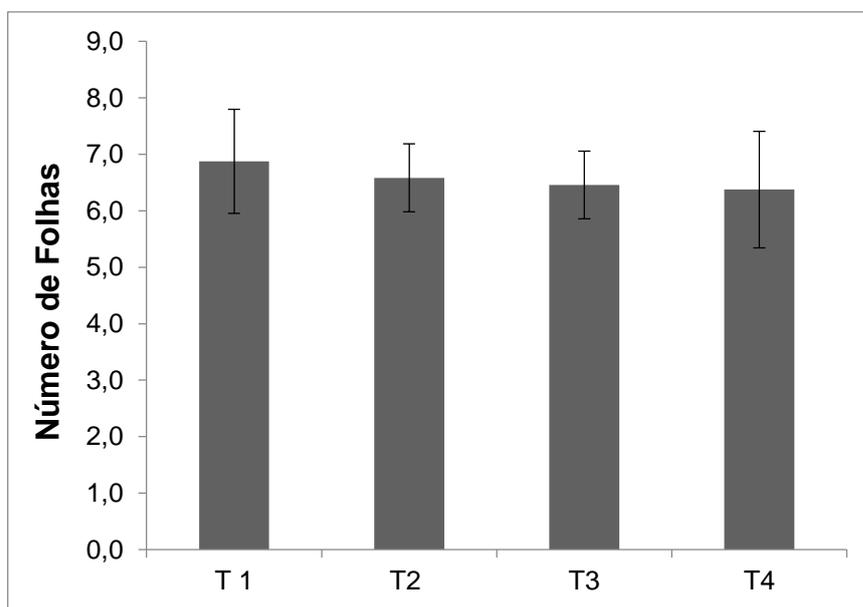
^{ns} – Não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$)

Nas Figuras 2 e 3, é possível visualizar as médias e os intervalos de confiança para as variáveis massa da matéria fresca e número de folhas após os 60 dias de estabelecimento *in vitro*.



Legenda: T1 – sais minerais PA + sacarose PA; T2 - sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 2. Médias e intervalos de confiança para massa da matéria fresca (g) de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 60 dias de estabelecimento *in vitro*. DMS= 0,0676



Legenda: T1 – sais minerais PA + sacarose PA; T2 - sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura3. Médias e intervalos de confiança para número de folhas de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 60 dias de estabelecimento *in vitro*. DMS= 0,8637.

Na literatura não foram encontrados trabalhos visando a substituição dos sais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal, na fase de estabelecimento *in vitro* do abacaxizeiro. A substituição da sacarose PA nesta fase foi investigada em alguns trabalhos com outras culturas como mandioca (Santana et al., 2009) e banana (Ribeiro et al., 2012). Em ambas as culturas, a sacarose PA foi substituída por melado de cana-de-açúcar, com resultados discrepantes. O melado apresentou resultados semelhantes à sacarose PA, com relação às variáveis matéria fresca e número de folhas, na fase de estabelecimento da mandioca, mas apresentou resultados inferiores para a bananeira cv. Maçã.

5.1.2. Fase II: Multiplicação *in vitro*

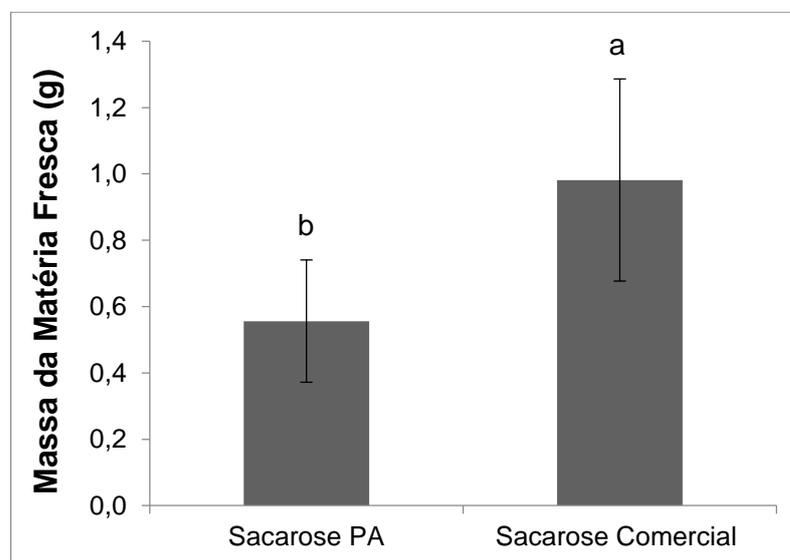
Durante a fase de multiplicação, as brotações foram avaliadas quanto à massa da matéria fresca e número de novas brotações formadas a cada um dos três subcultivos realizados em intervalos de 30 dias. De acordo com a análise de variância é possível observar que os sais minerais não apresentaram significância para a variável massa da matéria fresca em nenhum dos subcultivos. Em relação à sacarose, houve significância para massa da matéria fresca após 30 dias de cultivo. Não houve interação entre os fatores sais minerais e sacarose (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para a variável massa da matéria fresca (g) em função das fontes de sais e sacarose usados no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', em três subcultivos realizados a cada 30 dias, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		1º Subcultivo	2º Subcultivo	3º Subcultivo
Sais (S)	1	0,3278 ^{ns}	0,5416 ^{ns}	0,0370 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	0,7235*	0,6095 ^{ns}	0,1409 ^{ns}
S x Sac	1	0,1471 ^{ns}	0,7623 ^{ns}	0,0732 ^{ns}
Resíduo	12	0,1147	0,1802	0,0744
Média geral		0,7689	0,7664	0,7191
C.V. (%)		44,04	55,39	37,94

^{ns} – Não significativo pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

A sacarose comercial proporcionou maior massa da matéria fresca das brotações apenas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, igualando-se a sacarose PA aos 60 e 90 dias (Tabela 4 e Figura 4).

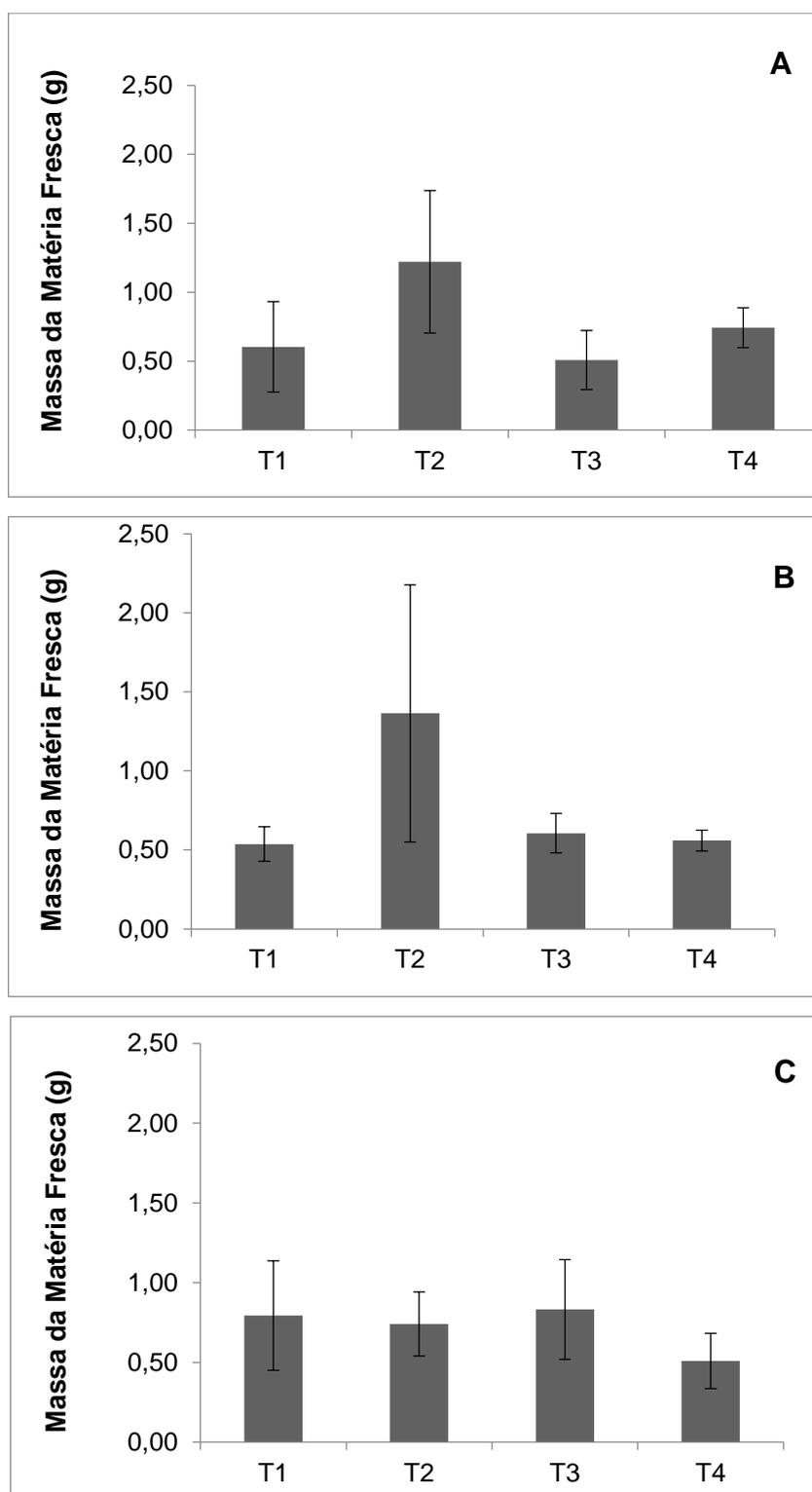


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Figura 4. Massa da matéria fresca (g) e intervalo de confiança em mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 30 dias de cultivo *in vitro*. DMS= 0,3689.

Para melhor visualização dos resultados, a Figura 5 mostra o crescimento das brotações de acordo com os tratamentos nos três subcultivos realizados. Os resultados indicam que os adubos comerciais e o açúcar cristal usados no preparo do meio de cultivo não interferiram na variável massa da matéria fresca. Pereira (2014) também buscou substituir as fontes de sais minerais PA por adubos comerciais e a sacarose PA por açúcar cristal na micropropagação da bananeira cv. Williams. E assim, como na presente pesquisa, as fontes alternativas utilizadas não prejudicaram o acúmulo de biomassa nos diferentes subcultivos.

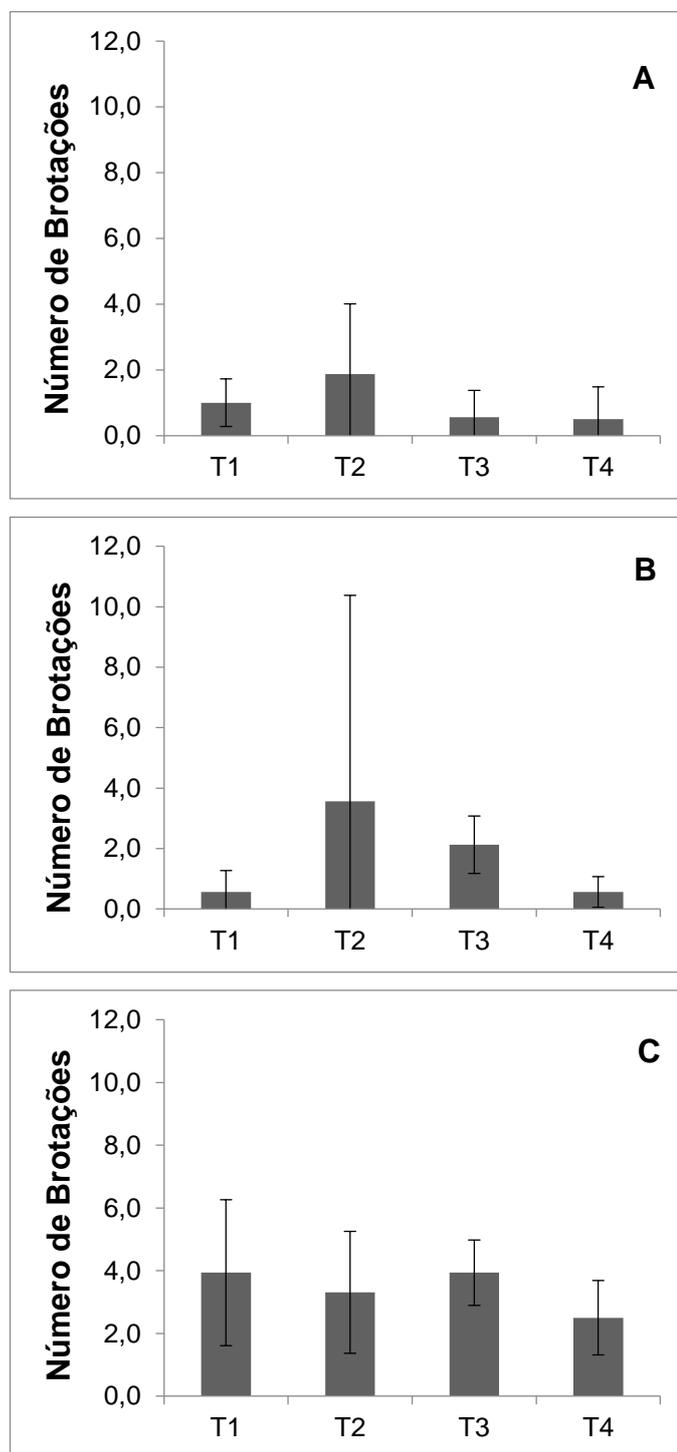
Cavalini et al. (2014) ressaltaram que o uso de adubos comerciais no cultivo *in vitro* tem se intensificado como forma de facilitação para o preparo de meios e redução de custos de produção em várias espécies vegetais, propiciando o desenvolvimento de plantas em larga escala e com menor custo.



