

# ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE ABACAXIZEIRO INFLUENCIADAS POR DIFERENTES SUBSTRATOS DURANTE O PROCESSO DE ACLIMATIZAÇÃO

## Morphophysiological changes of pineapple plants influenced by different substrates during the process of acclimatization

Franciane Tavares Braga<sup>1</sup>, Moacir Pasqual<sup>2</sup>, Evaristo Mauro de Castro<sup>3</sup>, Gabriel Coimbra Rafael<sup>4</sup>, Ana Carolina Favero<sup>5</sup>, Thaís Cainã Teixeira Valente<sup>4</sup>

### RESUMO

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

**Termos para indexação:** *Ananas comosus*, anatomia vegetal, cultura de tecidos.

### ABSTRACT

This work aimed to determine a right substrate for acclimatization of pineapple ‘Gomo de Mel’ plantlets and its anatomical characterization during this process. Rooting of the shoots was done in MS medium supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 6 g L<sup>-1</sup> agar. Cultures were maintained in growth room at 25±1° C, 36µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> during 16 hours. After 60 days, rooted shoots were removed from the bottles and distributed in tubes containing the following treatments: 1) A+X+H (sand, fern tree fiber and humus) (1: 1: 1); 2) commercial substrate Plantmax<sup>®</sup>; 3) vermiculite and 4) 1:1 combination of Plantmax<sup>®</sup> + Vermiculite. The anatomical characteristics were evaluated when the seedlings were still *in vitro* and in the 7th; 15th; 30th and 60th days of acclimatization. The transition leaves were also characterized. The experiment was installed in a randomized completely design, with four treatments and four replicates containing five plants. Higher lengths of roots, fresh and dry mass of roots and roots were observed with the use of sand + fern tree fiber + humus. Leaf number, fresh mass of roots and dry mass of roots did not show differences between substrates. Regarding the anatomical characteristics, the use of vermiculite substrate in the 60 days period of acclimatization promoted the highest thicknesses of the limb tissues.

**Index terms:** *Ananas comosus*, plant anatomy, tissue culture.

(Recebido em 11 de agosto de 2009 e aprovado em 23 de maio de 2011)

### INTRODUÇÃO

O processo de aclimatização envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para casa de vegetação. Essa passagem é crítica e representa em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Plantas que se desenvolveram heterotroficamente *in vitro*

sob condições de alta umidade passam a condições autotróficas de moderada ou baixa umidade, durante a aclimatização. Em razão da grande diferença entre os dois ambientes, é necessário que plantas micropropagadas passem por esse período de aclimatização antes da transferência para condições de campo (MOREIRA et al., 2007).

<sup>1</sup>Universidade do Estado da Bahia/UNEB – Departamento de Educação/DEDC – Paulo Afonso, BA

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras/UFLA – Departamento de Agricultura/DAG – Lavras, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Lavras/UFLA – Departamento de Biologia/DBI – Câmpus Universitário – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – emcastro@ufla.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Lavras/UFLA – Lavras, MG

<sup>5</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais/EPAMIG Uva e Vinho – Caldas, MG

Alguns fatores do processo de aclimatização estão diretamente relacionados e, dentre os mais importantes, estão a manutenção da umidade relativa alta dentro da casa de vegetação, as condições de sombreamento, o uso adequado de recipientes e substrato.

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

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

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

Neste trabalho, objetivou-se determinar um substrato adequado para as plantas micropropagadas de abacaxizeiro 'Gomo de Mel' por meio da caracterização morfofisiológica das mesmas durante o processo de aclimatização.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado de abacaxi encontrava-se já estabelecido *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-Benzilaminopurina).

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

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

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

A caracterização anatômica foi realizada por meio de: espessura das epidermes adaxial e abaxial, parênquima aquífero e clorofiliano. Essas avaliações foram realizadas nas plantas ainda *in vitro* e aos 7; 15; 30 e 60 dias, após aclimatização. As folhas de transição também foram caracterizadas. Para isso, utilizou-se a metodologia descrita por Kraus e Arduin (1997), utilizando-se o terço médio da segunda folha completamente expandida, coletadas de cinco plantas diferentes por tratamento, previamente fixadas em FAA 70% (formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940) por 72 horas e, posteriormente, conservadas em etanol 70% (v v<sup>-1</sup>). As seções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa tipo LPC, posteriormente submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio (1-1,25% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada, coloração com solução safrablau (azul de astra 0,1% e safranina 1%), as lâminas semipermanentes foram montadas com água glicerínada.

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de sobrevivência das plantas para os tratamentos Plantmax, Vermiculita e Plantmax + Vermiculita foi de 100%, porém, para o tratamento areia (A) + xaxim (X) + húmus (H) apenas 60% das plantas sobreviveram. As plantas desse tratamento morreram, em decorrência de possível contaminação, supostamente presente nesse substrato, causando nas folhas podridão e amarelecimento, levando as mesmas a murchar e conseqüente morte.

