Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Atuação de ácido β-naftoxiacético, ácido indolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro "Gomo-de-Mel"

Maysa Carvalho Barbosa

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Maysa Carvalho Barbosa
Biólogo

Atuação de ácido β-naftoxiacético, ácido indolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro "Gomo-de-Mel"

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Barbosa, Maysa Carvalho
Atuação do ácido β-naftoxiacético, ácido indolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro "Gomo-de-Mel" / Maysa Carvalho Barbosa. - - Piracicaba, 2009.
74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Abacaxi 2. Distúrbios de plantas 3. Micropropagação vegetal 4. Reguladores vegetais Rizogênese I. Título

CDD 634.774
B238a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

Á minha bisavó Laura Crivellaro, que sempre esteve ao meu lado e ao meu noivo Oscar Rudge Taylor de Brito por toda dedicação, por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa a realização de um sonho.

Ao Professor Dr. Marcílio de Almeida, pela orientação, pelo respeito, dedicação e confiança em mim depositada.

À Dr. Cristina Vieira de Almeida pelo auxílio, pela amizade, carinho, atenção e pelas correções.

À Cássia Regina Fernandes Figueiredo, pelo auxílio, pela amizade e pela doçura de suas palavras.

Ao Professor Dr. Francisco André Ossamu Tanaka, por toda atenção, carinho, amizade, dedicação.

Aos Professores Dr.Ricardo Ferraz de Oliveira, Dr.Lázaro Estáquio Pereira Peres, Dr.Murilo Mello, Dr. Elliot Watanabe Kitajima e Professora Drª Sandra Maria Carmello-Guerreiro.

À Maria Solizete Granziol Silva, por toda atenção, carinho e dedicação.

Ao Professor Dr. Ricardo Alfredo Kluge, pela atenção, respeito e confiança.

Aos colegas de curso Clarissa, Marcelo, Evandro, Marcos Vinicius, André Luiz, Fernando Edagi (K-ju) e Vanessa pelo auxílio e pela oportunidade de trabalhar em grupo nas disciplinas.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Ciências Biológicas e toda equipe nos serviços prestados.

Ao CNPq pela concessão de bolsa durante o curso.

Ao Núcleo de Pesquisa a Microscopia Eletrônica, por permitir as análises em microscopia eletrônica.

Às instituições: Faculdade de Ciências e Letras de Bragança Paulista e Universidade Federal de Lavras por contribuir na minha formação e especialização.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelo estágio, o qual também foi muito importante na minha formação.

Ao Professor Dr. Fernando de Oliveira pela honrosa contribuição na construção do meu conhecimento e pelas oportunidades ofertadas.

Aos professores: Drª Isabel Cristina Ercolini Barroso, Dr. Evaristo Mauro de Castro, Drª Nanuza Luíza de Menezes, Drª Verônica Angyalossy, Drª Gladys Flávia de

Albuquerque Mello-Pina, Gregório Cardoso Tápias Ceccantini por contribuir na construção do meu conhecimento ao longo desses anos.

Aos colegas de profissão Engº Carlos Eduardo da Silva Francisco e aos Biólogos Maurício Alexandre Mennella, Deborah Maria Ciarelli, Bruno Westmann Prado, Júlio César Algarve e Karina Cavalheiro Barbosa, pela troca de experiência e conhecimento.

A Paula Cristina Pinto Sebastião, pelas divertidas conversas no Frans Café.

Aos meus pais, Odir e Alvameria (Valmeri) pelo apoio para continuar em frente a vida acadêmica.

Aos companheiros: Júlio César, Nina, Mizael e ao Alexandre pela companhia nas leituras.

A D. Flora Anne Taylor de Brito e ao Sr. Oscar de Brito Neto que sempre foram atenciosos comigo.

A tia Maria Célia dos Santos que sempre foi carinhosa e engraçada e por ter me ensinado fazer o creme de "*Ananas comosus*" (abacaxi) sucesso na família!!!

À Magda Andréa Tessmer pela amizade, carinho, risadas e pelo churrasco gaúcho "mara"!.

Às meninas do pensionato ("virginato") Camila Cássia "Tigra", Ana Paula "Ursinha", Fátima, Michele, Fabiana (Flor-de-maracujá), Simone, Maryesa pela amizade, por momentos felizes, às idas ao "P.S.", pelo cuidado e por ser uma segunda família.

As maravilhosas e fofíssimas amigas de laboratório: Érika, Gabriela, Laura, Maria Luiza, Marcela, Monita, Natália e Thaís.

Aos colegas Gilvano e Heron pela atenção, respeito, amizade e auxílio.

À Carolina Vieira de Almeida e Lívia Vieira de Almeida pela amizade e apoio.

Ao meu noivo Oscar Rudge Taylor de Brito, por todo amor, dedicação, auxílio, enfim, por toda força.

Agradeço todo apoio, pois sem vocês este trabalho não teria sido concluído, Agradeço também as pessoas que passaram na minha vida e contribuíram de alguma forma na minha formação.

SUMÁRIO

RESUMO.....9
ABSTRACT.....11
LISTA DE FIGURAS.....13
LISTA DE TABELAS.....17
1 INTRODUÇÃO.....19
2 DESENVOLVIMENTO.....21
2.1 Revisão Bibliográfica.....21
2.1.1 Cultura de tecidos.....21
2.1.2 Hormônio Vegetal.....22
2.1.2.1 Auxinas.....22
2.1.2.2 Ácidos Naftóxiacéticos.....24
2.1.2.3 Ácido ß-Naftoxiacético.....25
2.1.2.4 Ácido indol-butírico.....26
2.1.2.5 Giberelinas.....27
2.1.3 Abacaxizeiros.....29
2.1.3.1 Cultivar *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. IAC “Gomo-de-mel” 31
2.1.3.2 Abacaxizeiros e a cultura de tecidos.....33
2.2 Objetivos.....34
2.2.1 Objetivo Geral.....34
2.2.2 Objetivo Específico.....34
2.3 Material e Métodos.....34
2.3.1 Local de instalação do experimento.....34
2.3.1.1 Material Vegetal.....35
2.3.2 Condições de Cultivo.....35
2.3.2.1 Cultura “in vitro”.....35
2.3.3 Variáveis Respostas.....36
2.3.4 Delineamento Estatístico.....37
2.3.5 Análise dos Dados.....37
2.3.6 Análises Anatômicas.....37

2.3.6.1 Microscopia de Luz.....37
2.3.6.1.1 Cortes histológicos.....37
2.3.6.1.2 Testes microquímicos.....39
2.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....39
2.4 Resultados.....40
2.4.1 Biorreguladores na altura, rizogênese e brotameno de microplantas de *A. comosus* cultivar IAC “Gomo-de-mel”.....40
2.4.2 Anatomia.....44
2.4.2.1 Descrição da anatomia foliar de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. IAC “Gomo-de-Mel” controle T1.....44
2.4.2.2 Alterações anatômicas foliares decorrentes dos tratamentos com diferentes concentrações e combinações de biorreguladores vegetais.....45
2.4.2.3 Testes Microquímicos.....49
2.4.2.4 Rizogênese foliar decorrente do tratamento com ácido ß-naftoxiacético.....50
2.5 Discussão.....56
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....63
REFERÊNCIAS.....65

RESUMO

Atuação de ácido β-naftoxiacético, ácido indolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro "Gomo-de-Mel"

Visando avaliar a atuação dos biorreguladores β-NOA, AIB e GA_3 na morfogênese de microplantas de abacaxi *Ananas comosus* L. (Merrill) cultivar IAC "Gomo-de-Mel" estabeleceu-se um experimento com a presença isolada e/ou combinada dos respectivos biorreguladores ao meio de cultura MS. As microplantas foram mantidas em condições de cultura *in vitro*, com temperatura, luminosidade e fotoperíodo controlados (25 ± 2°C, irradiância de 42 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ e 16 horas, respectivamente) durante 3 meses. Os resultados obtidos com a análise de variância evidenciaram que houve interação do biorregulador de crescimento e o tempo de cultivo para a altura, número de raiz e número de folhas. O β-NOA induziu a rizogênese foliar nas microplantas a partir de células da bainha do feixe vascular e não apresentou toxicidade nas concentrações utilizadas, ao passo que o AIB mostrou-se mais eficaz para a indução da rizogênese adventícia caulinar. Em relação ao crescimento das microplantas, a ação tanto isolada, como combinada em ambas as concentrações avaliadas de GA_3 foram mais eficientes. As análises histológicas evidenciaram alterações no número de estratos da epiderme, hipoderme e mesofilo das folhas cultivadas nos tratamentos com biorreguladores, porém não se verificou alterações citológicas em nenhum dos tratamentos. Acredita-se que a utilização de "pulsing" seja uma alternativa eficaz para a rizogênese e crescimento em altura das microplantas de abacaxizeiro "Gomo-de-mel".

Palavras chave: Rizogênese, estiolamento, cultura de tecidos, análises histológicas

ABSTRACT

β-Naftoxiacetic acid, indolbutyric acid and acid giberelic action in the pineapple microplants "gomo de mel" morphogenesis.

In order to evaluate the action of bioregulators β-NOA, IBA and GA_3 in the pineapple *Ananas comosus* L. (Merril) cultivar IAC "gomo-de-mel" microplants morphogenesis an experiment was stablished in order to the presence of the bioregulator alone and in combinations. The microplants were kept in culture in vitro conditions, during 3 months under controlled temperature, light and photoperiod (25 ± 2°C, irradiance de 42 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ e 16 hours). The analysis of variance showed the interaction interaction between the use of bioregulator and the period of cultivation on hight, number of roots and leaves. The β-NOA induced leaf rhizogensis in the microplants from the bundle sheath and there was no sign of toxicity with the used concentrations. The IBA showed to be more effective in the adventicious steam rhizogenesis. The isolated and combinated actions of GA_3 were the most effective treatment to microplants growing. The histological analysis showed alterations on the epidermis, hypodermis and mesophyll number of layers of the cultivated leaves with this bioregulator, but neither of the treatments showed citological alterations. It is believed that the use of "pulsing" would be an effective alternative for the rhizogenesis and growing of the "gomo de mel" pineapple microplants.