Legenda: T1 – sais minerais PA + sacarose PA; T2 - sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 5. Médias e intervalos de confiança para massa da matéria fresca (g) de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' no primeiro (A) DMS=0,3689, segundo (B) DMS=0,4625 e terceiro (C) DMS=0,2972 subcultivos, realizados a cada 30 dias.

Com relação à taxa de multiplicação, foi feita uma estatística descritiva dos dados. Não houve diferença no número de brotações formadas entre os tratamentos (Figura 6).



Legenda: T1 – sais minerais PA + sacarose PA; T2 - sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 6. Médias e intervalos de confiança para número de brotações desenvolvidas nos explantes de abacaxizeiro 'Pérola' no primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) subcultivos, realizados a cada 30 dias.

De modo geral, o número de novas brotações formadas a cada subcultivo foi baixo para todos os tratamentos. No caso do abacaxizeiro 'Pérola' é recomendada a quebra da dominância apical no preparo do explante para aumentar o número de brotações formadas. Este procedimento é comum em biofábricas e foi realizado neste experimento com o mesmo objetivo, porém, não foi tão eficiente como o esperado.

Houve um aumento no número de brotações com o avanço dos subcultivos (Figura 6), o que é esperado na fase de multiplicação do abacaxizeiro (Araújo et al., 2008; Walter, 2012).

5.2. Experimento II

5.2.1. Fase II: Multiplicação *in vitro*

Na fase de multiplicação das brotações, neste segundo experimento, foram utilizadas brotações já estabelecidas *in vitro* e mantidas em meio de cultura MS com sais e sacarose PA. Durante esta fase, as brotações foram avaliadas quanto à massa da matéria fresca a cada um dos três subcultivos realizados em intervalos de 30 dias. De acordo com a análise de variância, é possível observar que o fator sais minerais apresentou significância para a variável massa da matéria fresca das brotações nos subcultivos 2 e 3. Em relação ao fator sacarose este não apresentou significância nos três subcultivos. Houve interação entre os dois fatores apenas no subcultivo1 (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para a variável massa da matéria fresca (g) em função das fontes de sais e sacarose usados no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', em três subcultivos realizados a cada 30 dias, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		1º Subcultivo	2º Subcultivo	3º Subcultivo
Sais (S)	1	0,2657 ^{ns}	3,6603*	1,0049*
Sacarose (Sac)	1	0,3028 ^{ns}	0,0533 ^{ns}	0,0563 ^{ns}
S x Sac	1	0,6052*	0,0068 ^{ns}	0,3098 ^{ns}
Resíduo	36	0,1067	0,1021	0,0163
Média geral		0,7245	0,9780	1,0790
C.V. (%)		45,08	32,68	28,93

^{ns}– Não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$).

De acordo com a Tabela 6, após 30 dias de cultivo *in vitro*, é possível evidenciar que a associação da sacarose PA com sais comerciais (T3) apresentou o menor incremento de biomassa da matéria fresca. Com 60 dias de cultivo *in vitro* observou-se que os sais PA favoreceram o acúmulo de biomassa comparado com a fonte comercial. Aos 90 dias foi observado que o uso dos sais PA também resultou em uma maior biomassa, exceto quando se usou sais comerciais com sacarose PA (T3) que não apresentou diferença estatística. Diante desses resultados é possível assumir que não houve problemas na substituição da sacarose PA por açúcar cristal durante o cultivo *in vitro* para a variável massa da matéria fresca.

Tabela 6. Massa da matéria fresca (g) em função das fontes de sais minerais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', em três subcultivos realizados a cada 30 dias, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

1º Subcultivo			
Sais minerais	Sacarose		Média
	PA	Comercial	
PA	0,8436 aA	0,7708 aA	0,8072 a
Comercial	0,4341 bB	0,8528 aA	0,6435 a
Média	0,6389 A	0,8118 A	0,7253
C.V. (%)	13,41		
2º Subcultivo			
Sais minerais	Sacarose		Média
	PA	Comercial	
PA	1,3290 aA	1,2325 aA	1,2807 a
Comercial	0,6999 bA	0,6517 bA	0,6758 b
Média	1,0144 A	0,9421 A	0,9782
C.V. (%)	32,68		
3º Subcultivo			
Sais minerais	Sacarose		Média
	PA	Comercial	
PA	1,1105 aA	1,3623 aA	1,2364 a
Comercial	0,9726 aA	0,8687 bA	0,9207 b
Média	1,0416 A	1,1155 A	1,0785
C.V. (%)	28,93		

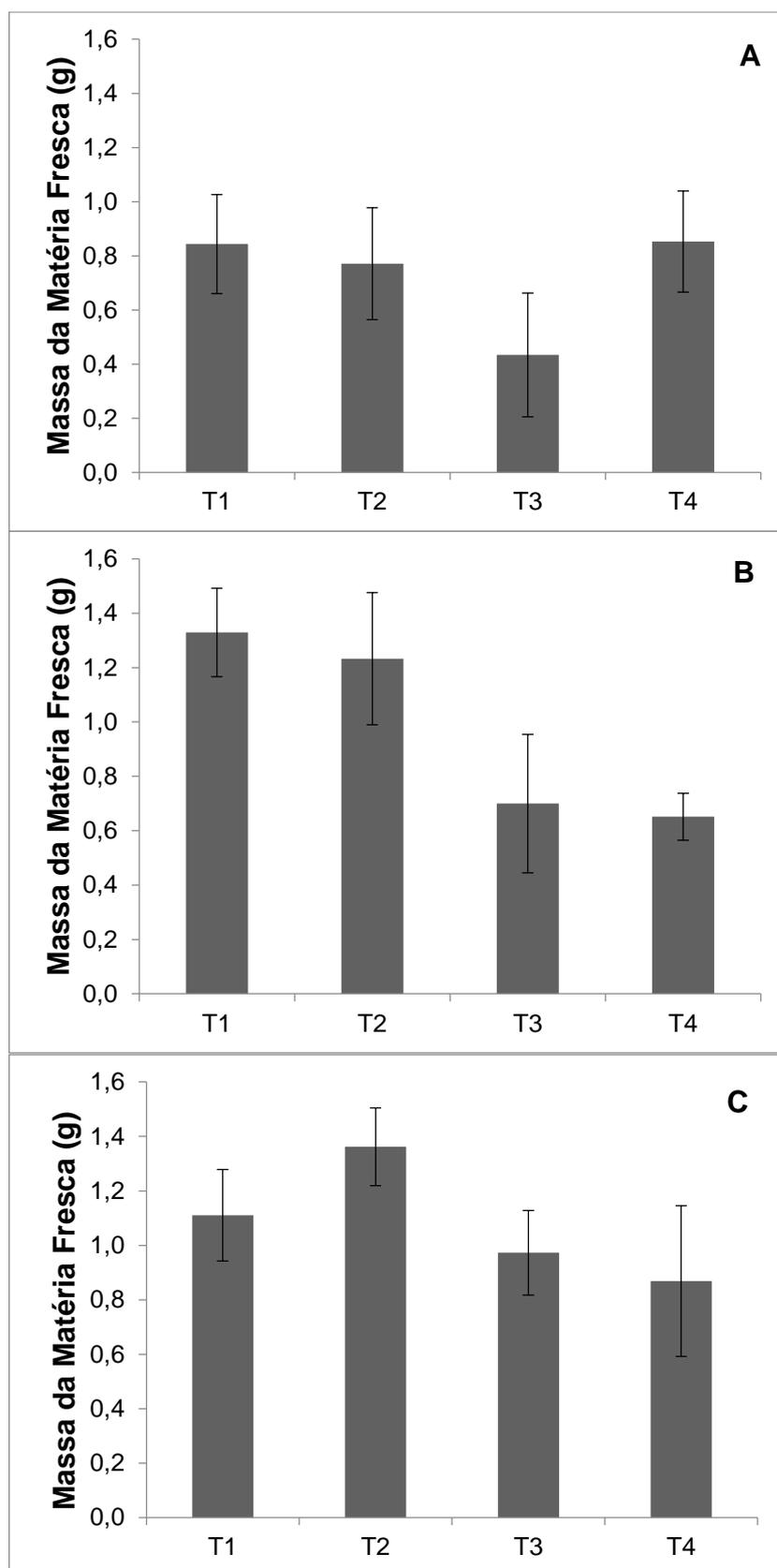
Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Na literatura não foram encontrados trabalhos sobre substituição de sais e sacarose PA por produtos comerciais na micropropagação do abacaxizeiro. No trabalho de Pereira (2014), onde também foram substituídos os sais minerais e sacarose por produtos comerciais na micropropagação da bananeira 'Williams' os fatores citados não apresentaram significância para a variável massa da matéria fresca das brotações e ainda não houve interação entre estes dois fatores. Este resultado indica que os adubos comerciais e o açúcar cristal usados no preparo do meio de cultivo não interferiram na variável massa da matéria fresca ao longo dos subcultivos.

Ribeiro et al. (2012), avaliando o efeito do melado de cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento *in vitro* de bananeira, cv. Maçã obteve maior biomassa da matéria fresca quando foi usado o meio de cultura com a sacarose PA, se comparados com os resultados dos meios nutritivos preparados à base de melado de cana-de-açúcar.

Damaceno (2016), trabalhando com germinação *in vitro* de *Lactuca sativa* cv. Elba, comparou o meio de cultura MS com uma formulação comercial à base de adubos minerais. O meio de cultura constituído da formulação comercial demonstrou ser o mais eficaz na germinação e crescimento *in vitro* de plântulas da cultivar Elba, podendo ser utilizado por apresentar maior facilidade de acesso e baixo custo de produção em relação ao meio MS.

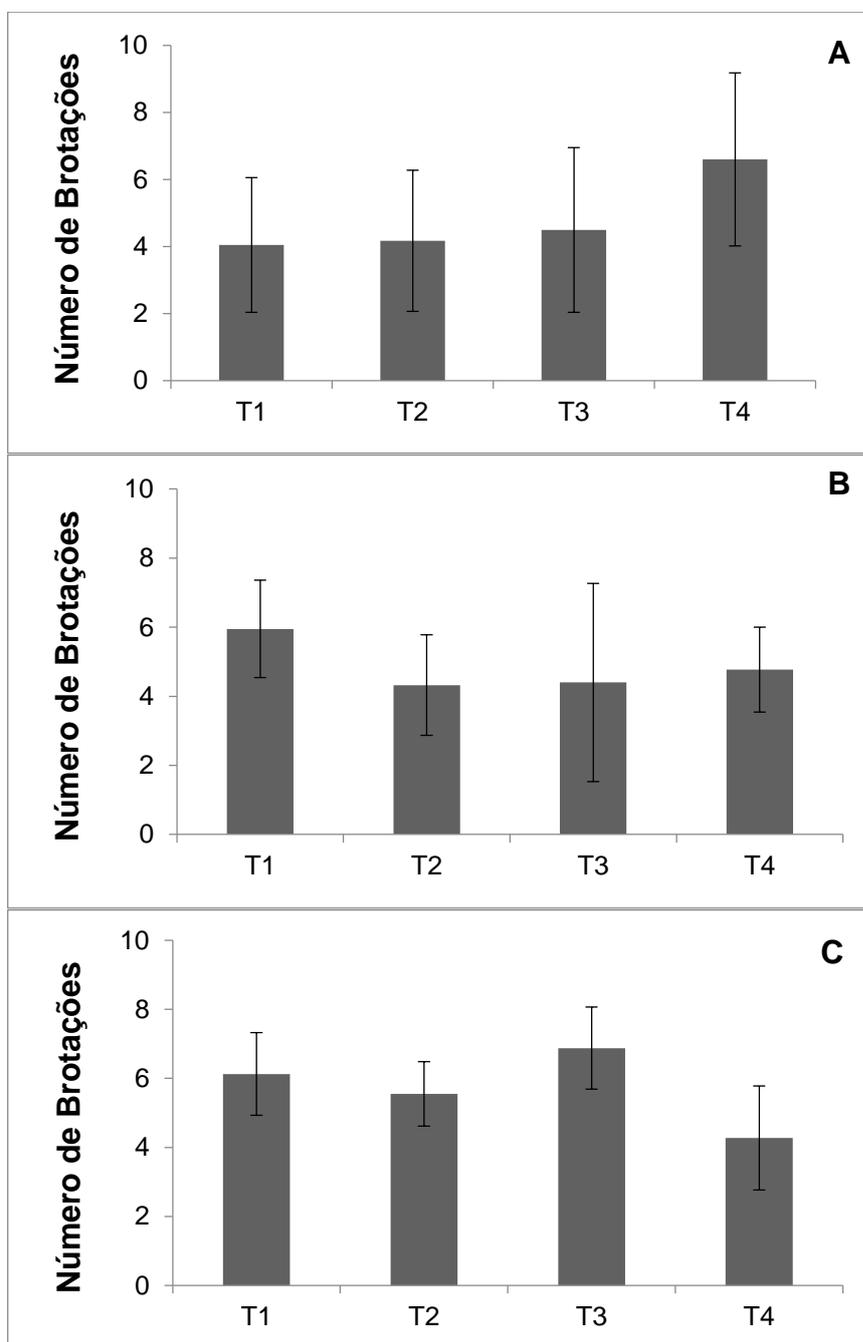
Para melhor visualização da massa da matéria fresca em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', a Figura 7 mostra o crescimento das brotações de acordo com os tratamentos nos três subcultivos realizados.