Melhores resultados foram observados para as variáveis comprimento e massa fresca de parte aérea e massa seca de raízes, onde, A+X+H apresentou maiores resultados para as duas primeiras variáveis, já, para massa seca de raízes A+X+H, Plantmax<sup>®</sup> e Plantmax<sup>®</sup>+Vermiculita apresentaram maiores médias, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 1). Esses resultados corroboram aqueles obtidos por Souza Júnior et al. (2001) onde verificaram que o uso de A+X+H e Plantmax<sup>®</sup> foram substratos eficientes na aclimatização de plantas de abacaxi cv. Pérola micropropagadas.

Número de folhas, massa fresca de raízes e massa seca de parte aérea não apresentaram diferenças significativas entre os substratos avaliados.

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

Folhas de abacaxizeiro na fase *in vitro* apresentam epidermes unisseriadas, estômatos apenas na superfície abaxial das folhas (hipostomática), parênquimas aquífero e clorofiliano pouco desenvolvidos e desorganizados, tricomas glandulares e tectores e fibras ao longo do parênquima clorofiliano (Figura 1).

Quanto às características do mesofilo de folhas na fase *in vitro*, apresentam parênquima aquífero, constituído por células grandes e parênquima clorofilado com células arredondadas.

Observou-se, também, que a cutícula é pouco desenvolvida nas faces adaxial e abaxial da epiderme. A presença de tricomas nas folhas de abacaxizeiro tanto na fase *in vitro* quanto durante o processo de aclimatização é uma característica que também foi observada por Barboza et al. (2006) e Silva et al. (2008). Tais estruturas podem representar adaptação morfológica que atua de modo a restringir a perda de água pelas folhas, por meio da regulação da temperatura e reflexão da luz que chega às folhas, e pode, ainda, secretar substâncias que protegem as folhas contra parasitas e predadores (LARCHER, 2000). Essas características são importantes para prevenir a excessiva perda de água na aclimatização, sendo essa a principal causa de morte das plantas durante esse processo.

No sétimo dia de aclimatização o parênquima aquífero de folhas oriundas dos tratamentos com substrato plantmax, plantmax+vermiculita e A+X+H, apresentou-se pouco desenvolvido e com células pequenas e achatadas, assim como, nas folhas *in vitro* (Figura 1). Para todos os tratamentos houve pouca diferenciação dos tecidos até o décimo quinto dia, demonstrando que maior diferenciação ocorreu somente a partir do trigésimo dia de aclimatização e maior deposição de cera na epiderme das folhas a partir desse período. Essas folhas podem ser denominadas primordiais *in vitro*, por assumirem características intermediárias entre folhas crescidas durante o processo *in vitro* e de aclimatização (SOARES, 2005).

Por outro lado, folhas de transição são folhas novas produzidas durante o período de aclimatização. Segundo Dignart et al. (2009), essas folhas podem conferir maior capacidade fotossintética, consequentemente aquisição de fotoautotrofia e de regulação hídrica às plantas. Foram observadas diferenças marcantes com relação a essas folhas, onde, os tecidos do mesofilo apresentaram-se uniformes para todos os tratamentos, com maior espessura do parênquima clorofiliano em relação ao aquífero, confirmando maior capacidade fotossintética, vasos de xilema e floema mais desenvolvidos e também maior deposição de cera epicuticular, conferindo assim, maior proteção e controle na perda de água (Figura 1).

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

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

Apesar do substrato A+X+H ter apresentado as maiores médias para as características que avaliam o crescimento, recomenda-se a vermiculita como substrato

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

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

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

para aclimatização de abacaxizeiro 'Gomo de Mel'. Essa escolha ocorreu pelas seguintes razões: 1) elevada taxa de mortalidade apresentada no substrato A+X+H; 2) não houve diferenças significativas em número de folhas, massa

fresca de raízes e massa seca de parte aérea; 3) folhas desenvolvidas em substrato vermiculita apresentaram as maiores espessuras de seus tecidos e 4) vermiculita tem custo inferior aos demais substratos.