Keywords: rhizogenesis, blanching, tissue culture, histological analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Infrutescência de *Ananas comosus* (L) Merril cv. IAC “gomo-de-mel”.....32

Figura 2 - Representação dos frutilhos de *A. comosus* cv. IAC “gomo-de-mel” sendo destacados da infrutescência 32

Figura 3 - Microplantas de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC “gomo-de-mel” destacando a região do terço mediano das folhas utilizadas para as análises histológicas (retângulo) 38

Figura 4 - C.T. do mesofilo de microplantas de *A. comosus* cv. IAC “gomo-de-mel” cultivadas no tratamento T1. A: Microscopia de luz; B: Eletromicrografia de varredura. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial.....45

Figura 5 - C.T. da região central do mesofilo de microplantas de *A. comosus* cv IAC “gomo de mel”. A: cultivadas nos tratamentos T2, B: cultivadas no tratamento T3, C: cultivadas no tratamento T4, D: cultivadas no tratamento T5, E: cultivadas no tratamento, T6. F: cultivadas no tratamento T7. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial.....47

Figura 6 - C.T. região central do mesofilo foliar de microplantas de *A. comosus* cv IAC “gomo de mel”. A: cultivadas no tratamento T8, B: cultivadas no tratamento T9, C: cultivadas no tratamento T10, D: cultivadas no tratamento T11, E: cultivadas no tratamento T11. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial.....48

Figura 7 - C.T. região central do mesofilo foliar de microplantas de *A. comosus* cv IAC “gomo de mel” A: cultivadas nos tratamentos T12, B: cultivadas no tratamento T13, C: cultivadas no tratamento T14, D: cultivadas no tratamento T15. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial.....49

Figura 8 - Folhas de microplantas de *A. comosus* cv. IAC “gomo-de-mel” cultivadas na presença isolada de ßNOA (1,5 e 3,0 $mg.L^{-1}$). A e B: emitindo inúmeras

raízes morfologicamente perfeitas em ambas as superfícies. C: Detalhe da folha emitindo raízes na face adaxial. D: Corte transversal do limbo foliar na região de emissão de inúmeras raízes morfologicamente perfeitas em ambas as superfícies. E: Detalhe da epiderme adaxial da microplanta, com emissão de raízes morfologicamente normais. Ep Ad = Epiderme Adaxial; R = raiz.....51

Figura 9 - Eletromicrografia de varredura da face abaxial da folha de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T7 (3,0 mg.L^{-1}), detalhe para emissão da raiz rompendo as células da epiderme. RAd = raiz adventícia e Ead = epiderme adaxial, seta azul são pelos radiculares.....52

Figura 10 - C.T. de folhas de microplantas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivadas no tratamento T4 (1,5 mg. L^{-1} de ßNOA) detalhe para a região do feixe vascular evidenciando o início da divisão das células da bainha do feixe. Bfx = Bainha do Feixe, X = Xilema, F = Floema.....52

Figura 11 - C.T. de folha de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNO), detalhe para raiz adventícia emitindo radicela. Fx = reixe vascular, Rad = raiz adventícia.....53

Figura 12 - C.T. de folha de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T7 (3,0 mg.L^{-1} βNOA, detalhe para emissão de raiz a partir da comunicação transversal do feixe vascular. Rad = raiz adventícia, FX = feixe vascular e CFX = comunicação do feixe vascular.....53

Figura 13 - Eletromicrografia de varredura do mesofilo foliar de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNOA); A: detalhe da desestruturação tecidual do mesofilo na região de emissão da raiz adventícia. B: detalhe para mesofilo desestruturado emitindo raízes adventícias. Rad = raiz adventícia, ME = mesofilo, FX = feixe vascular.....54

Figura 14 - C.L. de raízes adventícias emitidas pelas folhas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivadas em T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNOA), A: detalhe da

epiderme com apêndices, córtex e cilindro vascular, B: detalhe tecido de revestimento na região apical apresenta-se com células vivas, inclusive emitindo pêlos radiculares. PRd = pêlo radicular, Ct = córtex, CV = cilindro vascular e ARd = Ápice Radicular.....54

Figura 15 - Eletromicrografia de varredura de raízes adventícias emitidas pelas folhas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T4 (1,5 $mg.L^{-1}$ de βNOA), A: detalhe da epiderme com tricomas, B: detalhe do ápice radicular com tecido vivo emitindo pêlos radiculares. Tc = tricoma e ARd = Ápice radicular.....55

Figura 16 - Eletromicrografia de varredura de raízes adventícias emitidas pelas folhas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada em T7 (3,0 $mg.L^{-1}$ de βNOA), A: detalhe da estrutura geral das raízes evidenciando epiderme com tricomas, córtex e cilindro vascular, B: detalhe do cilindro vascular. Ct = córtex, CV = cilindro vascular, Ep = Epiderme, Ed = endoderme e Pr = periciclo.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações e combinações de biorreguladores utilizados no meio de cultura para as microplantas de *Ananas comosus* (L.) cv IAC "gomo-de-mel".....36

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e número de brotos (NB) de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função das concentrações de biorreguladores de crescimento e tempo de cultivo *in vitro*.....40

Tabela 3 - Valores médios da altura de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função do tratamentos e tempo de cultivo *in vitro*.....41

Tabela 4 - Valores médios do número de raízes (NR) de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função das concentrações de reguladores de crescimento e tempo de cultivo *in vitro*.....42

Tabela 5 - Valores médios do número de folhas de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função das concentrações de reguladores de crescimento e tempo de cultivo *in vitro*.....43

Tabela 6 - Valores médios do número de brotações de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função do tempo de cultivo *in vitro*.....44

1 INTRODUÇÃO

Na cultura de tecidos vegetais a capacidade de resposta morfogênica para o alongamento e expansão celular é essencialmente atribuída às auxinas, principalmente em relação ao enraizamento de microplantas.

O acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultura é uma prática bastante comum, normalmente aplicada como estratégia para a indução da desdiferenciação e diferenciação celular induzindo a formação de gemas adventícias e ainda o enraizamento dessas. Dentre as auxinas, as mais utilizadas no cultivo *in vitro* são o ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB). Entretanto, na década de 50, muitas pesquisas foram conduzidas com outra auxina sintética o ácido β-naftoxiacético (βNOA).

Inúmeros trabalhos apontavam a auxina βNOA como uma substância responsável pela rizogênese e florescimento de espécies vegetais. Contudo, devido a sua origem metabólica estar associada ao ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), o qual apresenta forte atuação herbicida, seu uso foi muito discutido na década de 50 por fisiologistas e quase abolido por cerca de vinte anos, por apresentarem resultados conflitantes de indução e inibição e também por que não ofereciam garantias de sucesso no enraizamento, além disso, acreditava-se que tal regulador pudesse ser tóxico às plantas, ao manipulador e ao meio ambiente. Ainda assim, nos últimos 30 anos alguns pesquisadores fazem referências ao seu uso, comumente aplicado na obtenção de calos, e em alguns casos, no enraizamento de espécies recalcitrantes, desmitificando dessa forma os problemas enumerados na década de 50.

No período em que foi abolido o uso do β-NOA, as auxinas AIA, ANA e AIB passaram a ser utilizadas com freqüência, sendo que suas ações nas plantas *in vitro* passaram a ser intensamente avaliadas em relação ao desenvolvimento da parte aérea, enraizamento e obtenção de gemas adventícias. O sucesso do enraizamento das microplantas é um pré-requisito para qualquer protocolo de propagação, principalmente por facilitar o estabelecimento da muda no solo.

Muitos trabalhos são publicados evidenciando pesquisas com reguladores de crescimento na micropropagação de espécies vegetais e além dos efeitos das auxinas

supracitadas, citocininas e giberelinas também são bastante estudadas, sendo esse último grupo de biorreguladores normalmente aplicado para o estiolamento de microplantas.

O ácido indol-butírico (IBA) é muito provavelmente a auxina sintética mais utilizada tanto para o enraizamento *in vitro*, como *in vivo* de plantas, auxiliando ainda o desenvolvimento da parte aérea, favorecendo desta forma a aclimatização.

As giberelinas incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas, tendo como principal efeito o estímulo do crescimento de novos órgãos, podendo ainda ser explorada *in vitro,* por facilitar a individualização dos propágulos, quando estes não estão em condições de serem individualizados para o enraizamento, devido ao seu pequeno tamanho.

A espécie vegetal *Ananas comosus* L. (Merrill) cultivar IAC “Gomo-de-Mel” foi escolhida como planta modelo para o presente estudo, devido à facilidade de obtenção de propágulos, por ter protocolo estabelecido para o cultivo *in vitro*, por apresentar respostas fisiológicas imediatas, por sua estrutura anatômica ser conhecida e ainda por se destacar dentro da família Bromeliaceae como o gênero de maior importância econômica.

Visando estabelecer se os biorreguladores β-NOA, AIB e GA_3 isoladamente ou combinados alteram a capacidade morfogênica de enraizamento, brotação e estiolamento do abacaxi; se o β-NOA apresenta toxidez para a espécie nas concentrações recomendas; e ainda se ocorrem alterações estruturais decorrentes da ação isolada ou combinada dos biorreguladores, o presente trabalho teve por objetivo, avaliar a ação isolada das auxinas AIB e βNOA na rizogênese *in vitro* de *Ananas comosus* L. (Merrill) cultivar IAC “Gomo-de-Mel” ou combinadas a giberelina GA_3 no brotamento e estiolamento de microplantas da espécie.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Cultura de tecidos

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas, nas quais, um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial. Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula de organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (PASQUAL et al., 2001; GALLO; CROCOMO, 1995).

Embora, Mathias Schleiden e Theodor Schwann (1938) não tenham imaginado uma metodologia como a cultura de tecidos, a teoria da totipotencialidade pode ser dita como um constituinte dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro* (CID, 1998).

A totipotencialidade considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar um novo indivíduo celular (TORRES et al., 2000).

A propagação de espécies vegetais “in vitro” apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, como a multiplicação maciça e rápida de clones em qualquer época do ano, e eliminação de vírus (GALLO; CROCOMO, 1995). Representa ainda uma técnica não somente importante para as práticas florestais, agrícolas, como também na científica básica, sendo o campo da biologia das plantas uma das técnicas mais polivalentes (CID, 1998).

Uma ferramenta que constitui um papel importante no cultivo *in vitro* é a aplicação de reguladores de crescimento, por auxiliarem na formação de gemas, indução de raízes, entre outros (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

2.1.2 Hormônio Vegetal

Hormônio vegetal é um composto orgânico, não nutriente, de ocorrência natural, produzido pela planta, que em baixas concentrações (10^{-4} M) promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal e sua ação depende das condições ambientais de acordo com as características e potencialidades genéticas da planta (CASTRO et al., 2002; 2005).

Tradicionalmente são reconhecidos cinco grupos de hormônios vegetais, auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno. Recentemente foi reconhecido um sexto grupo, os brassinoesteroídes, como sendo normal no desenvolvimento de plantas (HOPKINS; HÜNER, 2004).

O conhecimento a respeito dos locais de produção, biossíntese, vias de transporte, estrutura química, mecanismos de ação e efeitos fisiológicos dos diferentes grupos de hormônios vegetais são importantes para estudos que visam alterar respostas fisiológicas das plantas, através da manipulação destas substâncias e/ou de seus similares sintéticas (CASTRO et al., 2002).

Cabe ressaltar que reguladores vegetais são caracterizados como substâncias sintéticas que, quando aplicadas exogenamente, apresentam ações similares aos grupos de hormônios vegetais (CASTRO et al., 2005).

2.1.2.1 Auxinas

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto, e os primeiros estudos fisiológicos acerca do mecanismo de expansão celular vegetal foram focalizados na ação desse hormônio. A auxina natural mais abundante é o ácido indolil-acético (AIA), entretanto, dependendo da espécie, idade da planta, estação do ano, e condições ambientais, outras auxinas naturais podem ser encontradas, como um análogo clorado do AIA, o ácido 4 cloroindolil-3-acético (4-cloro AIA), o ácido fenilacético e o ácido indol-3-butírico (AIB). De modo geral, para as auxinas naturais emprega-se o termo hormônio ou fitormônio, e as auxinas sintéticas são denominadas de reguladores de crescimento vegetal (KERBAUY, 2008).

Essas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido-indol-3-acético (AIA), considerada a principal auxina de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular de cultura de tecidos, principalmente no enraizamento. Segundo Alvarenga (1990), entre as principais funções biológicas das auxinas, pode-se citar o crescimento de órgãos, especialmente raízes.

O acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultivo é utilizado para suprir possíveis deficiências endógenas e melhorar as características de cultivo *in vitro* (TORRES et al., 1998). Os reguladores de crescimento comumente usados são: o ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), ácido indol-butírico (IBA), ácido β-naftoxiacetico (βNOA), Dicamba e Picloram Entretanto, o IBA é o que mais se destaca pelo uso (CANTERLE et al., 2007).