Legenda: T1– sais minerais PA + sacarose PA; T2 – sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 7. Médias e intervalos de confiança para massa da matéria fresca (g) de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 30 (A) DMS=0,2095, 60 (B) DMS=0,2050 e 90dias (C) DMS=0,2002 de subcultivo.

Com relação à taxa de multiplicação, foi feita uma análise descritiva dos dados. Não houve diferença no número de brotações formadas entre os tratamentos (Figura 8).



Legenda: T1– sais minerais PA + sacarose PA; T2 – sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 8. Médias e intervalo de confiança para número de brotações desenvolvidas em explantes de abacaxizeiro 'Pérola' no primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) subcultivos, realizados a cada 30 dias.

Neste trabalho foram feitos três subcultivos, dois a menos do que normalmente são feitos nas biofábricas (Teixeira, 2006). No trabalho de Guerra et al. (1999) utilizando abacaxizeiro cv. Perolera foram feitos dois subcultivos com intervalo de tempo de 30 dias e em mesmo meio de multiplicação deste trabalho, porém, com sais e sacarose PA. Os autores obtiveram uma taxa de 9,8 brotos por explante, número superior ao encontrado no presente trabalho.

Ganapathi et al. (1995) afirmaram que o açúcar comercial pode substituir a sacarose PA, sem que haja mudança significativa na frequência de formação dos brotos em bananeira. Este procedimento traz uma redução no custo de produção, devido ao preço reduzido deste produto quando comparado a sacarose PA.

5.2.2. Fase III: Enraizamento *in vitro*

Análises biométricas

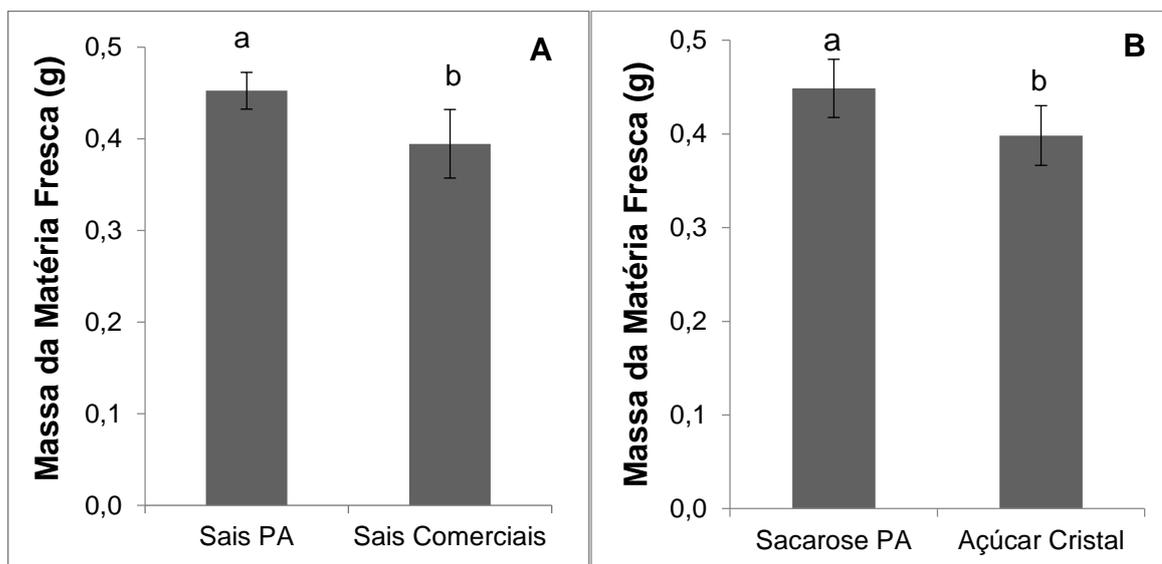
Segundo a análise de variância para os dados referentes à massa da matéria fresca acumulada pelas mudas durante os 30 dias de enraizamento *in vitro*, constata-se diferença significativa para as fontes de sais minerais e sacarose, não sendo observada interação entre os fatores (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância para a variável massa da matéria fresca acumulada pelas mudas (g) durante os 30 dias de enraizamento *in vitro*, em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio
		MF
Sais (S)	1	0,0168*
Sacarose (Sac)	1	0,0126*
S x Sac	1	0,0015 ^{ns}
Resíduo	16	0,0018
Média geral		0,4235
C.V. (%)		9,90

^{ns}– Não significativo pelo teste F ($P \leq 0,05$)

Na Figura 9, é possível visualizar a massa da matéria fresca acumulada pelas mudas, após 30 dias de enraizamento, em função dos fatores sais minerais e sacarose. Os produtos comerciais usados em substituição aos PA influenciaram negativamente na produção de matéria fresca pelas mudas.



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

Figura 9. Médias e intervalo de confiança da massa da matéria fresca acumulada pelas mudas de abacaxizeiro 'Pérola' em função das fontes de sais (A) DMS=0,0397 e sacarose (B) DMS=0,0397 durante os 30 dias de enraizamento *in vitro*.

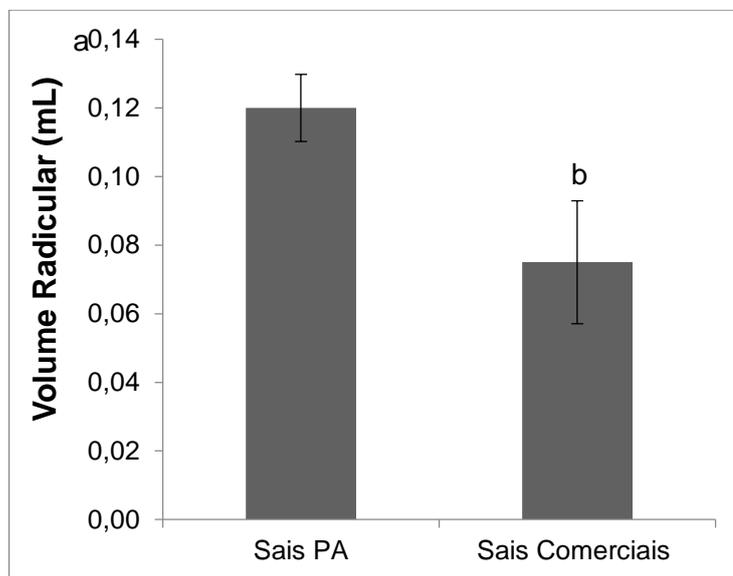
A análise de variância para as variáveis biométricas das mudas de abacaxizeiro ao final dos 30 dias de enraizamento *in vitro* mostra que para a variável volume radicular, houve efeito significativo em relação às fontes de sais minerais. Para as demais variáveis, não foram verificadas diferenças significativas (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância para as variáveis biométricas em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', após 30 dias de enraizamento *in vitro*, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio				
		NF	VR	MFT	MSPA	MST
Sais (S)	1	9,4531 ^{ns}	0,0101*	0,1312 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0003 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	24,7531 ^{ns}	0,0011 ^{ns}	0,0065 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0001 ^{ns}
S x Sac	1	25,8781 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0650 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0002 ^{ns}
Resíduo	16	56,9266	0,0005	0,0726	0,0006	0,0006
Média geral		17,2125	0,0975	0,8120	0,0655	0,0680
C.V. (%)		43,83	23,64	33,17	36,45	35,69

^{ns}– Não significativo; * - Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de variação; NF- Número de folhas; VR – Volume de raiz (cm³); MF – Massa da matéria fresca total (g); MSPA – Massa da matéria seca da parte aérea (g); MST – Massa da matéria seca total (g).

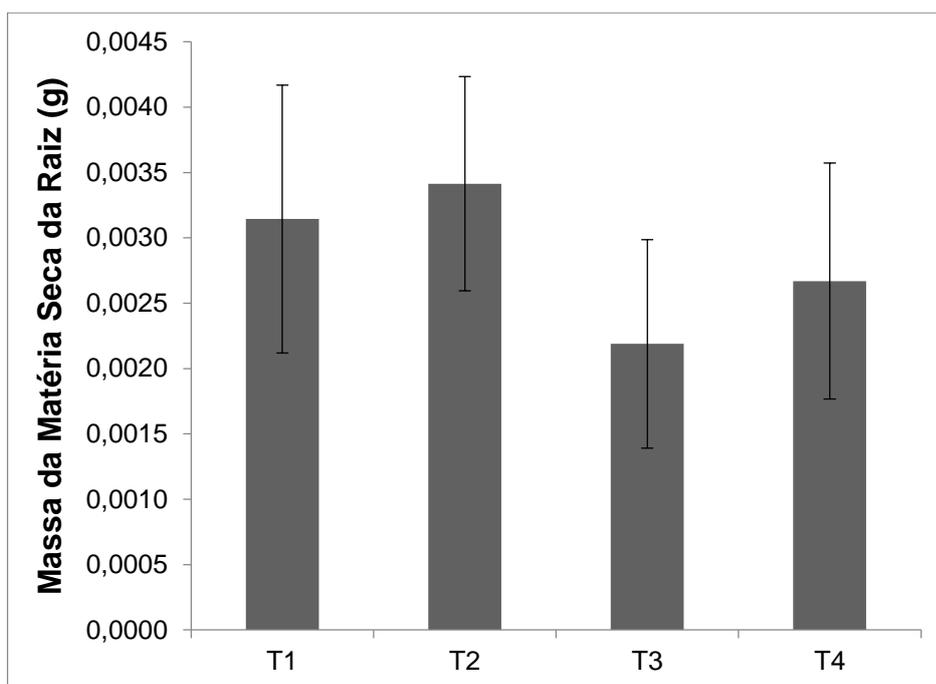
De acordo com a Figura 10, os sais minerais PA proporcionaram maior volume radicular às plantas em relação às cultivadas no meio com adubos comerciais.



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

Figura 10. Médias e intervalo de confiança para o volume radicular (mL) de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 30 dias em meio de enraizamento *in vitro*. DMS=0,0309.

Para a massa da matéria seca da raiz (MSR) foi feita uma análise descritiva dos dados (Figura 11). Não houve diferença para esta variável entre os tratamentos.



Legenda: T1– sais minerais PA + sacarose PA; T2 – sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 11. Médias e intervalo de confiança da massa da matéria seca da raiz (g) desenvolvida em explantes de abacaxizeiro ‘Pérola’ após 30 dias em meio de enraizamento *in vitro*.

Embora os produtos comerciais tenham ocasionado a redução no volume radicular, tal resultado não causou prejuízo ao crescimento das plantas. Esse fato pode ser comprovado pela não diferença entre as demais variáveis avaliadas, como, por exemplo, a massa da matéria fresca total e massa da matéria seca total (Tabela 8).

Para as outras variáveis analisadas, os tratamentos com produtos comerciais mostraram-se iguais, estatisticamente, se comparados aos tratamentos com formulações PA, o que demonstra a eficiência da utilização desses meios de cultivo para a propagação *in vitro* de abacaxizeiro cultivar Pérola, representando uma alternativa da utilização de sais comerciais e açúcar cristal no cultivo *in vitro*. Isso se justifica, pois, recentemente, o uso de fertilizantes comerciais *in vitro* tem se intensificado como forma de facilitação para o preparo de meios e redução de custos de produção em várias espécies vegetais (Cavalini, 2014). Da mesma forma, o açúcar cristal, que possui elevada pureza de sacarose (99,70%), propiciou o mesmo desenvolvimento das plantas cultivadas em meio com sacarose PA (99,94% de pureza), para todos os fatores estudados, não havendo restrições ao

seu uso no preparo do meio de cultivo para micropropagação de abacaxizeiro 'Pérola'.

Análise nutricional

A análise de variância apresentada na Tabela 9 mostra que houve interações significativas para os teores nutricionais em função das fontes de sais e sacarose para os nutrientes: potássio, cálcio, magnésio e boro, indicando diferenças significativas para nitrogênio, fósforo, magnésio e enxofre.

Tabela 9. Resumo da análise de variância para nutrientes minerais em função das fontes de sais e sacarose usados no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola', após 30 dias de enraizamento *in vitro*, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio						
		N	P	K	Ca	Mg	S	B
		g kg ⁻¹						
Sais (S)	1	341,5511*	27,6830*	15,6645 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	4,4086*	6,6355*	19,0125 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	28,3458 ^{ns}	3,2080 ^{ns}	7,3205 ^{ns}	0,0297 ^{ns}	0,0252 ^{ns}	2,5063*	0,0405 ^{ns}
S x Sac	1	32,5891 ^{ns}	0,4176 ^{ns}	328,8605*	2,5705*	0,3100*	0,0871 ^{ns}	201,6125*
Resíduo	16	15,1981	3,8333	21,2300	0,3022	0,0524	0,2716	39,6087
Média geral		40,4305	10,4875	49,6350	4,1885	2,0995	3,5100	34,9350
C.V. (%)		9,64	18,67	9,28	13,13	10,91	14,85	18,02

^{ns}– Não significativo; * - Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de Variação; N – Nitrogênio; P – Fósforo; K – Potássio; Ca –Cálcio; Mg – Magnésio; S – Enxofre; B – Boro.

Para os nutrientes fósforo, magnésio e enxofre foram encontrados níveis superiores destes elementos nas plantas cultivadas com sais comerciais. Já os teores de nitrogênio foram inferiores nas plantas cultivadas nesses meios (Tabela 10). Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Pereira (2014) com a micropropagação da bananeira cv. Williams, buscando a substituição dos sais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal, onde o teor de nitrogênio também foi inferior nos meios com sais comerciais.