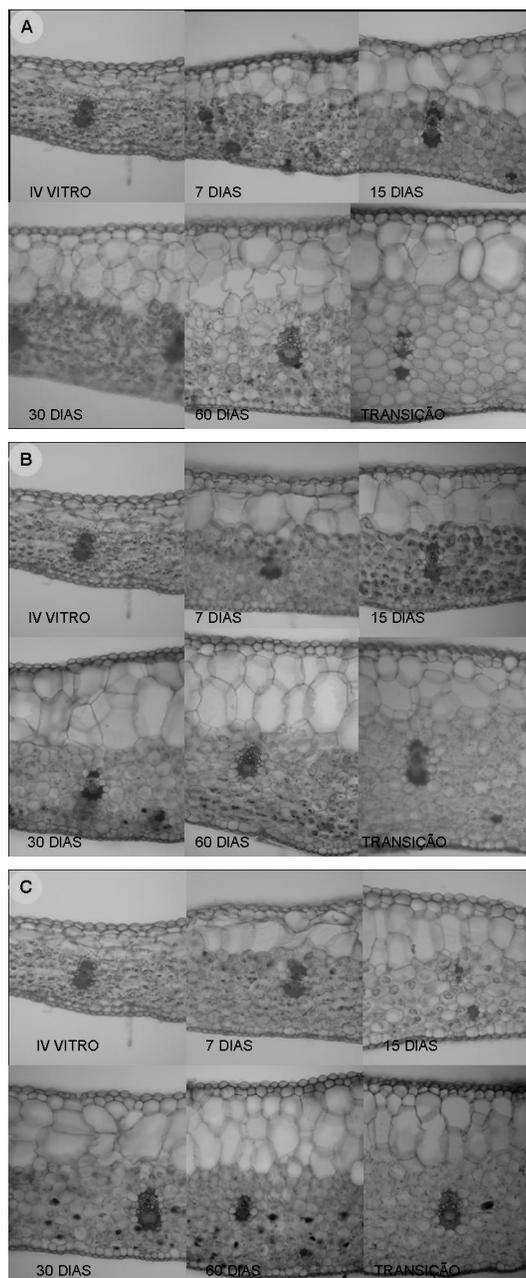


Figura 1 – Fotomicrografias de secções transversais de folhas de abacaxizeiro cultivadas in vitro e aclimatizadas com diferentes substratos e analisada no período de 7; 15; 30 e 60 dias e folhas de transição. (A) plantmax, (B) vermiculita, (C) plantmax + vermiculita e (D) A+X+H. Barra= 70µm. UFLA. Lavras, MG, 2009.

Tabela 2 – Epiderme abaxial e adaxial, parênquima clorofiliano e aquífero de folhas de abacaxizeiro desenvolvidas em diferentes substratos e período de aclimatização.

SUBSTRATO	PERÍODO DE ACLIMATIZAÇÃO (DIAS)					
	EPIDERME ABAXIAL ( $\mu\text{m}$ )					
	0	7	15	30	60	Transição
A+X+H	25,21aB	18,74aB	22,76aB	18,81aB	28,37bA	24,37aB
Plan + Verm	25,21aB	16,61aC	24,15aB	19,84aC	38,28bA	24,35bA
Plantmax	25,21aA	16,90aB	24,94aA	15,46aB	19,37cA	16,88bB
Vermiculita	25,21aB	17,84aC	15,76bC	19,86cA	39,96aA	19,63bB
EPIDERME ADAXIAL ( $\mu\text{m}$ )						
A+X+H	16,16aB	22,36aAB	20,25abB	16,93aB	28,30bA	21,80aAB
Plan + Verm	16,16aC	17,89abC	21,36aBC	19,62aBC	33,63bA	25,27aB
Plantmax	16,16aB	16,14abB	14,87bB	15,76aB	14,75cB	23,27aA
Vermiculita	16,16aBC	14,63bC	17,11abBC	18,51aBC	48,03aA	22,17aB
PARÊNQUIMA CLOROFILIANO ( $\mu\text{m}$ )						
A+X+H	146,78aC	144,60bC	158,34bC	152,77bC	308,36bA	258,13bB
Plan + Verm	146,78aD	174,75aC	185,19aC	190,09aC	322,90bA	258,63bB
Plantmax	146,78aD	136,20bD	155,30bD	184,30aC	220,76cB	297,99aA
Vermiculita	146,78aD	167,76aD	151,85bD	190,47aC	432,36aA	291,48aB
PARÊNQUIMA AQUÍFERO ( $\mu\text{m}$ )						
A+X+H	103,92aD	112,46bD	186,55aB	150,62bC	314,32bA	159,95aC
Plan + Verm	103,92aD	132,79aD	188,55aB	185,67bB	317,68bA	171,27aBC
Plantmax	103,92aCD	74,01bD	142,37cBC	186,75aA	134,56aA	168,90aAB
Vermiculita	103,92aC	134,32aV	146,26bBC	210,66aB	383,84aA	136,37aC

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

### CONCLUSÃO

Considerando-se a maior espessura dos tecidos do limbo foliar, quando se utiliza a vermiculita, este é o substrato recomendado para aclimatização de abacaxizeiro ‘Gomo de Mel’.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro recebido.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOZA, S.B.S.C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 185-194, 2006.

DIGNART, S.L. et al. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, 2009.

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

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

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw Hill, New York. 523 p. 1940.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. RiMa. São Carlos, SP. 531p. 2000.

MOREIRA, M.A. et al. Respostas à adubação NPK de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola em fase de aclimatização. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, v.3, n.1, p. 17-22, 2007.

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

SILVA, A.B. da. et al. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciencia**, v. 33, p.839-843, 2008.

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

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

TEIXEIRA, J.B. et al. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.3, p. 42-47, 2001.

TORRES, A. C. et al. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. 2001. 19 p. (Circular Técnica, 24).