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente pelas auxinas e citocininas (GEROGE; SHERRINGTON, 1984).

O tipo de meio de cultura, de auxina e suas concentrações são as variáveis que, em geral, mas influenciam no enraizamento, e variam conforme a espécie e a cultivar. Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Por esta razão, recomenda-se a utilização de dois meios de cultura para a rizogênese (LEITZKE et al., 2009).

O processo de formação de raízes *in vitro* divide-se em indução, iniciação e alongamento de raízes. Nas duas primeiras fases o uso de auxina para indução tem apresentado sucesso, contudo na terceira fase a presença da mesma pode inibir o crescimento radicular. São diversas as auxinas que podem ser utilizadas na indução do enraizamento. O AIB, ANA e AIA têm sido os mais utilizados cujas concentrações mais comuns estão na faixa de 0,1 a 1,0 mg L-1 (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As auxinas juntamente com as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (SKOOG; MILLER, 1957). O efeito desses

reguladores pode estar relacionado com os fatores genéticos próprios de cada espécie (MORALES, 1990).

As auxinas apesar de promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento da cultura (HU; WANG, 1983). Umas das principais ações da auxina no meio de multiplicação seria a anulação do efeito supressivo das altas concentrações de citocinina sobre a elongação das brotações axilares, restaurando o crescimento normal das mesmas (LUNDERGAN; JANICK, 1980).

As respostas às auxinas, no entanto, não são universais. Certas espécies, principalmente as lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e por outro lado, algumas espécies até dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (ROHR; HANUS, 1987).

2.1.2.2 Ácidos Naftóxiacéticos

Os ácidos β-naftoxiacéticos são derivados do ácido diclorofenoxiacético (2-4-D) e se subdividem em 1-naftóxiacético (1-NOA) e 2-naftoxiacético (2-NOA), os quais também podem ser encontrados como α-naftoxiacético (αNOA) e ß-naftoxiacético (ßNOA), respectivamente (AVERY et al., 1942). Nutman e Thornton (1945) num estudo de substâncias de inibição de crescimento vegetal e substâncias afins, citam que o 2-4 D e seus derivados como os ácidos naftóxiacéticos são tóxicos, devido à semelhança estrutural.

Posteriormente, o uso do ácido diclorofenoxiacético (2-4-D) e dos ácidos naftoxiacéticos foi discutido na Terceira Conferência Internacional de Substâncias de Crescimento Vegetal (1955), pelo Professor Buström da Universidade de Lund, tanto pela toxicidade quanto pela eficácia nos resultados conflitantes obtidos de indução e inibição do crescimento de raízes. Por essa razão os ácidos naftoxiacéticos, passaram a serem menos empregados nas décadas de 60 e 70.

Nos últimos 30 anos, sua potencialidade passou a ser estudada e discutida novamente, tanto como regulador de crescimento vegetal nas suas diferentes formas (α e ß), onde se destaca os trabalhos de Hughes e Dobson (2004), como as de Qureshi e Buttar (1989) que avaliaram o ácido naftoxiacético como metabólito secundário do

medicamento propanolol (substância que controla a hipertensão em humanos) em pesquisas farmacocinéticas.

2.1.2.3 Ácido ß-Naftoxiacético

O ácido ß-naftoxiacético é uma substância que tanto pode estimular quanto inibir o crescimento de acordo com a concentração utilizada, atuando na indução de primórdios de raízes (BAUSOR, 1939a), foi descrito pela primeira vez por Irvine (1938) como uma substância de crescimento, sendo reportando na ocasião pelo crescimento e florescimento de *Brassica* (BAUSOR et al., 1940).

Dentre os muitos trabalhos com ácido ß-naftoxiacético, Bausor et al. (1942), citaram que o seu uso, diluído em lanolina, acelerava a degradação de amidos em folhas de feijoeiro.

Overbeek et al. (1951), constataram que o ácido ß-naftoxiacético mesmo sendo reconhecido como regulador de crescimento com forte habilidade de efeitos de indução e formação, semelhante a auxina, não operava efetivamente como herbicida em baixas dosagens, como outras auxinas.

O ácido ß-naftoxiacético se agrupa num típico exemplo de componentes químicos similares as auxinas, as quais apresentam muitas diferenças qualitativas da capacidade de resposta fisiológica de indução, pois há modificação dos novos órgãos (folhas, caules, flores e frutos) quando são formados após o tratamento das substâncias (ZIMMERMAN, 1941).

Charles (1959) faz referência ao uso do ácido 2-naftoxiacético em diferentes níveis de concentração, e relatou ser uma substância fortemente estimulatória de crescimento, entretanto apresentou ação letal para a espécie *Senio vulgaris* L. e três cultivares.

Posteriormente, o ácido ß-naftoxiacético passou a ser empregado em pesquisas de embriogênese somática nos trabalhos de Rodrigues et al. (1987), Amin (2000), Eapen e George (1993), Carimi et al. (2005) e Vidal et al. (2009), estes autores citaram que o ácido ß-naftoxiacético apresentava-se mais eficiente do que as demais auxinas empregadas.

Gökmen e Acar (1998) relataram que o ácido ß-naftoxiacético é registrado como um regulador de crescimento de plantas, entretanto, enfatizaram que pouco se conhece sobre a concentração máxima permitida para o uso e sua atuação, salientando a necessidade de ampliar estudos sobre esta substância.

Outras auxinas sintéticas, como o 2,4-D, Picloram, ácido β-naftoxiacético (βNOA) e ácido p-clorofenoxiacético (ApCFA) estimulam a produção de calos, não sendo comuns em trabalhos de enraizamento (TORRES et al., 1998). Hu e Wang (1983), verificaram que 86% dos meios de cultura para enraizamento continham auxina, e que o ANA pareceu ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*. Ela aparece em 53% dos meios de cultura contra 29% para o IBA, 11% para o AIA, 3,6% para o 2,4-D e 3,6% para outras auxinas.

2.1.2.4 Ácido indol-butírico

O ácido indol-butírico (AIB) é provavelmente a principal auxina sintética de uso geral, porque não é tóxica para a maioria das plantas, mesmo em altas concentrações, é bastante efetiva para um grande número de espécies e relativamente estável, sendo pouco suscetível a degradação de auxinas (PIRES; BIASI, 2003).

O AIB, sendo uma auxina sintética, é mais estável e menos solúvel que a auxina endógena, o ácido indolacético (AIA), considerado um dos melhores estimuladores do enraizamento (BOTELHO, 2003).

De acordo com Bartel et al. (2001), pesquisas recentes têm mostrado que o ácido indolbutírico, além de agir como auxina, pode ser ele próprio uma forma de armazenamento do AIA, já que por um mecanismo de oxidação que ocorre nos peroxissomos, esse composto pode se converter em AIA livre.

A utilização de AIB para indução de raízes *in vitro* tem sido comercialmente aplicada a muitas espécies além de auxiliar o desenvolvimento da parte aérea, favorecendo a fase de aclimatização (TITON et al., 2003). O AIB é uma auxina pouco translocável na planta com efeito localizado na região aplicada (Ludwig-Müller 2000).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998) uma das auxinas mais utilizadas na indução do enraizamento é o AIB (ácido indolbutírico), que em associação com outras

auxinas podem promover maior número de raízes do que isoladamente (HARTMANN; KESTER, 1983).

Dentre os trabalhos de eficácia do ácido indol-butírico (AIB), destacam-se o enraizamento de três tipos de estaca de *Allamanda cathartica* (LOSS et al., 2008), rizogênese de *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al., 2008), enraizamento de mirtilo (SOARES et al., 2006) sendo posteriormente corroborado por Leitzke et al. (2009). Contudo, apresenta resultados variáveis, conforme a espécie ou cultivar utilizada, tipo de estaca, época do ano ou concentração, entre outras (FACHINELLO et al.,1995).

Entretanto, alguns autores discordam de sua efetividade para algumas espécies de lenhosas como ameixeira e jabuticabeira (KERSTEN, 1993; CASSOL et al., 2009).

2.1.2.5 Giberelinas

As giberelinas são compostos terpênicos, formados de unidades isopropênicas (TAIZ; ZEIGER, 2002), constituintes de uma classe de hormônios capaz de modular o desenvolvimento durante todo o ciclo da vida da planta. Apesar da importância indiscutível das giberelinas no desenvolvimento de plantas superiores, de maneira curiosa esse grupo de substâncias foi descoberto por meio de pesquisas como o fungo *Giberella fujikuori*, demonstrando que as giberelinas não ocorrem exclusivamente em plantas (KERBAUY, 2008).

Os principais sítios de biossíntese das giberelinas são tecidos vegetativos em rápido crescimento, sementes e frutos em desenvolvimento. A localização das moléculas de RNAm dos genes de biossíntese de GA indica um padrão complexo que varia de acordo com o estágio de desenvolvimento de cada espécie. Constata-se que a expressão dos genes promotores de giberelina ocorre em maior grau nos ápices radiculares e caulinares em relação aos demais tecidos da planta (KERBAUY, 2008).

As giberelinas participam de muitas atividades fisiológicas importantes nos vegetais, com efeito no crescimento, especialmente no alongamento celular (CROCOMO; CABRAL, 1988). Além disso, as giberelinas, tem como principal efeito estimular o crescimento de novos órgãos, entretanto, podem inibir a iniciação de outros órgãos (MURASHIGUE, 1974; GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

De acordo com Taiz e Zeiger (2002) as giberelinas incrementam tanto a divisão celular quanto o alongamento das células formadas. Além disso, as giberelinas causam alongamento das células da folha pelo aumento da plasticidade da parede celular, levando um aumento na captação de água e na pressão da turgescência (RAVEN et al., 2001).

No meio de cultura de plantas micropropagadas a giberelina, na forma de ácido giberélico (GA_3), pode ser útil para induzir o alongamento de partes aéreas. Sua inclusão é pouco freqüente em vista de um suprimento endógeno suficiente. As giberelinas são usadas, algumas vezes, na fase de multiplicação. O mais conhecido efeito desse grupo de hormônios, o alongamento de partes aéreas, e pode ser explorado *in vitro* quando as partes aéreas produzidas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu pequeno tamanho (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Outros benefícios desse regulador de crescimento são os de promover o desenvolvimento ontogênico natural dos embriões sem primórdio radicular, aqueles com primórdio e proporcionar a iniciação de uma zona radicular existente. Em alguns casos, o ácido giberélico tem sido usado para a conversão de embriões somáticos em plantas (GUERRA et al., 1998). A concentração de 1 mg L^{-1} de GA_3 estimulou a formação de raízes em embriões somáticos de nucelos de *Citrus* (BUTTON; BORGNMAN, 1971).

A aplicação exógena do ácido giberélico sobre variantes somaclonais para altura de plantas em bananeiras mostrou que o fitorregulador, ao ser aplicado, provoca crescimento acelerado. Da mesma forma, um decréscimo significante na produção foliar e de raiz foi observado em todas as plantas tratadas com GA_3 (SANDOVAL, 1999).
Em alguns casos, o GA_3 pode não apresentar efeito ou inibir o desenvolvimento (CALDAS, et al., 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PAIVA et al., 1997).

2.1.3 Abacaxizeiros

O abacaxizeiro é uma monocotiledônea herbácea perene pertencente à família Bromeliaceae com distribuição neotropical. Apresenta cerca de 3010 espécies distribuídas em 56 gêneros (SOUZA; WANDERLEY, 2007).

No Brasil, há representantes distribuídos em quase todos os ecossistemas, desde o nível do mar até as regiões montanhosas de altitudes mais elevadas (SOUSA; WANDERLEY, 2007).