Tabela 10. Teores de nutrientes minerais em funções das fontes de sais em folhas de abacaxizeiro após 30 dias de enraizamento *in vitro*, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fontes minerais	Nutrientes						
	N	P	K	Ca	Mg	S	B
	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹
Sais PA	44,56 a	9,31 b	48,75 a	4,19 a	1,63 b	2,93 b	33,96 a
Sais comerciais	36,30 b	11,66 a	50,52 a	4,19 a	2,57 a	4,09 a	35,91 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de tukey ($P \leq 0,05$). N– Nitrogênio; P –Fósforo; K– Potássio; Ca– Cálcio; Mg– Magnésio; S–Enxofre; B– Boro.

O nitrogênio é um nutriente que está relacionado aos mais importantes processos fisiológicos que ocorrem nas plantas, tais como fotossíntese, respiração, desenvolvimento e atividade das raízes, absorção iônica de outros nutrientes, crescimento, diferenciação celular e genética (Marschner, 1995). Sendo assim, embora os sais comerciais utilizados no preparo do meio de cultura tenham ocasionado teor de nitrogênio inferior em comparação aos reagentes PA (Tabela 10), não foram observados danos ao aparato biométrico e fisiológico das plantas *in vitro* (Tabela 8; Tabela 13).

De acordo com Marschner (1995) o fósforo faz parte de compostos fosfatados (ATP e ADP), ácidos nucleicos, coenzimas e fosfolipídeos. Este elemento é necessário em quantidade menor que o nitrogênio e o potássio para a cultura do abacaxizeiro (Ramos et al., 2011). Observa-se um aumento do teor de fósforo nas plantas cultivadas em meio de cultura com sais comerciais em comparação aos reagentes PA (Tabela 10).

As plantas cultivadas em meio de cultura com sais comerciais apresentaram maior teor de magnésio em comparação às plantas cultivadas em meio de cultura com sais minerais PA (Tabela 10). Segundo a literatura, o magnésio é um constituinte da molécula de clorofila e é ativador das enzimas transferidoras de fosfato (Paula et al., 1998). Sua deficiência poderá reduzir a concentração da clorofila, reduzindo a fotossíntese e o crescimento (Malézieux e Bartholomew, 2003). Porém tais problemas não foram encontrados neste trabalho, uma vez que não houve danos ao aparato fotossintético (Tabela 13).

O enxofre é constituinte de várias coenzimas e de vitaminas essenciais ao metabolismo (Taiz e Zeiger, 2013). É possível verificar um aumento do teor de enxofre nas plantas cultivadas em meio de cultura com sais comerciais em comparação aos reagentes PA (Tabela 10).

Quanto às fontes de carbono, houve diferença significativa apenas para o enxofre, que apresentou níveis superiores nas plantas mantidas no meio com açúcar cristal. Para os demais nutrientes não foi verificada diferença estatística entre as duas fontes (Tabela 11).

Tabela 11. Teores de nutrientes minerais em funções das fontes de sacarose em folhas de abacaxizeiro após 30 dias de enraizamento *in vitro*, Campos dos Goytacazes –RJ, 2015.

Fontes minerais	Nutrientes						
	N	P	K	Ca	Mg	S	B
	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹
Sacarose PA	39,24 a	10,09 a	50,24 a	4,15 a	2,06 a	3,16 b	34,89 a
Açúcar cristal	41,62 a	10,89 a	49,03 a	4,23 a	2,14 a	3,86 a	34,98 a

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de tukey ($P \leq 0,05$). N– Nitrogênio; P–Fósforo; K– Potássio; Ca– Cálcio; Mg–Magnésio; S–Enxofre; B– Boro.

Uma das interações significativas encontradas na análise nutricional está relacionada ao nutriente potássio que está envolvido na abertura e no fechamento dos estômatos, na regulação osmótica e no balanço iônico, além de ser um ativador de enzimas (Marschner, 1995). O potássio é o nutriente requerido em maior quantidade pelo abacaxizeiro (Ramos et al., 2011). Os tratamentos com sais

comerciais e sacarose PA (T3) e sais PA e açúcar cristal (T2) proporcionaram maior teor desse nutriente (Tabela 12).

Com relação ao cálcio, este é utilizado na síntese de novas paredes celulares, principalmente da lamela média (Taiz e Zeiger, 2013). Segundo Malavolta et al. (1997), o cálcio é essencial para manter a integridade estrutural das membranas e da parede celular. Este nutriente apresentou menor teor no tratamento com sais minerais PA e sacarose PA (T1), quando comparado ao tratamento com sais PA e sacarose comercial (T2) (Tabela 12).

Para o teor de magnésio observa-se que os tratamentos que possuíam a combinação com sais comerciais apresentaram os maiores resultados (Tabela 12). Para o nutriente boro, que desempenha funções no alongamento celular, na síntese dos ácidos nucleicos, nas respostas hormonais e no funcionamento de membranas (Shelp, 1993), pode-se observar que o tratamento com sais PA e sacarose PA (T1) apresentou menor teor quando comparado a sais comerciais e sacarose PA (T3) (Tabela 12).

Tabela 12. Teores de nutrientes minerais em funções das fontes de sais minerais e sacarose em folhas de abacaxizeiro após 30 dias de enraizamento *in vitro*, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

K			Ca		
Sais minerais	Sacarose		Sais minerais	Sacarose	
	PA	Comercial		PA	Comercial
PA	45,30 bB	52,20 aA	PA	3,79 aB	4,59 aA
Comercial	55,18 aA	45,86 bB	Comercial	4,51 aA	3,87 aA
Mg			B		
Sais minerais	Sacarose		Sais minerais	Sacarose	
	PA	Comercial		PA	Comercial
PA	1,47 bB	1,79 bA	PA	30,74 bA	37,18 aA
Comercial	2,66 aA	2,48 aA	Comercial	39,04 aA	32,78 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Uma justificativa para as diferenças nutricionais encontradas nas análises deste experimento pode ser correlacionada a um maior teor de impurezas nos produtos comerciais. Já os produtos PA são mais purificados para a realização de análises de laboratório. Vale ressaltar que as diferenças nutricionais encontradas

não proporcionaram alterações nas plantas ao final do cultivo *in vitro* evidenciando, assim, que o uso das fontes comerciais não prejudicaram o crescimento e enraizamento de tais plantas (Tabela 8 e Figura 11).

Análises fisiológicas

A Tabela 13 apresenta a análise de variância para as variáveis fisiológicas das mudas ao final da etapa *in vitro* do experimento, não sendo observadas significâncias dos fatores para estas variáveis. Assim sendo, os tratamentos com sais comerciais e açúcar cristal não afetaram o seu aparato fotossintético.

Tabela 13. Resumo da análise de variância para as variáveis fisiológicas em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro ‘Pérola’, após 30 dias de enraizamento *in vitro*, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		
		F_v/F_m	PI	SPAD
Sais (S)	1	0,0022 ^{ns}	0,0540 ^{ns}	17,1755 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	0,0006 ^{ns}	0,3590 ^{ns}	25,2451 ^{ns}
S x Sac	1	0,0009 ^{ns}	0,1465 ^{ns}	29,1177 ^{ns}
Resíduo	16	0,0011	0,1049	25,2641
Média geral		0,7596	0,9370	25,5698
C.V. (%)		4,42	18,78	19,66

^{ns}– Não significativo; F_v/F_m – Fluorescência da Clorofila *a*; PI – Índice Fotossintético; SPAD – Intensidade de Verde.

Os dados obtidos para o crescimento *in vitro* das mudas neste experimento possibilitam afirmar que, ao final da etapa *in vitro*, não houve diferença entre as plantas micropropagadas em meio de cultivo preparado com reagentes PA e aquelas cultivadas nos meios alternativos propostos para a maioria das variáveis analisadas. Quando presentes, as diferenças estatísticas verificadas não foram responsáveis por uma redução significativa no crescimento das mudas.

5.2.3. Fase IV: Aclimatização das mudas

A taxa de sobrevivência das mudas após 45 dias de aclimatização foi de 100% para todos os tratamentos aplicados.

Análises biométricas

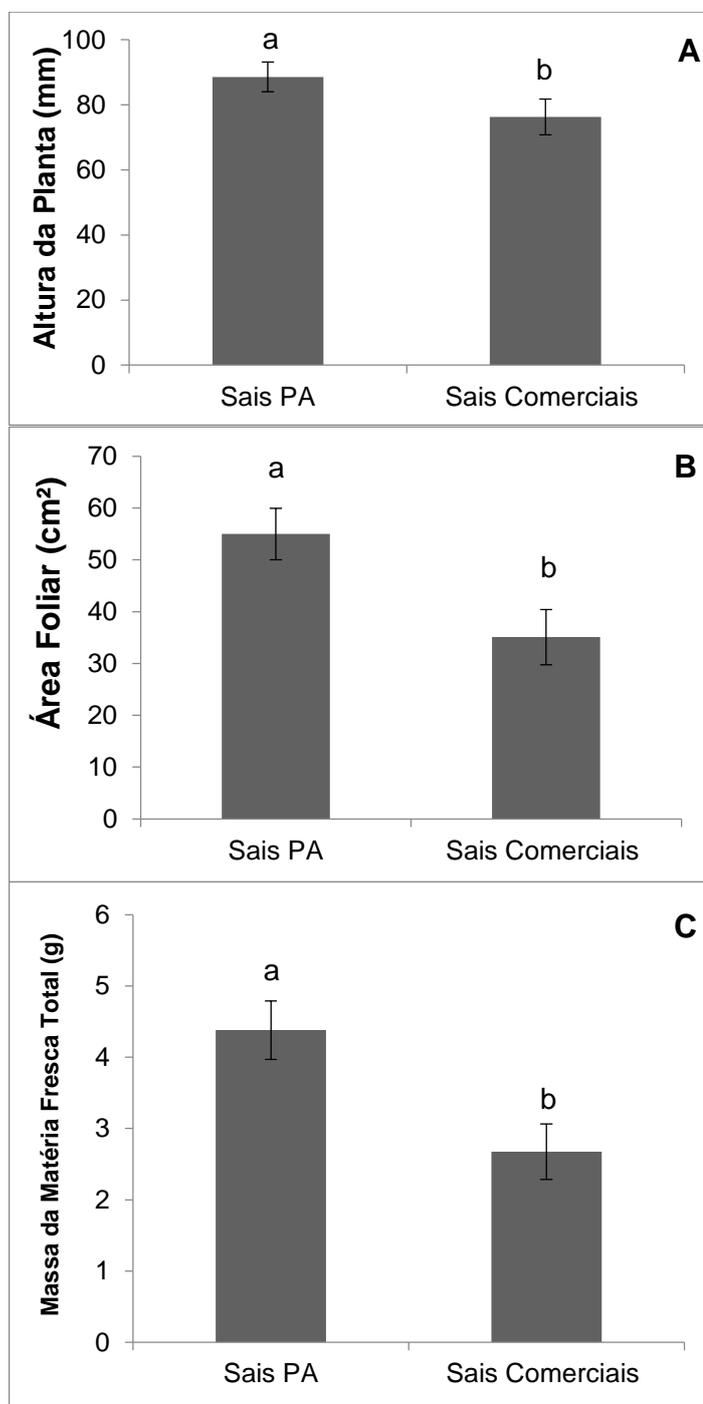
A análise de variância apresentada na Tabela 14 mostra que houve interações significativas para as variáveis número de folhas e massa da matéria seca de raiz. Para as variáveis número de folhas, altura da planta, área foliar e massa fresca total, houve efeito significativo em relação às fontes de sais. Para área foliar, altura da planta e número de folhas houve efeito significativo em relação às fontes de sacarose.

Tabela 14. Resumo da análise de variância para as variáveis biométricas em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola' na fase *in vitro*, após 45 dias de aclimatização, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio						
		NF	AP	AF	MFT	MSPA	MSR	MST
Sais (S)	1	137,8125*	3038,7288*	7925,1758*	58,1245*	0,0218 ^{ns}	0,0006 ^{ns}	0,0149 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	56,1125*	1814,0363*	812,6213*	4,2064 ^{ns}	0,0025 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0025 ^{ns}
S x Sac	1	74,1125*	481,8184 ^{ns}	703,2387 ^{ns}	0,7558 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,0029*	0,0050 ^{ns}
Resíduo	73	7,1824	235,1360	255,3039	1,6645	0,0070	0,0003	0,0093
Média geral		15,2125	82,4136	45,0391	3,5274	0,2185	0,0374	0,2556
C.V. (%)		17,62	18,61	18,30	36,57	19,60	23,22	19,24

^{ns} – Não significativo; * - Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de Variação; NF – Número de Folhas; AP – Altura da Planta (cm); Área Foliar (cm²); MFT – Matéria Fresca Total (g); MSPA – Matéria Seca da Parte Aérea (g); MSR – Matéria Seca de Raiz (g); MST – Matéria Seca Total (g)

Como se observa na Figura 12, as plantas dos tratamentos com sais comerciais apresentaram menor altura da planta, menor área foliar, e menor massa da matéria fresca total.

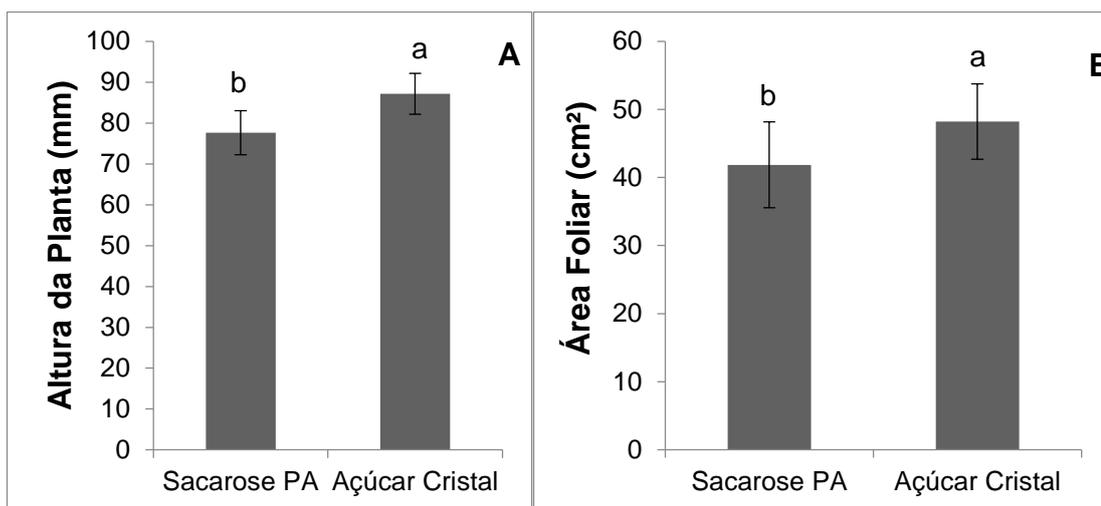


As letras diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Figura 12. Médias e intervalos de confiança para altura da planta (A) DMS=6,8336, área foliar (B) DMS=7,1207 e massa da matéria fresca total (C) DMS=0,5749, em mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 45 dias de aclimatização.

Resultados semelhantes com relação à redução na área foliar nos tratamentos com sais comerciais foram obtidos por Pereira (2014), após 45 dias de aclimatização de bananeira cv. Williams.

Na Figura 13, é possível observar maior altura das plantas e áreas foliares em plantas oriundas dos tratamentos com sacarose comercial.



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

Figura 13. Médias e intervalos de confiança para altura da planta (A) DMS=9,6642 e área foliar (B) DMS=10,0701 em mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 45 dias de aclimatização.

A Tabela 15 fornece a interação entre os fatores sais e sacarose para a variável número de folhas. É possível afirmar que o T4 (sais comerciais + açúcar cristal) foi superior, quando comparado com o T3 (sais comerciais + sacarose PA), demonstrando que os produtos comerciais quando utilizados simultaneamente aumentaram o número de folhas das plantas. O T1 (sais PA + sacarose PA) foi mais eficiente que o T3 (sais comerciais + sacarose PA), evidenciando que a sacarose PA é mais eficiente quando utilizada junto com os sais PA. O T3 foi o que proporcionou menor média dentre todos os tratamentos propostos, sendo assim, foi observado menor número de folhas neste tratamento.

Tabela 15. Número de folhas em função das fontes de sais e sacarose utilizadas na fase *in vitro*, em mudas de abacaxizeiro após 45 dias de aclimatização, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Sais minerais	Sacarose		Média
	PA	Comercial	
PA	16,65 aA	16,40 aA	16,53 a
Comercial	12,10 bB	15,70 aA	13,90 b
Média	14,36 B	16,05 A	15,21
C.V. (%)	17,62		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

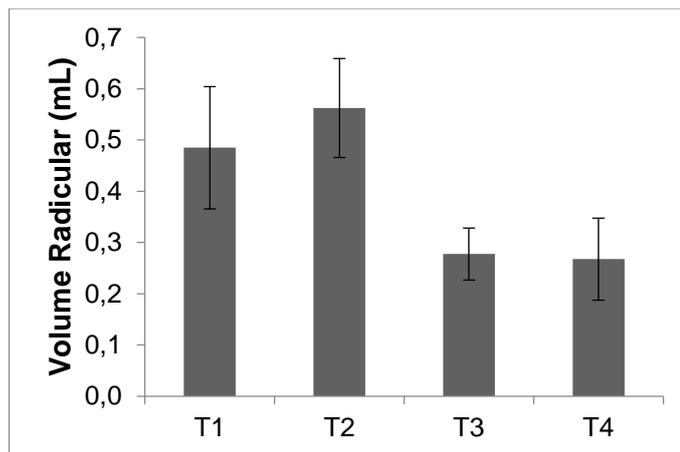
Na Tabela 16, é possível observar que os tratamentos com sais PA e sacarose PA (T1) e sais comerciais e açúcar cristal (T4) favoreceram o aumento da massa da matéria seca da raiz, apresentando as maiores médias entre os tratamentos propostos. Para esta variável, podem-se substituir os sais e a sacarose PA por produtos comerciais.

Tabela 16. Massa da Matéria Seca da Raiz (g) em função das fontes de sais e sacarose utilizadas na fase *in vitro*, em mudas de abacaxizeiro após 45 dias de aclimatização, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Sais minerais	Sacarose		Média
	PA	Comercial	
PA	0,0406aA	0,0288bB	0,0347 a
Comercial	0,0340aB	0,0462aA	0,0401 a
Média	0,0373 A	0,0375 A	0,0374
C.V. (%)	23,22		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Com relação ao volume radicular (mL), foi feita uma análise descritiva dos dados, sendo esta apresentada na Figura 14.



Legenda: T1– sais minerais PA + sacarose PA; T2 – sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 14. Médias e intervalos de confiança para volume radicular (mL) em mudas de abacaxizeiro ‘Pérola’ após 45 dias de aclimatização.

De modo geral, o volume radicular das mudas foi bastante expressivo no T1 (sais PA + sacarose PA) e no T2 (sais PA + açúcar cristal), onde estes proporcionaram maior incremento para a variável analisada (Figura 14). Pereira (2014), trabalhando com mudas aclimatizadas de bananeira cv. Williams, seguindo os mesmos tratamentos deste trabalho, obteve dados muito parecidos para a variável volume radicular após 45 dias de aclimatização, onde o T2 apresentou maior volume radicular.

Análise nutricional

A análise de variância apresentada na Tabela 17 mostra que, após 45 dias de aclimatização, não foram verificadas diferenças significativas para os nutrientes minerais em função das fontes de sais e de carbono utilizadas nos meios de cultivo na fase *in vitro*.

Tabela 17. Resumo da análise de variância para nutrientes minerais em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro 'Pérola' na fase *in vitro*, após 45 dias de aclimatização, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio						
		N	P	K	Ca	Mg	S	B
		g kg ⁻¹						
Sais (S)	1	0,0087 ^{ns}	0,4193 ^{ns}	0,0056 ^{ns}	0,0743 ^{ns}	0,3249 ^{ns}	0,1139 ^{ns}	4,0000 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	0,0007 ^{ns}	0,0431 ^{ns}	13,1406 ^{ns}	0,0005 ^{ns}	0,0021 ^{ns}	0,03706 ^{ns}	8,4100 ^{ns}
S x Sac	1	0,0006 ^{ns}	0,3813 ^{ns}	0,2256 ^{ns}	0,2889 ^{ns}	0,0030 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	3,0625 ^{ns}
Resíduo	12	0,0410	0,5248	9,5427	0,0941	0,0508	0,3266	24,3170
Média geral		1,4000	5,7094	54,6188	5,5606	3,4025	3,6069	50,2875
C.V. (%)		14,46	12,69	5,66	5,52	6,63	15,84	9,81

^{ns}– Não significativo; CV (%) – Coeficiente de Variação; N – Nitrogênio; P – Fósforo; K – Potássio; Ca – Cálcio; Mg – Magnésio; S – Enxofre; B – Boro

Há uma escassez muito grande de pesquisas envolvendo a nutrição mineral de plantas *in vitro*, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos com outros trabalhos, esta mesma dificuldade também é relatada por outros autores (Pereira, 2014; Couto et al., 2014).

Apesar de ter ocorrido redução no teor de N durante a fase *in vitro* nas plantas cultivadas em meios com sais minerais comerciais (Tabela 10), observa-se que durante a aclimatização isso não se repetiu, o que indica uma correção dos nutrientes durante esta fase. O mesmo ocorreu para o restante dos nutrientes. Como observado na Tabela 17, não foram verificadas diferenças significativas para os nutrientes minerais em função das fontes de sais e de carbono utilizados nos meios de cultivo. Assim sendo, os sais minerais comerciais podem ser utilizados em substituição aos sais PA sem prejuízo no teor de nutrientes nas mudas ao final da aclimatização, ou seja, no momento de sua comercialização.

Análises fisiológicas

A Tabela 18 apresenta a análise de variância para as variáveis fisiológicas PI – Índice Fotossintético e SPAD – Intensidade de Verde, após 45 dias de aclimatização das mudas. Como se observa, não foi constatado diferenças significativas para nenhuma variável em função das fontes de sais e de carbono usados no meio de cultivo na fase *in vitro*.

Tabela 18. Resumo da análise de variância para as variáveis fisiológicas em função das fontes de sais e sacarose usadas no preparo do meio de cultivo para abacaxizeiro ‘Pérola’ na fase *in vitro*, após 45 dias de aclimatização, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	
		PI	SPAD
Sais (S)	1	0,3568 ^{ns}	7,0211 ^{ns}
Sacarose (Sac)	1	0,6218 ^{ns}	8,2561 ^{ns}
S x Sac	1	0,5374 ^{ns}	7,2601 ^{ns}
Resíduo	73	0,3246	17,8200
Média geral		1,8803	34,2512
C.V. (%)		15,07	12,32

^{ns} – Não significativo; PI – Índice Fotossintético; SPAD – Intensidade de Verde.

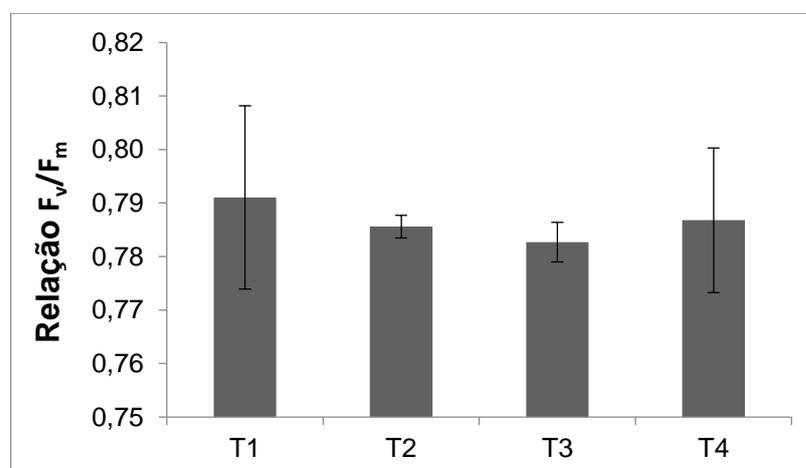
Com relação à eficiência fotoquímica (F_v/F_m), foi feita uma análise descritiva dos dados, sendo esta apresentada na Figura 15.

Observa-se que os valores estão dentro da faixa considerada normal (0,75 a 0,85) (Figura 15). De modo geral, os resultados apresentados ao final dos 45 dias de aclimatização mostram que, para algumas das variáveis biométricas avaliadas, há uma interferência negativa dos sais minerais comerciais usados no meio de cultivo. Porém, estas diferenças não afetaram a produção de matéria seca das mudas (Tabela 14), nem o teor de nutrientes (Tabela 17) e nem o aparato fotossintético (Tabela 18, Figura 15).

De acordo com o levantamento realizado (Tabela 1 do Apêndice), se houver a substituição das fontes de sais minerais e sacarose PA por produtos comerciais no meio de cultivo a redução, é de aproximadamente 95% no custo do meio de cultura. Os meios de cultura respondem por cerca de 15% do custo de produção de mudas. Assim sendo, o emprego dos sais e sacarose comerciais poderia reduzir os custos de produção de mudas de abacaxizeiro nas biofábricas.

A redução do custo da produção dos meios de cultivo pode significar proporcional diminuição no valor final das mudas, o que facilitaria o acesso dos produtores a esse tipo de material, uma vez que o elevado custo das mudas micropropagadas impossibilita sua adoção por grande parte dos produtores.

Os sais minerais comerciais e o açúcar cristal podem substituir satisfatoriamente a sacarose PA na propagação *in vitro* do abacaxizeiro 'Pérola'.



Legenda: T1– sais minerais PA + sacarose PA; T2 – sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 15. Médias e intervalos de confiança para eficiência fotoquímica (F_v/F_m) em mudas de abacaxizeiro 'Pérola' após 45 dias de aclimatização.

6. CONCLUSÕES

6.1. Experimento I

A substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal no preparo do meio de cultivo não influenciou na micropropagação do abacaxizeiro 'Pérola' na fase de estabelecimento e multiplicação *in vitro*.

6.2. Experimento II

A substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal no preparo do meio de cultivo não influenciou a micropropagação do abacaxizeiro 'Pérola' para a maioria das variáveis analisadas na fase de multiplicação e enraizamento *in vitro* e após 45 dias de aclimatização.

Os sais minerais comerciais e o açúcar cristal podem substituir satisfatoriamente a sacarose PA na propagação *in vitro* do abacaxizeiro 'Pérola'.