A família se destaca por ser uma das principais componentes da flora brasileira, abrigando aproximadamente 36% das espécies catalogadas com vários gêneros endêmicos, alguns deles encontrados apenas na Floresta Atlântica (MOREIRA et al., 2006).

O gênero mais importante do ponto de vista econômico da família Bromeliaceae é o gênero *Ananas*, pois nele está incluído o abacaxi comestível *Ananas comosus* L. Merrill, dentro do qual figuram inúmeras variedades hortícolas e também outras espécies que são utilizadas para a produção de fibras ou para ornamentação (CUNHA; CABRAL, 1999). Ademais, segundo Lorenzi e Matos (2002) *Ananas comosus* é uma espécie considerada detentora de reconhecidas propriedades medicinais. De acordo com Usbert Filho (1999) o Brasil é o segundo maior produtor de abacaxi do mundo sendo os principais Estados produtores: Minas Gerais, Paraíba, Pará e São Paulo.

Segundo Margarido (1991) no que se refere à morfologia externa do abacaxizeiro este apresenta um caule (talo) curto e grosso, de onde partem folhas em forma de calha, estreitas e rígidas, e no qual se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, encontrado geralmente a uma profundidade de 15 a 30 cm da superfície do solo. O modo como a folha do abacaxizeiro se insere no caule determina os tipos de planta: ereta, semi-ereta e tende a horizontal.

As folhas são rígidas com ceras nas superfícies superiores e protegidas na parte inferior por uma camada de tricomas que reduzem a transpiração. Na base do caule localizam-se as folhas mais velhas com formato de lança, e as mais novas apresentam-se alongadas, conservando a parte basal mais larga (MARGARIDO, 1991) Na presença de cordões fibrosos, as folhas desenvolvem-se no caule em forma de espiral. Rebentos e mudas que se desenvolvem a partir de gemas axilares, localizadas

no caule, classificados em filhotes (pedúnculos abaixo do fruto), filhote e rebentão (na conexão caule-pendúnculo) e rebentão (na parte inferior do caule (MARGARIDO, 1991). A Inflorescência apresenta cerca de 100 a 200 individuais arrumadas em torno do eixo. O abacaxizeiro apresenta fruto múltiplo (sincárpico) resultante do desenvolvimento da inflorescência com coroa ou pequeno caule foliáceo, que se forma no topo da infrutescência (MARGARIDO, 1991).

Com relação à morfologia interna, segundo Kraus (1948) a epiderme da folha do abacaxizeiro é constituída de células de formato poligonal apresentando tricomas multicelulares e estômatos na face abaxial coberta por cutícula. A hipoderme consiste de cerca de três a quatro camadas de células com espessamentos pronunciados nos cantos, lembrando um colênquima. O mesofilo é constituído por células de parênquima clorofiliano e as células apresentam cloroplastos de três formas: discoidal, lipsoidal e esférico.

Com relação à bainha do feixe, Kraus (1948) a classifica como bainha endodérmica, considerando trabalhos realizados com bromeliáceas. O autor salienta ainda que, a bainha na forma de endoderme é constituída de uma única camada com células de passagem. O feixe vascular é do tipo colateral, onde a presença de protoxilema e metaxilema, parênquima de xilema, lacunas, protofloema, metafloema, células do tubo crivado e parênquima de forma, sendo a região floemática envolta por uma bainha fibrosa.

2.1.3.1 Cultivar *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. IAC “Gomo-de-mel”

Introduzido da China em 1991, juntamente com outros tipos de material genético, o novo cultivar de abacaxi (IAC Gomo-de-mel ou abacaxi-de-gomo), provavelmente resultante de cruzamento natural, foi incorporado, no mesmo ano, ao banco de germoplasma de abacaxizeiros do Instituto Agronômico, em Campinas (Figura 1) (USBERTI FILHO, 1999).

O nome se deve ao fato de os frutilhos, "olhos", serem soldados menos fortemente entre si, ao contrário do que ocorre em outros cultivares e introduções, podendo ser facilmente destacáveis, no fruto maduro (Figura 2).

O novo cultivar IAC “Gomo-de-Mel” reúne um conjunto de características atraentes para o comércio, como doçura, baixa a moderada acidez, consistência tenra, suculência e coloração amarelo-ouro. Apresenta plantas altas (80 cm), com número elevado de folhas (40), compridas, largas e espinhosas em toda a extensão do bordo da lâmina foliar, e de coloração verde-escura. O ciclo total, do plantio à maturação de frutos, é de 19,5 meses. Os frutos são pequenos, de formato quase cilíndrico, com casca de espessura média, de coloração amarelo-ouro (no fruto maduro) (USBERTI FILHO, 1999).

Os frutilhos são grandes e salientes, o que, provavelmente, pode conferir maior resistência ao transporte. A porcentagem de sólidos solúvel (^{o} Brix) é muita elevada e praticamente semelhante na base, meio e ápice do fruto. Apresenta baixa acidez titulável e teor de vitamina C semelhante ao do 'Smooth Cayenne' e menor do que o do 'Pérola’. Também é suscetível a fusariose, como os cultivares em distribuição comercial, mas apresenta moderada resistência a nematóides (USBERTI FILHO, 1999).

O cultivar também é destacado por apresentar boa "vida-de-prateleira" quando maduro (até 12 dias, em condições ambientes), maior do que dos cultivares tradicionais, talvez em virtude da sua provável maior resistência ao transporte (USBERTI FILHO, 1999).

A despeito da importância de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. IAC “Gomo-de-Mel poucas contribuições são encontradas na literatura, destacando-se então os trabalhos de Brito et al. (2005) sobre características da atividade das peroxidases; Batagin et al. (2008) que analisou a morfo-anatomia da folhas de plantas cultivadas em diferentes ambientes e o trabalho de Araújo et al. (2008) sobre estiolamento “in vitro”.

Figura 1 - Infrutescência de *Ananas comosus* (L) Merril cv. IAC “gomo-de mel”
Fonte: Usberti Filho (1999)

Figura 2 - Representação dos frutilhos de *A. comosus* cv. IAC “gomo-de-mel” sendo destacados da infrutescência
Fonte: Usberti Filho (1999)

2.1.3.2 Abacaxizeiros e a cultura de tecidos

Os primeiros trabalhos usando micropropagação de abacaxi foram realizados por Aghion e Beauchesne (1960). Guerra (1999) relatou que na década de 70, houve uma progressiva redução na área cultivada de abacaxi, devido ao ataque progressivo de fusariose, causada por *Fusarium moniliforme* Shield var. *subglutinans* WR, que associada à ocorrência da broca-do-fruto (*T. basalides* Geyer) resultou em sérios

problemas para a abacaxicultura catarinense e brasileira. Desde então, muitos artigos foram publicados destacando-se o de Rangan (1984), que estabeleceu um dos primeiros protocolos para a micropropagação. De acordo com o mesmo autor, técnicas de cultura de tecidos estão sendo aplicadas para a micropropagação clonal de variedades cultivadas em diversos países da América Central e da Ásia.

Zepeda e Sagawa (1981) citaram que a micropropagação do abacaxizeiro a partir de um único explante é eficiente na produção de mudas. Além disso, o cultivo do abacaxi “in vitro” tem apresentado vantagens em relação aos métodos de propagação tradicionais, pois permitem a produção de cerca de 5000 plantas em um ano partindo-se de uma única coroa.

De acordo com Devi (1997) em uma lavoura são necessários cera de 8 novas mudas a partir de uma única planta. Para tanto, inúmeros autores estabeleceram protocolos para multiplicação de abacaxizeiros “in vitro”. Ademais, é importante ressaltar que o processo de micropropagação tem como um dos maiores problemas a transferência de planta “in vitro” para “ex vitro”.

A micropropagação do abacaxizeiro é normalmente mais demorada que outras espécies, pois a produção de plantas não é conseguida antes de 9 a 12 meses depois do início das culturas, porém esse obstáculo pode ser superado com novos estudos para reduzir o tempo (MOREIRA, 2003). Para tanto, Kiss et al (1995) propuseram um novo método de propagação rápida de abacaxi, baseado, no alongamento de brotos induzidos “in vitro” por meio de estiolamento.

No estabelecimento do protocolo de abacaxizeiros ornamentais, foi verificado maior potencial de multiplicação em meio gelificado do que em meio MS líquido (QUIRINO et al., 2009).

Um sistema eficiente de micropropagação pode permitir um rápido aumento de material para a propagação. Além disso, variações que podem ocorrer na cultura de tecidos podem ser utilizadas como fonte de variabilidade genética, visto que a maioria das variedades de abacaxi são mutantes, que foram selecionados e propagados. A metodologia para micropropagação de abacaxi consiste basicamente, em desfolhar as mudas e dos talos são retirados as gemas, em ambiente asséptico, para obtenção de brotações (MOREIRA, 1999).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral:

- Estabelecer a ação isolada das auxinas (AIB, βNOA) ou combinadas a giberilina (GA_3) na morfogênese *in vitro* do abacaxi “gomo de mel”.

2.2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar e quantificar as respostas fisiológicas *in vitro* de enraizamento, brotamento e crescimento, das microplantas de abacaxi “gomo de mel” em relação aos biorreguladores;
- Verificar a possível ocorrência de alterações estruturais por meio de microscopia de luz e eletrônica de varredura das microplantas decorrentes da aplicação dos biorreguladores;
- Estabelecer a ocorrência ou não de fitotoxidade do biorregulador ácido β-naftoxiacético, na cultura *in vitro* de microplantas de abacaxi “gomo de mel”.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Local de instalação do experimento

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas no Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), Piracicaba-SP.

2.3.1.1 Material Vegetal

Foram utilizadas setenta e cinco microplantas de abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. IAC Gomo-de-mel desenvolvidas a partir da cultura de meristemas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) básico acrescido de sacarose ($30g.L^{-1}$), mioinositol ($100mg.L^{-1}$) e tiamina ($5ml.L^{-1}$).

Para realização do experimento as microplantas foram cultivadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura e acondicionadas em sala de

crescimento com temperatura e luminosidade controladas (25 ± 2°C e irradiância de 42 $\mu mol.m^{-2}s^{-1}$, respectivamente), em fotoperíodo de 16 horas, durante 3 meses.

2.3.2 Condições de Cultivo

2.3.2.1 Cultura "in vitro"

As microplantas cultivadas em meio de cultura MS (Murashigue e Skoog, 1962) isento de reguladores vegetais foram transferidas para meios suplementados com os biorreguladores AIB (ácido indolbutírico), β-NOA (ácido β-naftoxiacético) e GA_3 (ácido giberélico) estabelecendo-se dessa forma, 15 tratamentos descritos na Tabela 1. O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem a 121ºC e 1,5 atm, por 20 minutos.

Tabela 1 - Concentrações e combinações de biorreguladores utilizados no meio de cultura para as microplantas de *Ananas comosus* (L.) cv IAC "gomo-de-mel"

Tratamentos	Biorreguladores ($mg.L^{-1}$)		
	GA_3	**β-NOA**	**AIB**
T1	0	0	0
T2	1,5	0	0
T3	3	0	0
T4	0	1,5	0
T5	1,5	1,5	0
T6	3	1,5	0
T7	0	3	0
T8	1,5	3	0
T9	3	3	0
T10	0	0	1,5
T11	1,5	0	1,5
T12	3	0	1,5
T13	0	0	3
T14	1,5	0	3
T15	3	0	3

Onde: GA_3 = Ácido Giberélico, ß-NOA = Ácido ß-Naftoxiacético e AIB = Ácido Indol-Butírico.