RESUMO E CONCLUSÕES

Para aumentar as chances de êxito na exploração comercial do abacaxizeiro cv. Pérola é fundamental o uso de material propagativo de alta qualidade para que ocorra maior produção da fruta exigida pelo mercado. Um dos métodos que contribuíram para esse aumento de qualidade e de produção da fruta é a cultura de tecidos vegetais com o uso da técnica de micropropagação. O elevado potencial de produção de mudas sadias de abacaxizeiro torna a micropropagação a principal tecnologia de produção de material propagativo, porém, o elevado custo de produção destas mudas ainda inviabiliza sua utilização pelos produtores. Nesse contexto, foram conduzidos dois experimentos com o objetivo de avaliar a substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal no preparo dos meios de cultivo nas fases de estabelecimento do explante *in vitro*, multiplicação das brotações, enraizamento *in vitro* e aclimatização das mudas formadas. No primeiro experimento objetivou-se testar fontes alternativas de sais minerais e de sacarose no meio de cultura na fase de estabelecimento e multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro cv. Pérola, utilizando gemas axilares de abacaxizeiro provenientes de lavoura comercial, visando à diminuição do custo de produção destas mudas. Com este trabalho, constatou-se que a substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal no preparo do meio de cultivo não influenciou na produção de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' na fase de estabelecimento e multiplicação *in vitro*. No segundo experimento objetivou-se testar diferentes fontes de sais minerais e sacarose utilizadas no meio de cultura, na fase de multiplicação e enraizamento *in vitro* e na aclimatização do abacaxizeiro cv. Pérola. Foram utilizadas brotações *in vitro* de abacaxizeiro proveniente da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Concluiu-se

que a substituição dos sais minerais PA por adubos comerciais e da sacarose PA por açúcar cristal, no preparo do meio de cultivo, não influenciou na produção de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' para a maioria das variáveis analisadas na fase de multiplicação *in vitro*. Para a fase de enraizamento, os sais PA proporcionaram maior massa da matéria fresca nas brotações. Quanto ao fator sacarose, este não apresentou diferença significativa. Independente dos resultados obtidos na fase *in vitro*, ao final da aclimatização as mudas produzidas em meio com sais minerais e sacarose comercial apresentaram a mesmas características fisiológicas e nutricionais das mudas produzidas em meio de cultura com sais e sacarose PA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, C.C., Câmara, T.R., Menezes, M., Willadino, L., Meunier, I., Ulisses, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. *Scientia Agrícola*, v.57, n.2, p.363-366, 2000.
- Almeida, W.A.B., Santana, G.S., Rodriguez, A.P.M., Costa, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol.24, n.2,p. 296-300, 2002.
- Anuário Brasileiro de Fruticultura 2015*. – Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p.104, 2015.
- Aquino, A.R.L., Vieira, A., Azevedo, J.A., Genú, P.J. C., Kliemann, H.J. Nutrição mineral e adubação do abacaxizeiro. In: HAAG, P.H. *Nutrição mineral e adubação de frutíferas tropicais*. Campinas: Fundação Cargill, p.31-58, 1986.
- Araújo, R.F., Siqueira, D.L., Cecon, P.R. Multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro 'smoothcayenne' utilizando benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). *Revista Ceres*, Viçosa – MG, 55(5): 455-460, 2008.
- Athayde, M.O. Indução do enraizamento *ex vitro* em plantas de abacaxizeiro cv. Vitória (*Ananascomosus*L. Merrill): processo fotossintético e medidas biométricas. 118 f. Tese – Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Ccta, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2012.
- Barboza, S.B.S.C., Caldas, L.S., Souza, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.39, n.8, p.725-733, agosto. 2004.
- Basso, S.M.S. *Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de Adesmia DC e Lotus L.* 268p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

- Bernardi, W.F., Rodrigues, B.I., Neto, P.C., Ando, A., Neto, A.T., Ceravolo, L.C., Montes, S.M.N.M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26 (3): 503-506, 2004.
- Braga, F.T., Pasqual, M., Castro, E.M., Rafael, G.C. Características morfofisiológicas de abacaxizeiro 'Gomo de Mel' enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 2, p. 551-557, Junho 2011.
- Brasil. Ministério da Defesa. Procedimentos para Licenciamento de Importação (LI) de produtos controlados pelo Exército Brasileiro. Brasília: Portaria Nº 09- D LOG, 25 de junho de 2004.
- Cabral, J.R.S., Coppens D'eeckenbrugge, G., Matos, A.P. Introduction of selfing in pineapple breeding. *Acta Horticulturae*, 529:165-168, 2000.
- Cabral, J.R.S., Matos, A.P. de. *Imperial, nova cultivar de abacaxi*. Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMP, 4p. (Embrapa-CNPMP. Comunicado Técnico, 114), 2005.
- Carvalho, A.C.P.P., Santos, E.O., Rodrigues, A.A.J. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil. In: Gerald, L.T.S. (org) *Biofábrica de Plantas: produção industrial de plantas in vitro*. 1 ed. Antiqua, 393 p, 2011.
- Catunda, M. G., Freitas, S.P., Oliveira, J.G., Silva, C. M. M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). Planta daninha, v 23, n. 1, p. 115-121, 2005.
- Cavalini, S.C.G., GIANINI, P.F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Crescimento *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) em meios de cultivo simplificados. *Natureza on line* 12 (2): 75-78, 2014.
- Christen, D., Schonmann, S., Jermini, M., Strasser, R.J., Defago, G. 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, 2007.
- Cid, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303 p.
- Coelho, R.I., Carvalho, A.C.J. de., Thiebaut, J.T.L.; Lopes, J.C. Brotação de gemas em secções de caule de abacaxizeiro 'Smooth Cayenne' tratadas com reguladores de crescimento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.31, n.1, p. 203-209, 2009.

- Coppens D'eeckenbrugge, G., Duval, M. F. The Domestication of Pineapple: Context and Hypotheses. Issue N°16 *Newsletter of the Pineapple Working Group*, International Society for Horticultural Science July, 2009.
- Coppens D'eeckenbrugge, G., Leal, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P. et al. *The pineapple - botany, production and uses*. Oxon: CABI, p.13-32, 2003.
- Correia, D. *Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de Eucalyptus grandis in vitro*. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2006.
- Costa, F.H.S., Pereira, M.A.A., Oliveira, J.P., Pereira, J.E.S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. *Ciência e agrotecnologia*, v. 31, n.1, p. 41-46, jan./fev., 2007.
- Couto, T.R., Silva, J.R., Netto, A.T., Carvalho, V.S., Campostrini, E. Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. 2, p. 459-466, Junho 2014.
- Crespo, H.J.S. *A quimera do desenvolvimento: um estudo de caso de agricultores do Norte Fluminense*. Dissertação (Mestrado em Educação) – Niterói – RJ, Universidade Federal Fluminense – UFF, p.55, 2004.
- Crestani, M., Barbieri, R.L., Hawerth, F.J., Carvalho, F.I.F., Oliveira, A. C.; Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. *Ciência Rural*, v.40, n.6, p.1473-1483, junho, 2010.
- Crisóstomo, L.A., Naumov, A. Embrapa Agroindústria Tropical. Fruteiras Tropicais do Brasil. Disponível em:
<<http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/FruteirasTropicaisdoBrasil.pdf>>. Acessado em: 28 de novembro de 2014. 2009.
- Cunha, G.A.P. Embrapa Mandioca e Fruticultura. *Cultura do abacaxi na região de Itaberaba, em condições de sequeiro*. Sistema de Produção, 14. ISSN 1678-8796 Versão eletrônica. Dez/2003.
- Cunha, G.A.P. *Equipe técnica de abacaxi comemora 30 anos de atividades e realizações*. Documentos, 170. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 20p, 2007.
- Damaceno, I.V. *Estabelecimento in vitro de Lactuca sativa (cv. elba) utilizando meios de cultivo alternativos*. 71 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, UFES, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES, 2016.

- Domini, L.P., Ferreira-Moura, I., Guisso, A.P., Souza, J.A. de., Viégas, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.
- Dougall D.K., Frazier G.C. Nutrient utilization during biomass and anthocyanin accumulation in suspension cultures of wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 18: 95–104, 1989.
- Dougall, D.K. Nutrition and metabolismo, In: E.J. Staba, (ed.), *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, CRC Press, Florida, p.21-58, 1980.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 25 de fevereiro de 2016.
- Ferreira, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042, 2011.
- Freitas, S.J. *Brassinosteroides e adubação no desenvolvimento, crescimento e nutrição de mudas de abacaxi*. Tese (Doutorado Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF, 100p, 2010.
- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaria, J.M. Low exogenous sucrose improves ex vitro growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. *Acta Horticulturae*, 748: 151-156, 2007.
- Ganapathi, T.R., Mohan, J.S.S., Suprasanna, P., Bapat, V.A., Rao, P.S. A low-cost strategy for *in vitro* propagation of banana. *Current Science*, Bangalore, v.68, p.646-649, 1995.
- Gonçalves, N.B., Carvalho, V.D. de. Características da Fruta. In: Gonçalves, N.B. (Org.) Abacaxi: pós-colheita. *Frutas do Brasil*, (5):13-27, 2000.
- González-Olmedo, J.L., Fundora, Z., Molina, L.A., Abdulnor, J., Desjardins, Y., Escalona, M. New contribution stop ropagation of pineapple (*Ananascomosus* L. Merr.). *In Vitro Celular & Developmental Biology – Plant*, 47: 87-90, 2005.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa p. 183-260. 1998.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. ed. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de planta*. Brasília: ABCTP/ Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais 39 EMBRAPA-CNPq, p.99-169, 1990.

- Guerra, M.P., Vesco, L.L., Pescador, R., Schuelter, A.R., Nodari, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 557-1563, 1999.
- Houllou-Kido, L.M., Silva, K.S., Rivas, R., Dias, A.L.F., Alves, G.D. Viability of *Noppalea cochenilifera* (cv. IPA Sertania) photoautotrophic micropropagation. *Acta Horticulturae*, 811: 309-313, 2009.
- IBGE (2010) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). SIDRA - Banco de Dados Agregados. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acessado em: 19 de Janeiro de 2015. Página mantida pelo IBGE. 2010.
- IBGE (2014). Dados da safra de abacaxi no Brasil. On-line. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>>. Acessado em: 19 de Janeiro de 2015. 2014.
- IBGE (2015). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. On-line. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=4&z=t&o=26&u1=30&u2=1&u3=1&u4=1>>. Acessado em: 14 de Agosto de 2015. 2015.
- IBGE (2016). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. On-line. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201601.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201601.pdf)>. Acessado em: 25 de fevereiro de 2016.
- Jiang, C.D., Shi L., Gao, H.Y., Schansker, G., Tóth, S.Z., Strasser, R.J. Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll a fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44:454-463, 2006.
- Jones, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal Experimental Botany*, v.04, p.387-398, 1998.
- Kolber, S.Z., Právil, O., Falkowski, P.G. Measurement's variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques defining methodology and experimental protocols. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1376, p.88-106, 1998.
- Krause, G.H., Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.42, p. 313-349, 1991.
- Leal, F., Copoens D'eeckenbrugge, G. Pineapple. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. *Fruit breeding tree and tropical fruits*. New York: John Willey. Cap.9, p.515-557, 1996.

- Leifert, C., Murphy, K.P., Lumsden, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue culture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 (2): 83-109, 1995.
- Lemos, E.E.P., Ferreira, M.S., Alencar, L.M.C., Oliveira, J.G.L., Magalhães, V.S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em Biorreator de Imersão Temporária. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23 (3): 482-487, 2001.
- Li-Cor. LI-3100. Area meter instruction manual. Lincoln, pp. 34, 1996.
- MacCarthy, J.J., Ratcliffe, D., Street, H.E. The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don Cells growth in batch culture. *Journal of Experimental Botany*, v.31, n.124, p.1315-1325, 1980.
- Macêdo, C. E. C. de., Silva, M. G. da., Nóbrega, F. S. da., Martins, C. P., Barroso, P. A. V., Alloufa, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, n.3, p.501-504, 2003.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: *Potafos*, 319 p, 1997.
- Malézieux, E.; Bartholomew, D.P. Plant Nutrition. In: Bartholomew, D.P.; Paul, R.E.; Rohrbach, K.G. (Ed.). *The pineapple: botany, production and uses*. New York: CABI Publishing, 2003. p. 143-165.
- Markwell, J., Osterman, J. C., Mitchell, J. L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*, v. 46, p. 467-472, 1995.
- Marschner, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2^o ed. Academic Press, 889 p, 1995.
- McDonald, K. A., A. P. Jackman. Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Reports.*, 8, 455-458 (1989).
- Mendes, P.S., Araújo, W.F., Antunes, F., Chagas, E.A., Couceiro, M.A. Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. *Revista Agro@ambiente On-line*, v. 9, n. 2, p. XXX, 2015.
- Miguel, A. C. A., Spoto, M. H. F., Abrahão, C., Silva, P. P. M. Aplicação do método QFD na avaliação do perfil do consumidor de abacaxi pérola. *Ciência Agrotécnica*, v. 31, n. 2, p. 563-569, 2007.
- Moraes, A. M., Almeida, F. A. C., Bruno, R. L. A., Filho, J. C.; Nunes, S. T., Gomes, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa1. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, p. 932-936, 2010.
- Moraes, R., Carvalho, V.S., Walter, R., Generoso, A.L., Vettorazzi, R.G. Uso do Hidrogel na Micropropagação de Abacaxizeiro 'Gold': Efeito na Aclimatização. In: XXIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2014, Cuiabá. XXIII Congresso Brasileiro de Fruticultura - Oportunidade e Desafios para o Brasil, 2014.

- Moreira, M.A., Pasqual, M., Carvalho, J.G., Fráguas, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência Agrotécnica.*, v.27, n.5, p.1002-1006, set./out., 2003.
- Murashige, T., Skoog, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- Oliveira, D.T., Esquiaveto, M.M.M., Júnior, J.F.S. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27: 99-102, 2007.
- Oliveira, R.S., Pereira, M. R., Carvalho, V.S., Silva, J.R., Campostrini, E. Esterilização química e agentes geleificantes alternativos na propagação vegetativa 'in vitro' do abacaxizeiro 'Vitória'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2015b. (Artigo aceito para publicação)
- Oliveira, R.S., Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Lucas, E.F., Gravina, A.G. Amido e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro 'gold' e seus efeitos na aclimatização. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 2, p. 273-280, Junho 2015a.
- Pasqual, M., Santos, F.C., Figueiredo, M.A., Junqueira, K.P., Rezende, J.C., Ferreira, E.A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Horticultura Brasileira* 26: 45-49, 2008.
- Patiño, V. M. Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Geotrópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Asohfrucol y Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. *Publicación CIAT 326*, Cali, Colombia, 2002.
- Paula, M.B.de., Mesquita, H.A.de., Nogueira, F.D. Nutrição e adubação do abacaxizeiro. *Informe agropecuário*, 19 (195): 33-39, 1998.
- Pereira, F. A., Carneiro, M. R., Andrade, L. M. *A propagação do abacaxizeiro*. 2. ed. rev. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica : Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 59 p.: il. (Coleção Plantar ; 52), 2006.
- Pereira, J. E. S., Bianchi, V. J., Dutra, L. F., Fortes, G. R. L. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria xananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. *Ciência Rural*, v. 29, n. 1, p. 17-20, 1999.
- Pereira, J. E. S., Fortes, G. R. L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.
- Pereira, M.R. Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação da bananeira cv. Williams. 102 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2014.

- Pereira, M.R., Carvalho, V.S., Lucas, E.F., Gravina, A.G. Amido de milho e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro vitória e seu efeito na aclimatização. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 2, p. 528- 533, Junho 2015.
- Peters, J.B. Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison,WI. Disponível em: <http://uwlab.soils.wisc.edu/files/procedures/plant_icp.pdf>. Acessado em 10 de janeiro de 2015. 2005.
- Pinho, R. S. *Comparação entre ágar e amido como agentes geleificantes na micropropagação de batata doce Ipomoea batatas (L.) Lam.* 2003. 88 f. Dissertação(Mestrado em Agronomia/Horticultura) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- Piza, I.M. de T., Lima, G. P.P., Brasil, O.G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. *Revista Ceres*, v.48, n.280, p.681-690, 2001.
- Ponciano, N.J., Constantino, C.O.R., Souza, P.M., Detmann, E. Avaliação econômica da produção de abacaxi (*Ananascomosus L.*) cultivar Pérola na região norte fluminense. *Revista Caatinga*, 19(1):82-91, 2006.
- Prakash, S., Hoque, M.I., Brinks, T. Culture media and containers. In: *Technical meeting of low costs options for tissue culture technology in developing countries*. Proceedings, IAEA: FAO, p. 29-40, 2004.
- Praxedes, S.C., Silva, Júnior A.F., Figueiredo, F.L.B., Figueiredo, M.L., Câmara, F.A.A., Oliveira, O.F. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. *Caatinga* 14: 13-15, 2001.
- Ramalho, A.R., Junior, J.R.V., Fernandes, C.F., Rocha, R.B., Marcolan, A.L., Cassaro, J.D. Características das cultivares de abacaxizeiros cultivadas no estado de Rondônia. Embrapa. Disponível em: <[www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/ Abacaxi_Brasil_2009.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Abacaxi_Brasil_2009.pdf)>. Acessado em: 18 de Agosto de 2015. 2009.
- Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G. R., Silva, J.A. Deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial': composição mineral. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(1): 261-271, 2011.
- Reinhardt, D. H., Medina, V. M., Caldas, R. C., Cunha, G. A. P., Estevam, R. F. H. Gradientes de qualidade em abacaxi Pérola em função do tamanho e do estágio de maturação do fruto. Jaboticabal. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n.3, p. 544-546, 2004.

- Reinhardt, D.H., Cabral, J.R.S., Souza, L.F.S., Sanches, N.F., Matos, A.P. "Pérola" and 'Smooth Cayenne' pineapple cultivars in the state of Bahia, Brazil: growth, flowering, pests and diseases, yield and fruit quality aspects. *Fruits*,57:43-53, 2002.
- Resh, H. *Hydroponic food productions*. 5 ed. California: Woodbridge Press Publishing Company, 527p., 1997.
- Ribeiro, J.M., Melo, N.F., Coelho, A.K.N.S., Pinto, M.S.T. Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento *in vitro* de bananeira (*Musa* spp.) cv. Maçã. *Revista Ceres*, v. 59, n.3, p. 293-298, 2012.
- Ribeiro, J.M., Melo, N.F., Coelho, A.K.N.S., Pinto, M.S.T. Uso da rapadura como meio nutritivo para cultivo *in vitro* de bananeira cv. Maçã. *Revista Ceres*, v. 60, n.5, p. 722-725, set/out, 2013.
- Rocha, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 121-152, 2009.
- Santana, M.A., Romay, G., Matehus, J., Vicente-Villardón, J.L., Demey, J.R. A simple and low-cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihotesculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology*, 8:3789-3897, 2009.
- Santos, P.C. Ácidos húmicos, brassinosteroide e fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de abacaxizeiro. 78 F. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Ccta, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2012.
- Scherer, R.F., Garcia, A.C., Fraga, H.P.F., Dal Vesco, L.L., Steinmacher, D., Guerra, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananascomosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, v.151, n.1, p. 38-45, 2013.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulated fluorometer. *Photosynthesis Research* 10,51–62, 1986.
- Shelp, B.J. Physiology and biochemistry of boron in plants. In: *Boron and its role in crop production*. U.C. Gupta (ed) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 53-85, 1993.
- Silva, A. B. *Biorreator e luz natural na micropropagação do abacaxizeiro*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Lavras/MG, Universidade Federal de Lavras. 132p, 2006.
- Silva, A.A. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro. 100 F. Dissertação – Programa de

Pós-graduação em Produção Vegetal, Ccta, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2013.

- Silva, A.B., Pasqual, M., Teixeira, J.B., Araújo, A.G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.9, p.1257-1260, setembro. 2007.
- Silva, S.E.L., Souza, A.G.C., Berni, R.F., Souza, M.G. A Cultura do Abacaxizeiro no Amazonas. *Circular técnica n° 21. Manaus, AM. ISSN 1517-2449. 6p. Agosto, 2004.*
- Simão, S.O. Abacaxizeiro. *In: Simão, S. Tratado de fruticultura.* Piracicaba: FEALQ, p.249-288, 1998.
- Skoog, F., Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–131, 1957.
- Smith, M. K., Ko, L. H., Hamill, S. D., Sanewski, G. M., Graham, M. W. Biotechnology. *In: Bartholomew, D., Rohrback, K., Paull, R. E. The pineapple: Botany, Production e Uses.* International CAB, Australia, p. 57 – 68, 2003.
- Souza, F.V.D., Souza, A.S., Santos-Serejo, J.A., Souza, E.H., Junghans, T.G., Silva, M.J. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. *In: Junghans, T.G., Souza, A.S. (eds.) Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas.* Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.177-206, 2009.
- Souza, G. C., Clemente, P. L., Isaac, V. L. R., Faria, S. P., Campos, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Schomburgkia *crispa*. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 405-407, 2007.
- Souza, G.M., Wanderley, M.G.L. *Aechmea rodriguesiana* (L. B. Sm) (Bromeliaceae) uma espécie endêmica da Amazônia brasileira. *Acta Amazônica*, 37(4):517-520, 2007.
- Souza, L.F. DA S. Correção da acidez e adubação. *In: Cunha, G.A.P. da, Cabral, J.R.S., Souza, L.F. da S. (orgs.) O abacaxizeiro, Cultivo, agroindústria e economia.* Brasília: Embrapa comunicação para transferência de Tecnologia, p.169-202, 1999.
- Spironello, A., Siqueira, W.J., Usberti Filho, J.A., Teófilo Sobrinho, J., Carvalho, C.R.L., Bettiol Neto, J.E., Sigrist, J.M.M., Ferrari, J.T., Louzeiro, I.M., Martins, A.L.M. Cultivar de abacaxizeiro IAC Fantástico. Instituto Agrônomo, Campinas, SP, "Folder", 6p, 2010.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. Analysis of the chlorophylla fluorescence transient. *In: Papageorgiou, G., Govindjee (eds.) Advances in Photosynthesis and Respiration Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 19: 321-362, 2004.

- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pather, U., Mohanly, P. (eds.). *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. Taylor and Francis. p. 445-483, 2000.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, p.954, 2013.
- Teixeira, S.L., Ribeiro, J.M., Teixeira, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.86, p.375-378, 2006.
- Teixeira, S.L., Teixeira, M.T., Ribeiro, J.M. Chemical sterilization of culture medium. 2. Addition of sodium hypochlorite to the medium. *Horticultura Brasileira*, 23 (2): 591, 2005.
- Ventura, A.J., Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Costa, H. 'Vitória', cultivar de abacaxi resistente à fusariose. Documentos nº 148, Vitória: INCAPER, 2006.
- Viana, E.S., Reis, R.C., Jesus, J.L., Junghans, D.T., Souza, F.V.D. Caracterização físico-química de novos híbridos de abacaxi resistentes à fusariose. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.7, p.1155-1161, julho, 2013.
- Walter, R. *Micropropagação e ontogenia de brotações adventícias de ananascomosus* L. merr. cv. Smooth Cayenne. 56f. Monografia – Graduação em ciências biológicas - UNEMAT – Campus Tangará da Serra, 2012.
- Xiao, Y., Kozai, T. *In vitro* multiplication of static plantlet using sugar-free media. *Scientia Horticulturae*, p. 1-7, 2006.

APÊNDICES



Figura 1. Retirada das gemas axilares dos talos de abacaxizeiro provenientes de Marataízes-ES (A) e tubos ensaio contendo as brotações após 30 dias de estabelecimento *in vitro* (B).

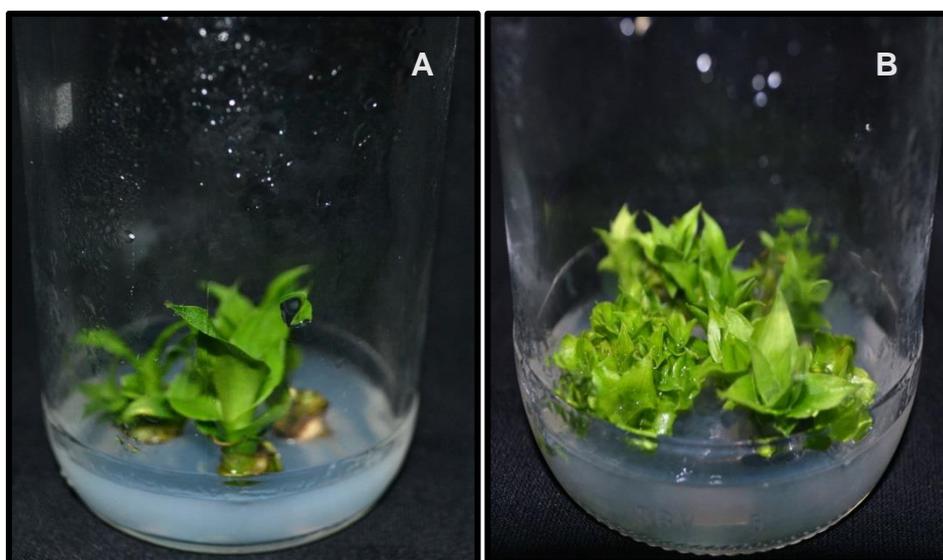


Figura 2. Brotações abacaxizeiro 'Pérola' provenientes de Marataízes-ES após 60 dias de estabelecimento *in vitro* (A) e após 60 dias de multiplicação *in vitro* (B).



Figura 3. Mudas de abacaxizeiro 'Pérola' provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, antes do início do experimento.

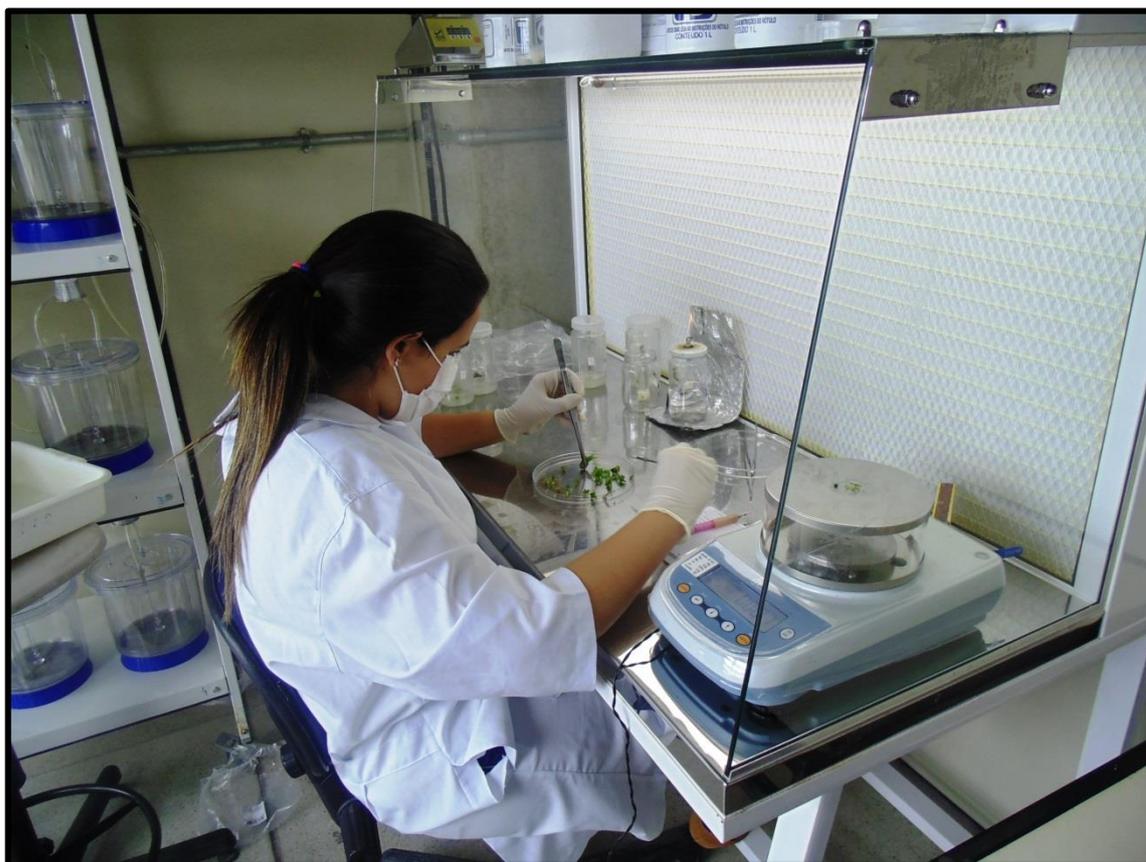


Figura 4. Visão geral do processo de subcultivo em câmara de fluxo laminar.