2.3.3 Variáveis Respostas

No início do experimento, as microplantas de *Ananas comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" foram individualizadas e identificadas para determinação da ação dos biorreguladores, quanto ao crescimento em altura, aumento do número de folhas, altura do caule e brotamento. É importante salientar, que como as microplantas já estavam em cultivo *in vitro* o número de folhas variou entre 2 a 5, na instalação do experimento.

Após 90 dias de cultivo *in vitro*, as microplantas de abacaxi *Ananas comosus* (L.) Merril IAC "gomo-de-mel" foram retiradas dos tubos de ensaio para contagem visual do número de folhas e do número de raízes emitidas. Para análise da altura do caule utilizou-se escala métrica em centímetros.

2.3.4 Delineamento Estatístico

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (15 x 3) com parcela subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por combinações de regulador de crescimento (Tabela 1) e tempo de avaliação (0, 45 e 90 dias).

Para tanto, utilizaram-se cinco repetições por tratamento, sendo composto por um explante cada repetição.

2.3.5 Análise dos Dados

Inicialmente os dados reais foram submetidos ao teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro, a fim de verificar a homogeneidade da variância entre os tratamentos. Em seguida, realizou-se análise de variância (ANOVA), respectivamente a 5% e 1% de probabilidade de erro.

De acordo com a significância, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o pacote estatístico SOC (Embrapa, 1990) para a realização dos procedimentos estatísticos.

2.3.6 Análises Anatômicas

As análises anatômicas foram efetuadas por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura do terço mediano da primeira folha expandida das folhas, e da zona de ramificação das raízes de abacaxizeiros submetidos aos diferentes tratamentos.

2.3.6.1 Microscopia de Luz

2.3.6.1.1 Cortes histológicos

As secções do terço mediano das folhas totalmente expandidas das microplantas (Figura 3) submetidas a diferentes concentrações de biorreguladores foram fixadas em

solução de Karnowsky (1965), seguida de desidratação crescente em série etílica (5, 10, 30, 50, 70, 90, 100%). Posteriormente as amostras foram inclusas em resina hidroxietilmetacrilato (Polysciences), adaptando as recomendações do fabricante. As amostras foram inclusas em solução de pré-infiltração por 12 horas em geladeira, seguidamente foram incluídas na solução de infiltração também por 12 horas em geladeira. Além disso, na confecção dos blocos foram adicionados 30% a mais de solução de endurecimento na solução de infiltração, do que o indicado pelo fabricante.

Os blocos com as amostras foram seccionados em cortes transversais em micrótomo rotativo com aproximadamente 10 µm de espessura.

Foram feitos cortes transversais a mão livre com intermédio de lamina de aço-inox (Gillete®).

As secções foram coradas com Azul de Toluidina (0,05%) em tampão fosfato e ácido cítrico (Sakai, 1973) e Azul de Astra e Safranina (Bukatsch,1972). Seguidamente as lâminas foram confeccionadas com resina sintética (Entellan®). As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2), sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG (SDC-313), e avaliadas para obtenção da área ocupada pelo tecido na folha e na raiz e suas respectivas espessuras.

Especificamente para a análise da rizogênese foliar, realizou-se cortes histológicos na região do terço mediano, seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

Figura 3 - Microplantas de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC “gomo-de-mel” destacando a região do terço mediano das folhas utilizadas para as análises histológicas (retângulo)

2.3.6.1.2 Testes microquímicos

Para os testes histoquímicos foram efetuados cortes a mão livre por intermédio de lâminas de aço inox (Gillete®) e mantidas em água destilada. Para as reações foram empregados os seguintes reagentes: Cloreto Férrico para identificação de compostos de natureza fenólica, Sudan IV para identificação de constituintes lipofílicos da célula, Vermelho de Rutênio para identificação de compostos de natureza péctica, Cloreto de Zinco para identificação de celulose.

Após a realização dos testes, as lâminas foram fotomicrografadas de acordo com o protocolo de cada reagente para identificação do conteúdo e componentes celulares.

2.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das folhas de microplantas por meio de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Núcleo de Apoio a Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP) de acordo com Kitajima e Leite (1999).

As amostras do terço mediano da primeira folha totalmente expandida de cada tratamento foram seccionadas em segmentos de aproximadamente 5mm. Estes segmentos foram fixados em solução de Karnowsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, por 24 horas), em seguida as amostras permaneceram em glicerol por uma hora e foram criofraturadas em nitrogênio líquido.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). A secagem foi realizada ao ponto crítico (BALZERS CPD 030) tendo como meio de desidratação, o CO_2 e, logo após, foram metalizadas em ouro (metalizador MED 010 BALZERS), e analisadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940 A.

2.4 Resultados

2.4.1 Biorreguladores na altura, rizogênese e brotamento de microplantas de *A. comosus* cultivar IAC "Gomo de mel".

Com base na análise de variância pode-se verificar que houve interação do biorregulador de crescimento e tempo de cultivo para a altura, número de raiz e número de folhas de explantes de *Ananas comosus* cv IAC "gomo-de-mel". Contudo, o número de brotações por explante apresentou efeito significativo somente para o fator tempo (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para altura (ALT), número de raízes (NR), número de folhas (NF) e número de brotos (NB) de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função das concentrações de biorreguladores de crescimento e tempo de cultivo *in vitro*

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios			
		ALT[(1)] (cm expl^{-1})	NR[(2)] (expl^{-1})	NF (expl^{-1})	NB[(2)] (expl^{-1})
Regulador (RE)	14	0,0142**	0,0097**	48,76**	0,0009^{ns}
Subparcela	60	0,0020**	0,0021**	8,60**	0,0007**
Tempo (TE)	2	0,4596**	0,2734**	1.050,12**	0,0043**
RE * TE	28	0,0085**	0,0043**	17,74**	0,0004^{ns}
Resíduo	120	0,0011	0,0011	3,54	0,0003
Média	–	8,08	1,95	10,06	0,22
$CV_{exp.}$(%)	–	12,69	21,89	18,68	16,23

^{ns} valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.
** valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.
$^{(1)}$ dados transformados por $(n/100)^{0,5}$ e $^{(2)}$ dados transformados por $[(n+1)/100]^{0,5}$ pelo teste de Bartlett ao nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.
GL = graus de liberdade, $CV_{exp.}$ = coeficiente de variação experimental, expl = explante.

Considerando o tempo zero (aplicação dos biorreguladores) pode-se observar que a altura dos explantes não variou, ou seja, a seleção utilizada quanto a altura do explante foi eficiente para a padrozinação das unidades experimentais. Aos 45 dias de cultivo, as melhores médias observadas corresponderam a todas os tratamentos com exceção de T8, T11 e T14, porém não diferiram significativamente quanto a altura do explante. Aos 90 dias, somente os tratamentos T1, T2, T3, T5, T12, T14 e T15

apresentaram os melhores valores médios quanto a altura por explante, sendo esses tratamentos os mais efetivos para esta característica (Tabela 3).

Ao considerar os tratamentos T8 e T13 pode-se observar que não houve diferença significativa em relação ao tempo de cultivo, ou seja, estes tratamentos foram pouco eficientes para promover o crescimento em altura dos explantes (tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios da altura de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função do tratamentos e tempo de cultivo *in vitro*

Tratamentos	**Tempo (dias)**		
	0	45	90
T1	3,2 Ab	8,3 ABCb	15,5 Aba
T2	4,1 Ac	9,6 Ab	20,1 Aa
T3	4,8 Ab	8,7 ABb	20,1 Aa
T4	3,6 Ab	6,7 ABCb	13,4 Ba
T5	4,5 Ab	4,9 ABCb	14,8 Aba
T6	4,7 Ab	6,0 ABCb	13,6 Ba
T7	5,0 Ab	5,8 ABCb	13,4 Ba
T8	4,0 Aa	5,2 BCa	5,5 CDa
T9	5,6 Ab	6,0 ABCb	13,2 Ba
T10	5,4 Ab	5,9 ABCb	10,8 BCa
T11	2,9 Ab	5,5 Cb	14,1 Ba
T12	5,6 Ab	7,2 ABCb	14,8 Aba
T13	3,8 Aa	4,5 ABCa	4,5 Da
T14	3,4 Ab	4,1 BCb	15,4 Aba
T15	4,1 Ab	6,4 ABCb	14,8 Aba

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. T1 = testemunha; T2 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3; T3 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3; T4 = 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T5 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3+ 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T6 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3, + 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T7 = 3,0mg.L^{-1} de βNOA, T8 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de βNOA; T9 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de βNOA; T10 =1,5mg.L^{-1} de AIB, T11 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 1,5mg.L^{-1} de AIB; T12 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 1,5mg.L^{-1} de AIB; T13= 3,0mg.L^{-1} de AIB; T14 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de AIB; T15 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de AIB.

O número de raízes por explante em relação aos tratamentos não variou significativamente durante o tempo zero (aplicação de biorreguladores), bem como aos 45 dias. Porém, aos 90 dias de cultivo verificou-se que as melhores médias ocorreram

para os tratamentos T2, T10, T11, T13 e T15, os quais não diferiram significativamente, sendo essas as combinações que induziram a rizogenêse de forma mais eficaz (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios do número de raízes (NR) de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC "gomo-de-mel" em função das concentrações de reguladores de crescimento e tempo de cultivo *in vitro*

Tratamentos	**Tempo (dias)**		
	0	45	90
T1	0,0 Aa	3,2 Aa	3,2 BCa
T2	0,0 Ab	1,8 Ab	6,2 Aba
T3	0,0 Ab	1,6 Aab	3,2 BCa
T4	0,0 Aa	0,0 Aa	4,8 BCa
T5	0,0 Aa	0,0 Aa	1,8 Ca
T6	0,0 Aa	0,6 Aa	1,2 Ca
T7	0,0 Aa	1,4 Aa	2,2 BCa
T8	0,0 Aa	0,2 Aa	1,8 Ca
T9	0,0 Aa	1,6 Aa	2,4 BCa
T10	0,0 Ab	3,2 Ab	8,6 Aa
T11	0,0 Ab	2,8 Aab	5,6 Aba
T12	0,0 Ab	1,0 Ab	4,0 BCa
T13	0,0 Ab	2,2 Ab	7,8 Aba
T14	0,0 Ab	1,0 Ab	5,4 BCa
T15	0,0 Ab	2,6 Aab	6,2 Aba

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. T1 = testemunha; T2 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3; T3 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3; T4 = 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T5 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3+ 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T6 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3, + 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T7 = 3,0mg.L^{-1} de βNOA, T8 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de βNOA; T9 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de βNOA; T10 =1,5mg.L^{-1} de AIB, T11 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 1,5mg.L^{-1} de AIB; T12 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 1,5mg.L^{-1} de AIB; T13= 3,0mg.L^{-1} de AIB; T14 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de AIB; T15 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de AIB.

Aos 45 dias de cultivo os tratamentos que apresentaram a maior indução de folhas corresponderam ao T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 e T10, os quais não diferiram significativamente. Porém aos 90 dias, os melhores tratamentos quanto ao número de folhas por explante foram T2, T3, T4, T7, T8, T9, T11, T12, T14 e T15 (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios do número de folhas de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC “gomo-de-mel” em função das concentrações de reguladores de crescimento e tempo de cultivo *in vitro*

Tratamentos	**Tempo (dias)**		
	0	45	90
T1	7,6 ABb	10,6 ABab	12,8 Ba
T2	6,8 ABb	10,0 ABab	14,4 Aba
T3	9,6 ABb	12,8 Ab	18,2 Aa
T4	10,2 ABa	12,2 ABa	14,2 Aba
T5	9,6 ABa	10,8 ABa	12,8 Ba
T6	8,0 ABb	10,6 ABab	13,0 Ba
T7	8,2 ABb	9,2 ABb	14,5 Aba
T8	10,2 Aa	11,0 ABa	13,8 Aba
T9	2,6 Cb	2,6 Cb	15,2 ABa
T10	8,4 ABa	9,6 ABa	12,8 Ba
T11	4,8 BCb	5,0 BCb	14,6 ABa
T12	6,2 BCb	8,4 BCb	14,8 ABa
T13	6,0 BCb	6,0 BCb	13,4 Ba
T14	3,6 Cb	4,2 Cb	14,2 ABa
T15	5,8 BCb	7,8 BCb	15,8 ABa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. T1 = testemunha; T2 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3; T3 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3; T4 = 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T5 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3+ 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T6 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3, + 1,5mg.L^{-1} de βNOA; T7 = 3,0mg.L^{-1} de βNOA, T8 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de βNOA; T9 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de βNOA; T10 =1,5mg.L^{-1} de AIB, T11 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 1,5mg.L^{-1} de AIB; T12 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 1,5mg.L^{-1} de AIB; T13= 3,0mg.L^{-1} de AIB; T14 = 1,5mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de AIB; T15 = 3,0mg.L^{-1} de GA_3 + 3,0mg.L^{-1} de AIB.

Com o passar do tempo houve aumento do número de broto por explante, independente do tratamento. Pode-se observar que não ocorreu diferença significativa aos 45 e 90 dias em relação ao número de brotações, apresentando valores médios de 0,24 e 0,41 brotos por explante, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios do número de brotações de *A. comosus* (L.) Merril cv. IAC “gomo-de-mel” em função do tempo de cultivo *in vitro*

Tempo de Cultivo	Número de Brotações (explante^{-1})
0	0,00 B
45	0,24 A
90	0,41 A

Valores médios seguidos por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

2.4.2 Anatomia

2.4.2.1 Descrição da anatomia foliar de *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. IAC “Gomo-de-Mel” controle T1.

A análise histológica da lâmina foliar das microplantas cultivadas em meio de cultura isento de biorreguladores (T1) evidenciou que epiderme que recobre a face adaxial é constituída por uma camada de células poligonais, com parede sinuosa, apresenta cutícula espessa e está perfeitamente justaposta.

Abaixo da epiderme ocorre de duas a três camadas de tecido aqüífero, caracterizando a hipoderme, em qual ocorrem algumas células que apresentam espessamento externo a parede primária, assemelhando-se ao colênquima.

O mesofilo é homogêneo, constituído apenas por células do parênquima clorofiliano de formato isodiamétrico, distribuídas em seis camadas e apresentam muitos cloroplastos na periferia das células. Neste tecido há ocorrência de inclusões inorgânicas como ráfides e drusas.

Os feixes vasculares são do tipo colateral e voltados para a face abaxial da folha. Apresentam cerca de quatro raios de xilema, constituído de vasos de protoxilema e metaxilema, há presença de parênquima de xilema e suas células possuem tamanhos variados. A região floemática apresenta cerca de seis a sete camadas de células com elementos crivados com diâmetro reduzido, células companheiras e parênquima de floema. Foram observadas fibras esclerenquimáticas gelatinosas associados ao feixe.

A epiderme da face abaxial é constituída por uma camada de células poligonais e justapostas recobertas pela cutícula delgada (Figura 4).

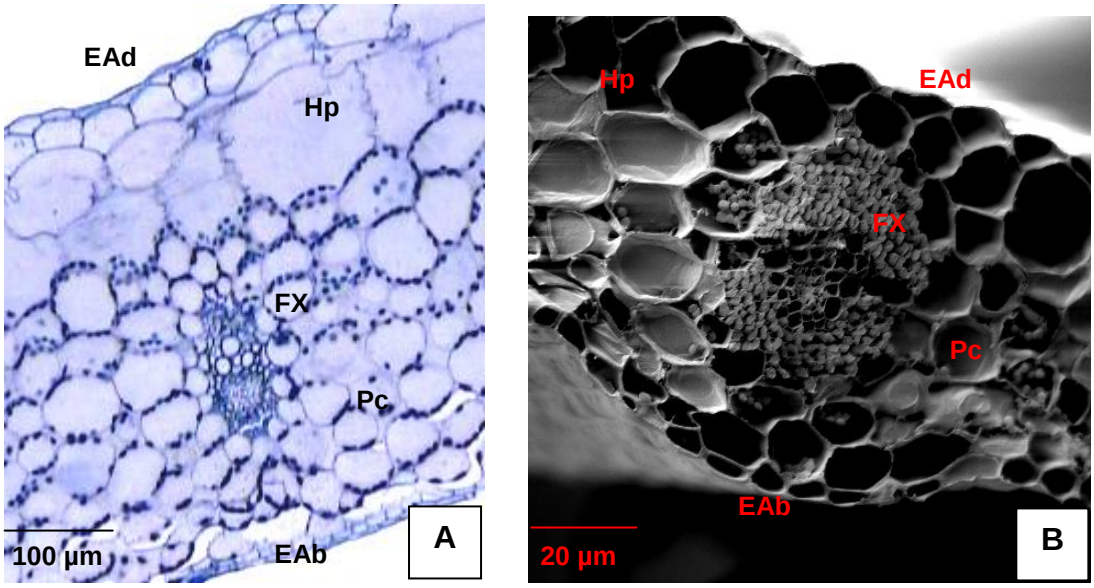

Figura 4 - C.T. do mesofilo de microplantas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivadas no tratamento T1. A: Microscopia de luz; B: Eletromicrografia de varredura. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial

2.4.2.2 Alterações anatômicas foliares decorrentes dos tratamentos com diferentes concentrações e combinações de biorreguladores vegetais.

A análise histológica da lâmina foliar das microplantas cultiuvadas nos tratamentos suplementados com biorreguladores, evidenciou que com exceção das microplantas mantidas nos tratamentos T1 (controle), T6, T12, T14 e T15, verificou-se que a epiderme adaxial na região central da folha, apresentou-se atípica em relação ao controle, evidenciando dois estratos celulares.

Variação do número de estratos celulares (dois a três) também foi observada na hipoderme das folhas de microplantas submetidas aos tratamentos T2, T3, T7, T8, T9, T11 e T13, ao passo que para as microplantas mantidas nos tratamentos T4, T12 e T15 a hipoderme apresentou sempre três camadas (Figuras 5, 6 e 7).

As folhas das microplantas submetidas ao tratamento T5 (1,5 $mg.L^{-1}$ de GA_3 com 1,5 $mg.L^{-1}$ de ßNOA), a hipoderme variou em dois a quatro estratos celulares, porém para todos os tratamentos não houve alteração no formato das células (Figura 5).

Em relação ao mesofilo, o parênquima clorofiliano das microplantas submetidas aos tratamentos T2, T3, T5, T9, T10, T12, T13 e T15 apresentou de cinco a sete estratos celulares, ao passo que para as microplantas cultivadas nos tratamentos T8 e T9 verificou-se de sete a oito camadas de células (Figuras 5, 6 e 7). Em todos tratamentos observou-se que não houve alteração no formato das células.

A bainha do feixe apresentou-se uniforme e constituída por apenas um estrato de células em todos os tratamentos (Figuras 5, 6 e 7).

As fibras esclerenquimáticas não apresentaram alterações na forma e número de estratos em todos os tratamentos, exceto para as microplantas mantidas no tratamento T6, nos quais houve casos de ausência completa, enquanto que em outras se apresentavam muito evidentes (Figuras 5, 6 e 7).

Na região xilemática dos feixes vasculares das folhas das microplantas cultivadas nos tratamentos T2, T3, T11, T14 e T15, observou-se a presença de três a quatro raios de xilema, ao passo que para as cultivadas nos tratamentos T4, T5, T6, T9 e T11, verificou-se que ocorreu aumento para cinco à oito raios de xilema (Figuras 5, 6 e 7).

Na região floemática não se observou alterações significativas em relação ao observado no controle, pois todas as folhas de microplantas cultivadas em todos os tratamentos apresentaram de cinco a sete estratos de células, sendo que também não houve alteração no formato das células.

Em relação à epiderme abaxial de todas as folhas das microplantas cultivadas em todos os tratamentos, não foram observadas nenhuma alteração em relação ao tamanho e formato das células quando comparadas ao observado nas microplantas cultivadas no controle T1, entretanto, notou-se alteração do número de estratos celulares, com o surgimento de uma segunda camada de células, para as folhas de microplantas mantidas nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T10, T11, T12, T13, T14 e T15 (Figuras 4, 5 e 6).

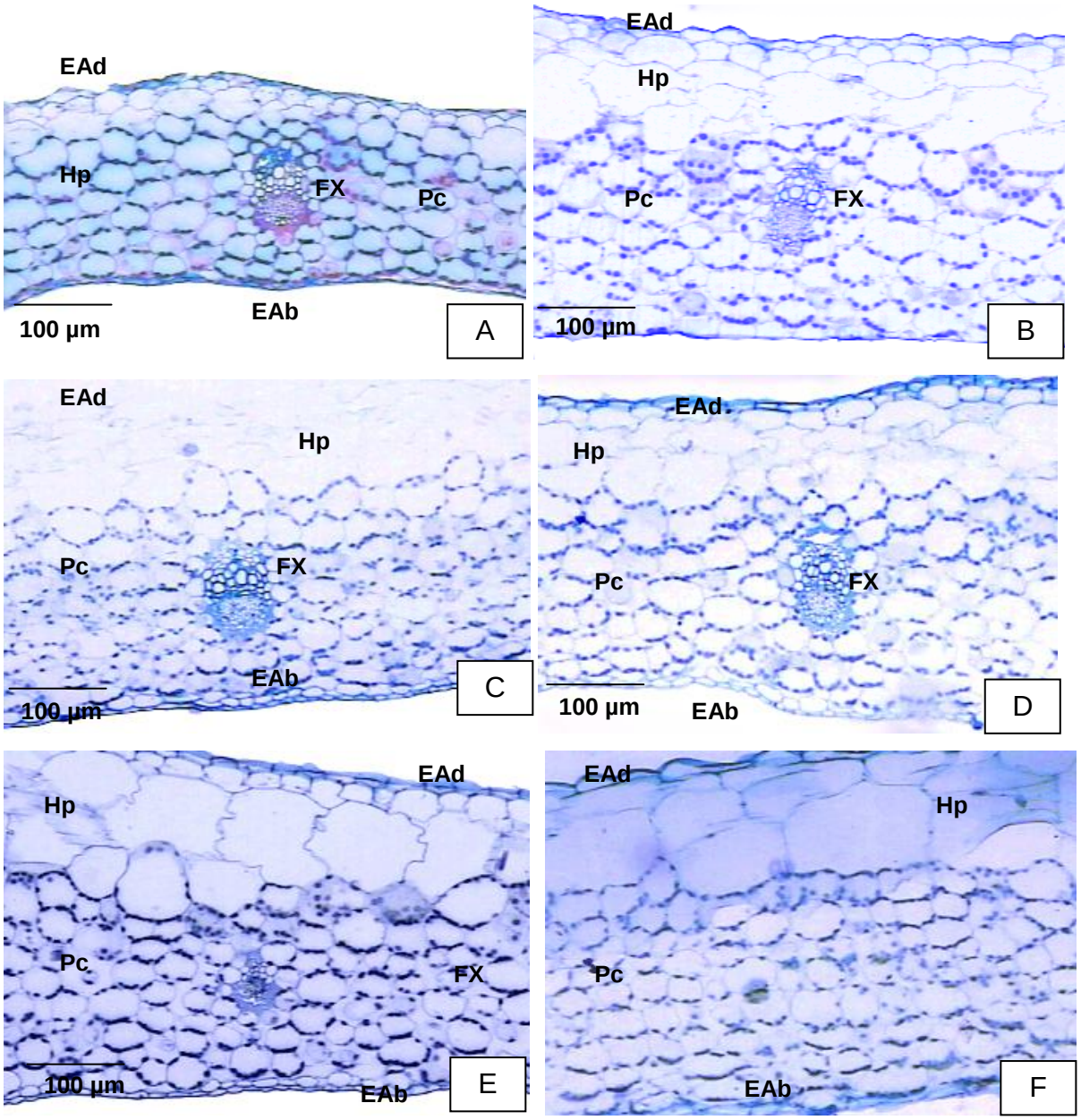

Figura 5 - C.T. da região central do mesofilo de microplantas de *A. comosus* cv IAC "gomo de mel". A: cultivadas nos tratamentos T2, B: cultivadas no tratamento T3, C: cultivadas no tratamento T4, D: cultivadas no tratamento T5, E: cultivadas no tratamento, T6. F: cultivadas no tratamento T7. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial