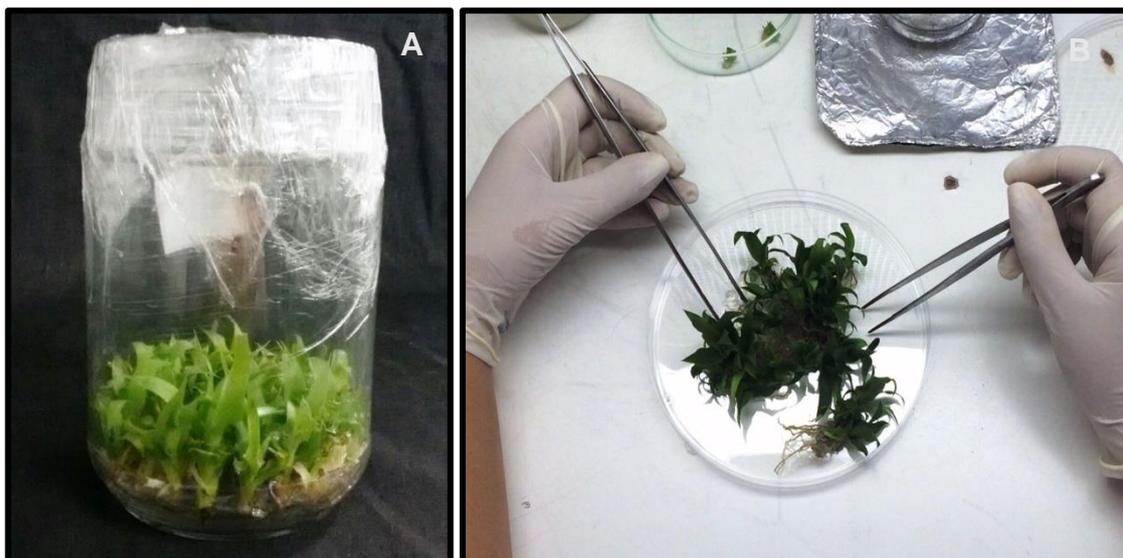


Figura 5. Frasco com brotações intactas antes dos subcultivos (A) e detalhe do conjunto de brotações (B).

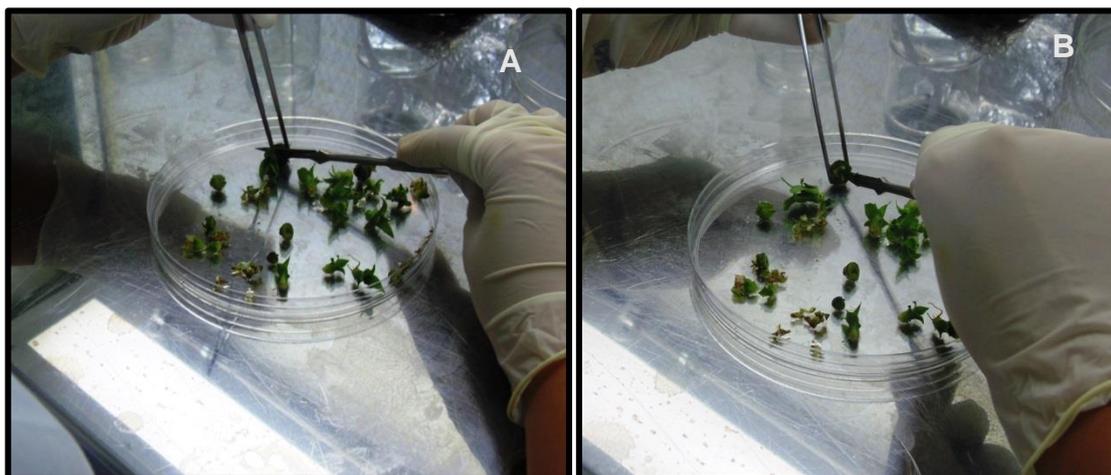
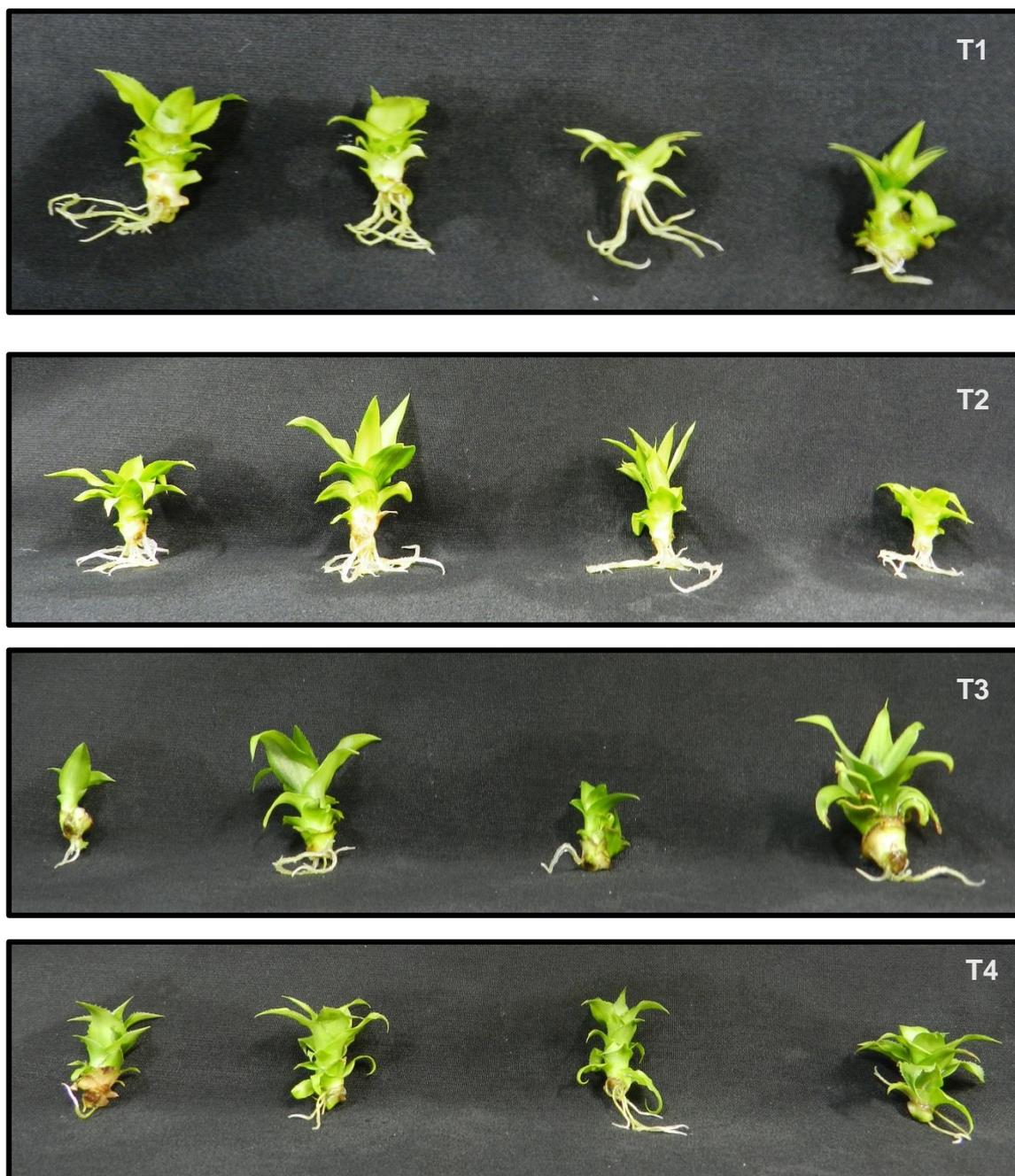


Figura 6. Procedimento de subcultivo: limpeza das brotações (A) e quebra da dominância apical (B).



Figura 7. Visão geral do experimento: brotações colocadas no meio e frasco com quatro brotações ao final do procedimento.



Legenda: T1 – sais minerais PA + sacarose PA; T2 – sais minerais PA + açúcar cristal; T3 – sais minerais comerciais + sacarose PA; T4 – sais minerais comerciais + açúcar cristal.

Figura 8. Plantas de abacaxizeiro 'Pérola' após 120 dias de cultivo *in vitro*.



Figura 9. Mudanças de abacaxizeiro 'Pérola' durante a aclimatização.



Figura 10. Mudanças de abacaxizeiro 'Pérola' aos 45 dias de aclimatização

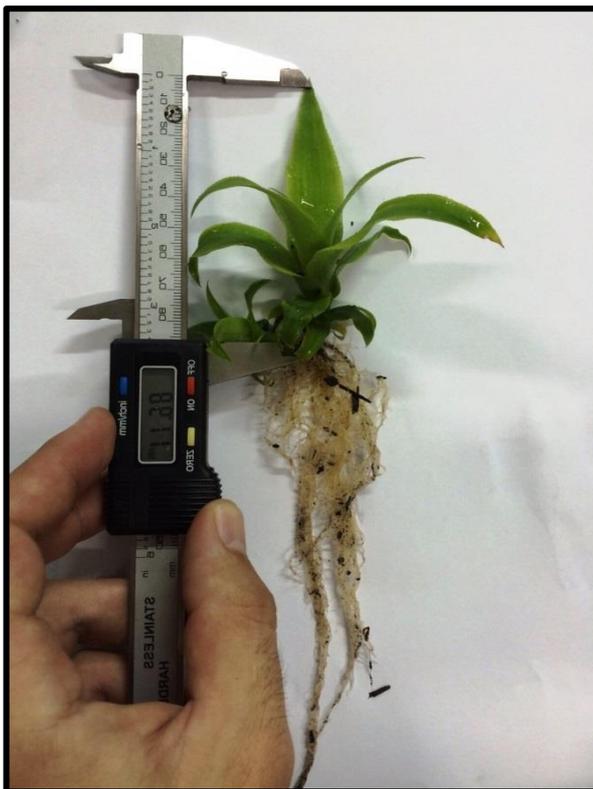


Figura 11. Determinação da altura da planta com auxílio de paquímetro digital.



Legenda: pinça utilizada para adaptação dos cloroplastos ao escuro.

Figura 12. Análise do Índice Fotossintético.

Tabela 1. Estimativa de custo dos reagentes PA e dos equivalentes comerciais utilizados no preparo do meio de cultivo MS.

Fonte mineral	Valor aproximado (R\$) para preparar:	Fonte mineral	Valor aproximado (R\$) para preparar:
Sais PA	1000,0 L	Sais Comerciais	1000,0 L
KNO ₃ *	362	FertiNK**	7,33
NH ₄ NO ₃ *	119	Nitrato de Amônio**	0,99
MgSO ₄ .7H ₂ O*	10,8	FertiMAGs**	0,47
KH ₂ PO ₄ *	13,6	FertiMAP**	0,59
CaCl ₂ .2H ₂ O*	11,44	Cloreto de Cálcio***	0,88
H ₃ BO ₃ *	0,19	FertiBORO**	0,02
Sacarose*	460	Açúcar cristal****	57,7
Subtotal	977,03	Subtotal	67,98
MnSO ₄ .4H ₂ O*	2,5	MnSO ₄ .4H ₂ O*	2,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O*	0,55	ZnSO ₄ .7H ₂ O*	0,55
KI*	0,25	KI*	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O*	0,14	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O*	0,14
CoCl ₂ .6H ₂ O*	3,15	CoCl ₂ .6H ₂ O*	3,15
CuSO ₄ .5H ₂ O*	1,30x10 ⁻³	CuSO ₄ .5H ₂ O*	1,30x10 ⁻³
FeSO ₄ .7H ₂ O*	1	FeSO ₄ .7H ₂ O*	1
Na ₂ .EDTA*	8,56	Na ₂ .EDTA*	8,56
Subtotal	16,15	Subtotal	16,15
Total	993,18	Total	84,13

*Valores cotados em Dezembro de 2015, referentes a reagentes da marca Vetec®

**Valores cotados em Dezembro de 2015, referentes a produtos da marca Heringer®

***Valor cotado em Dezembro de 2015, referente ao cloreto de cálcio da marca Cálciosol®

****Valor cotado em Dezembro de 2015, referente ao açúcar cristal da marca PAINEIRAS®