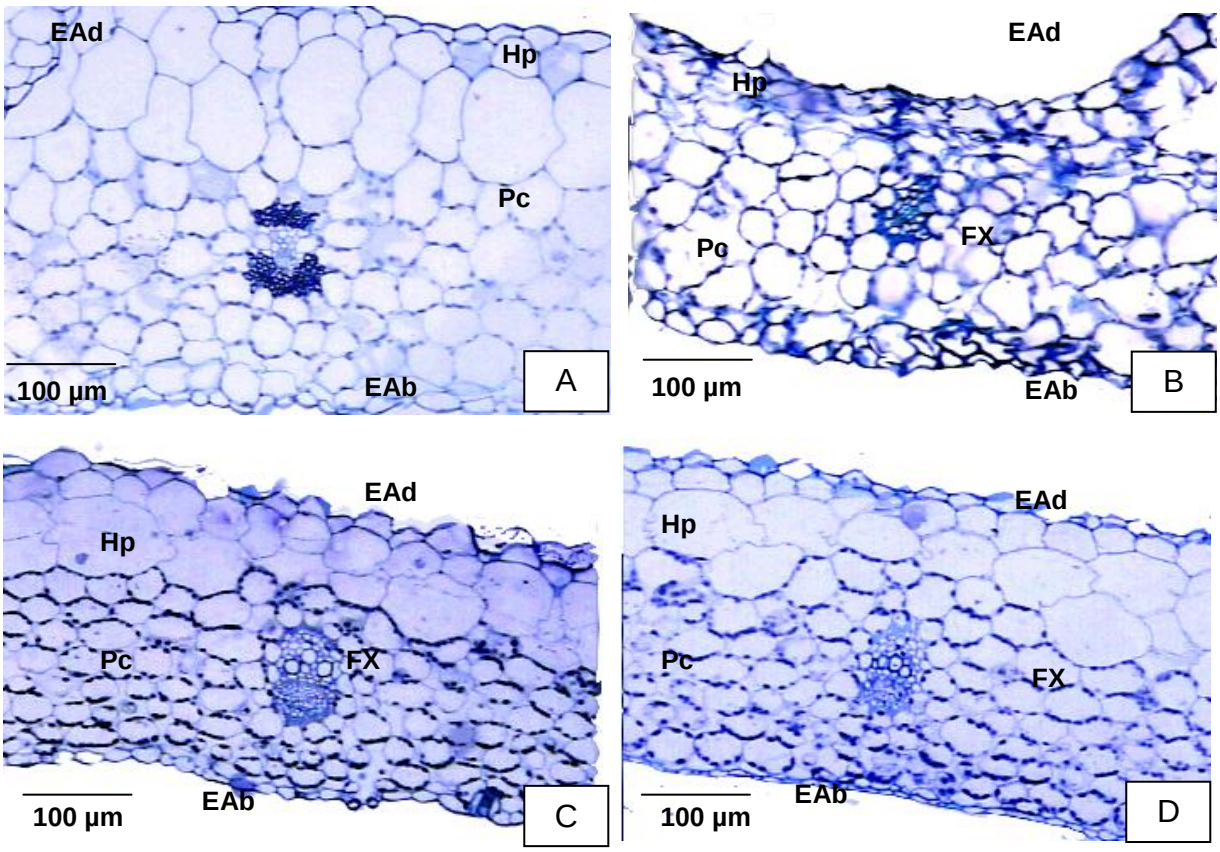

Figura 6 - C.T. região central do mesofilo foliar de microplantas de *A. comosus* cv IAC “gomo de mel”. A: cultivadas no tratamento T8, B: cultivadas no tratamento T9, C: cultivadas no tratamento T10, D: cultivadas no tratamento T11, E: cultivadas no tratamento T11. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial

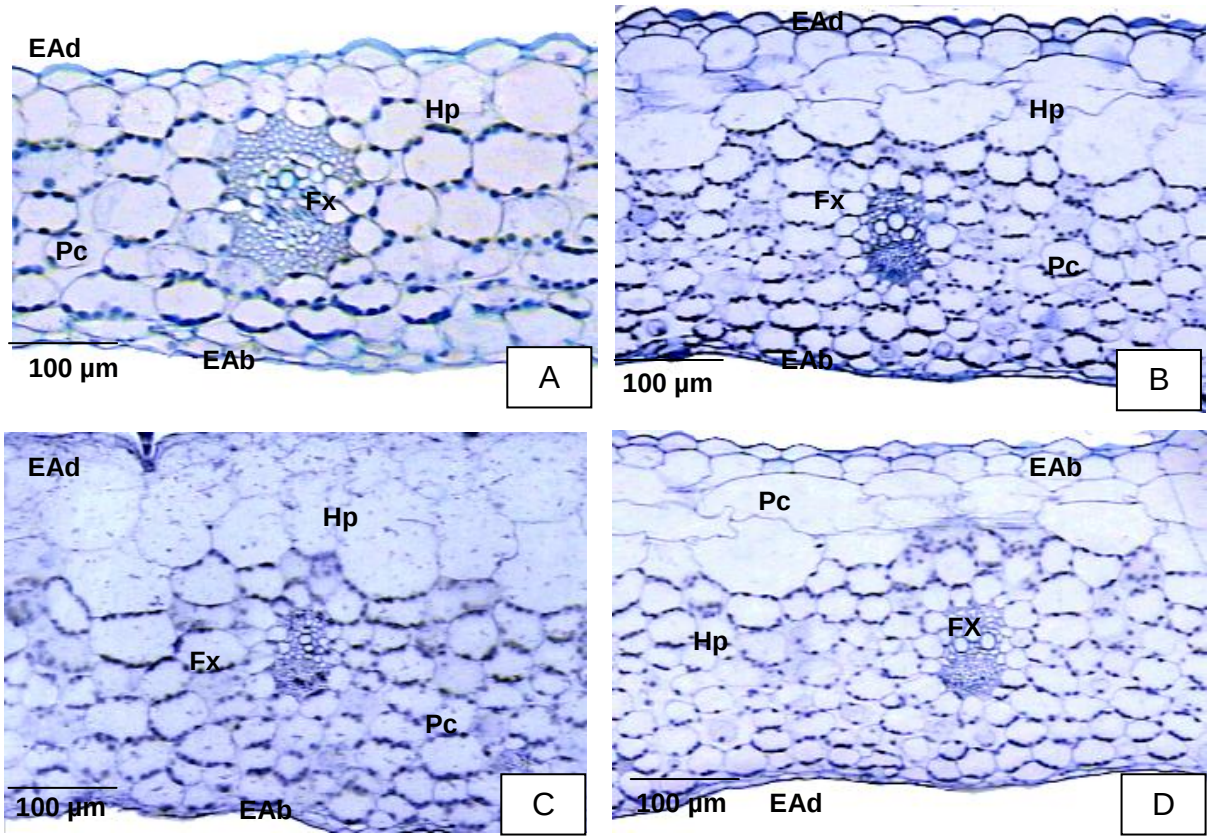

Figura 7 - C.T. região central do mesofilo foliar de microplantas de *A. comosus* cv IAC "gomo de mel". A: cultivadas nos tratamentos T12, B: cultivadas no tratamento T13, C: cultivadas no tratamento T14, D: cultivadas no tratamento T15. EAd = epiderme adaxial, Hp = hipoderme, FX = feixe vascular, Pc = parênquima clorofiliano e Eab =epiderme abaxial

2.4.2.3 Testes Microquímicos

Com relação aos resultados dos testes histoquímicos foi constatado positividade em todos os tratamentos para a reação com Cloreto Férrico, Sundan IV, Vermelho de Rutênio e Lugol, verificando-se ainda, que a positividade de celulose, conteúdo de natureza lipofilíca, substâncias de natureza péctica e amido, também foi padronizada para todos os tratamentos.

2.4.2.4 Rizogênese foliar decorrente do tratamento com ácido ß-naftoxiacético

Constatou-se que nos tratamentos com a presença isolada do ácido ß-naftoxiacético (1,5 e 3,0 $mg.L^{-1}$), houve a emissão de raízes adventícias no terço

mediano do limbo foliar, tal ocorrência foi observada tanto visualmente quanto por análises anatômicas.

Com relação à morfologia externa as raízes apresentaram-se normais em relação a espessura e presença de pêlos radiculares (figuras 8 e 9).

Nas secções histológicas efetuadas na região da rizogênese foliar, observou-se duas possíveis origens para a emissão da raiz, sendo a primeira a partir de divisões periclinais das células da bainha dos feixes vasculares principais, as quais originaram o centro meristemático constituído de células com tamanho reduzido, isodiamétricas, com relação núcleo-plasmática (rnp) elevada e polarizadas, originando o meristema da raiz adventícia, que em seguida originaram células floemáticas e xilemáticas que se conectaram com o feixe vascular da folha de origem (figuras 10 e 11), e a segunda origem ocorreu a partir das células da bainha dos feixes secundários de comunicação transversal entre os feixes vasculares primários (figura 12).

Verificou-se ainda que houve desestruturação das células que constituem a hipoderme e o mesofilo da região de emissão das raízes adventícias (figura 13), além do rompimento da epiderme (figura 9).

As raízes adventícias emitidas apresentam anatomia típica, com epiderme constituída de um único estrato de células poligonais, córtex composto por cerca de cinco estratos de células hexagonais com reduzidos espaços intercelulares, endoderme com estrias de Caspary evidentes, e o cilindro vascular aparentemente normais com periciclo, procâmbio, protoxilema e protofloema. Constatou-se ainda que a região apical que deveria originar a coifa, apresenta-se com tecido vivo, e de forma atípica, emitindo pêlos radiculares (figura 14, 15 e 16). As raízes adventícias ramificaram com a formação de radicelas (figura 11).

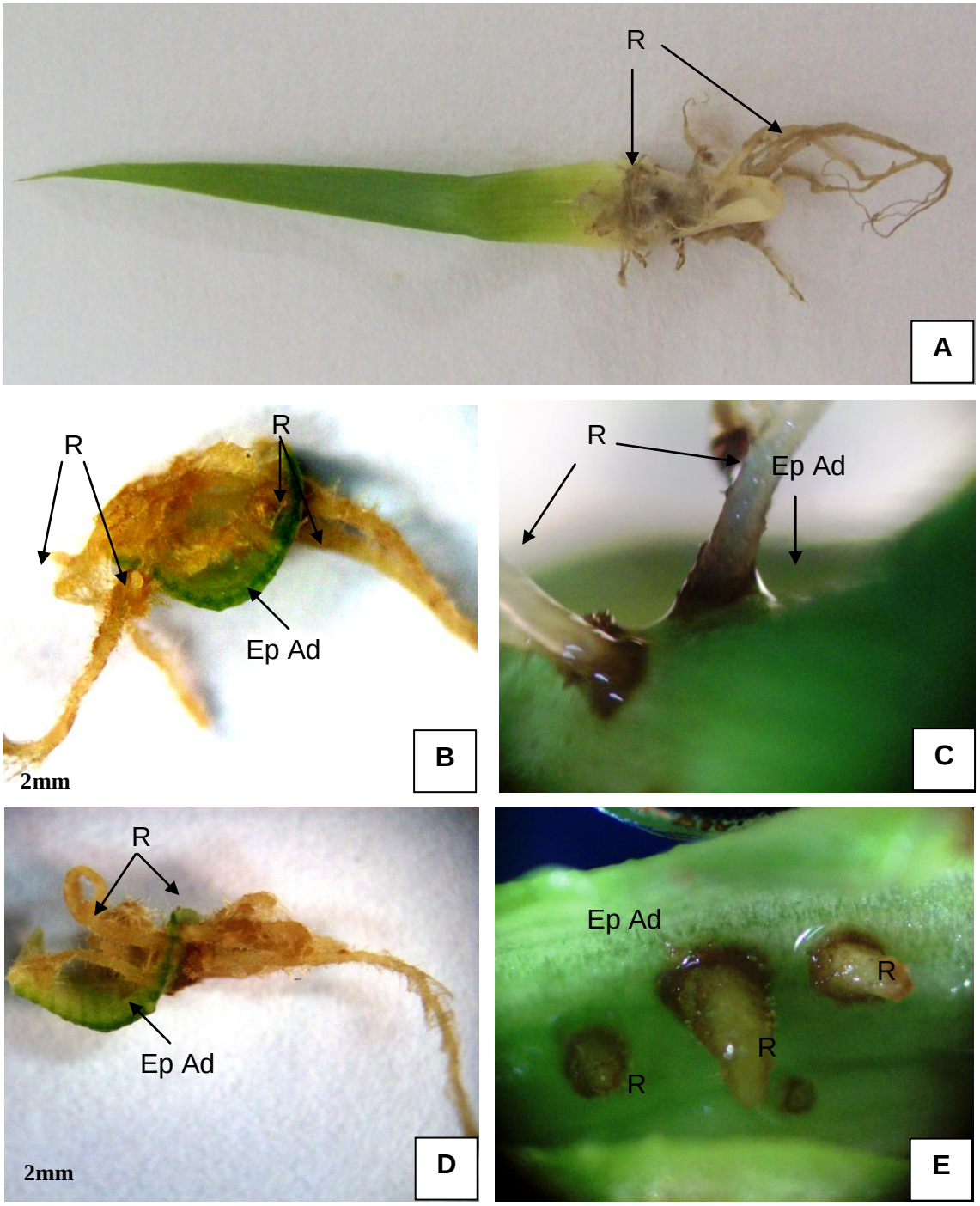

Figura 8 - Folhas de microplantas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivadas na presença isolada de ßNOA (1,5 e 3,0 mg.L^{-1}). A e B: emitindo inúmeras raízes morfologicamente perfeitas em ambas as superfícies. C: Detalhe da folha emitindo raízes na face adaxial. D: Corte transversal do limbo foliar na região de emissão de inúmeras raízes morfologicamente perfeitas em ambas as superfícies. E: Detalhe da epiderme adaxial da microplanta, com emissão de raízes morfologicamente normais. Ep Ad =Epiderme Adaxial; R = raiz

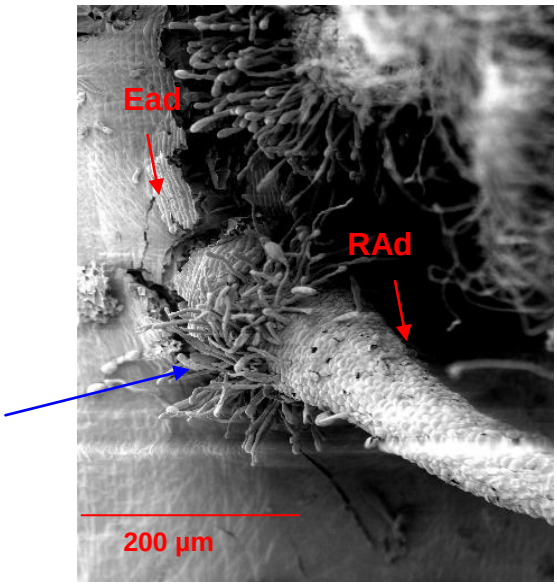

Figura 9 - Eletromicrografia de varredura da face abaxial da folha de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T7 (3,0 mg.L^{-1}), detalhe para emissão da raiz rompendo as células da epiderme. RAd = raiz adventícia e Ead = epiderme adaxial, seta azul são pelos radiculares

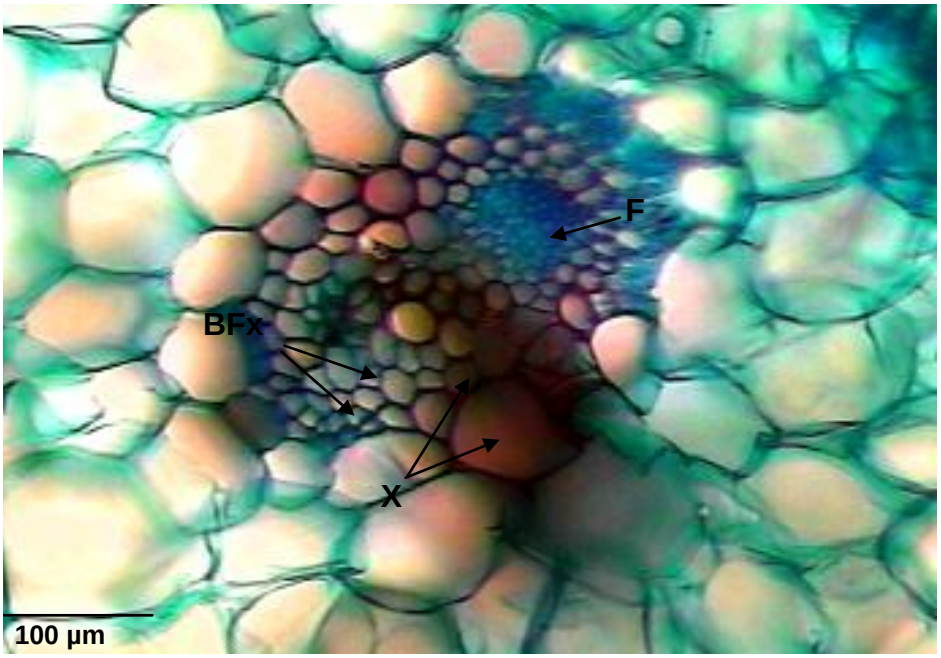

Figura 10 - C.T. de folhas de microplantas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivadas no tratamento T4 (1,5 mg. L^{-1} de ßNOA) detalhe para a região do feixe vascular evidenciando o início da divisão das células da bainha do feixe. Bfx = Bainha do Feixe, X = Xilema, F = Floema

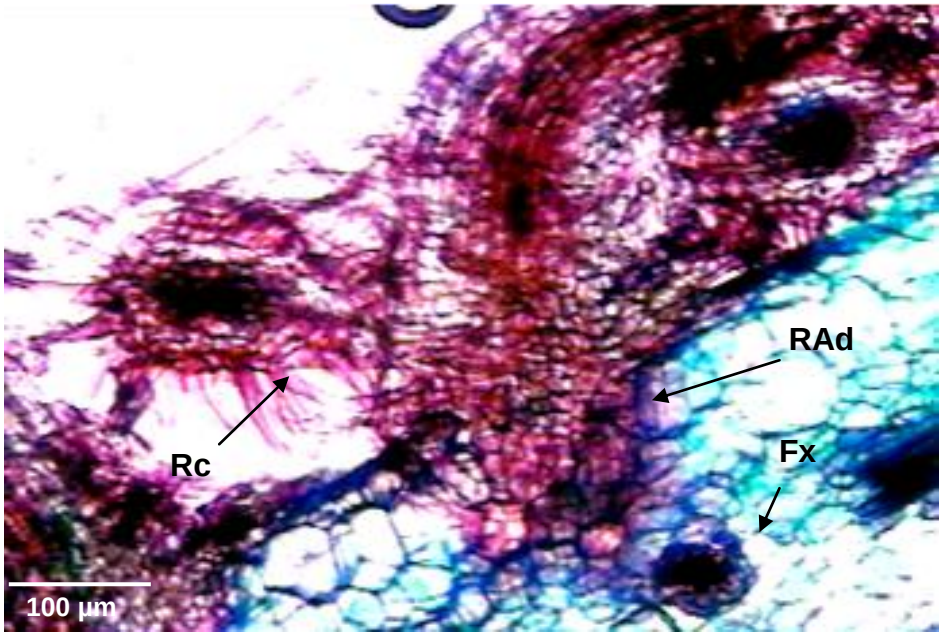

Figura 11 - C.T. de folha de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNO), detalhe para raiz adventícia emitindo radicela. Fx = reixe vascular, Rad = raiz adventícia

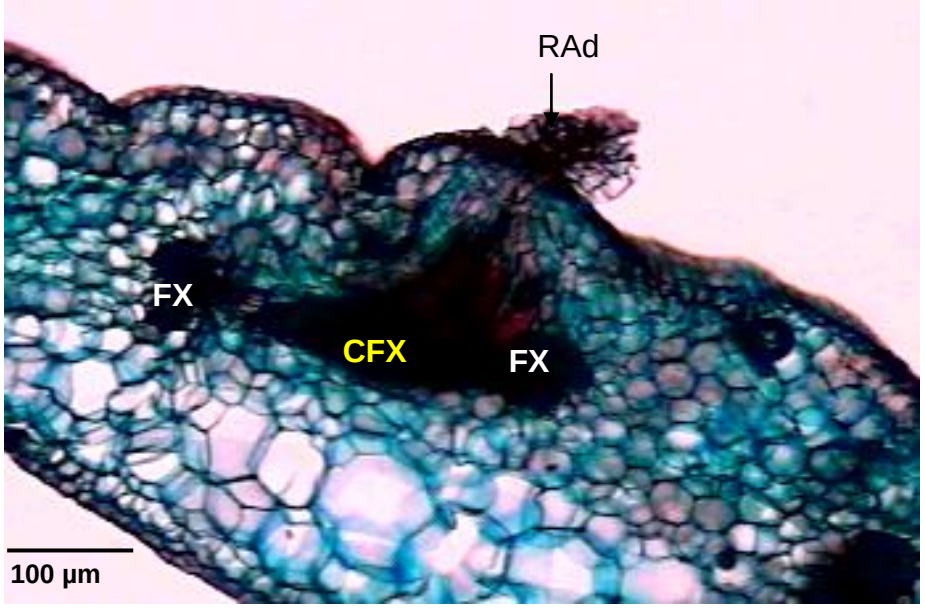

Figura 12 - C.T. de folha de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T7 (3,0 mg.L^{-1} βNOA, detalhe para emissão de raiz a partir da comunicação transversal do feixe vascular. Rad = raiz adventícia, FX = feixe vascular e CFX = comunicação do feixe vascular

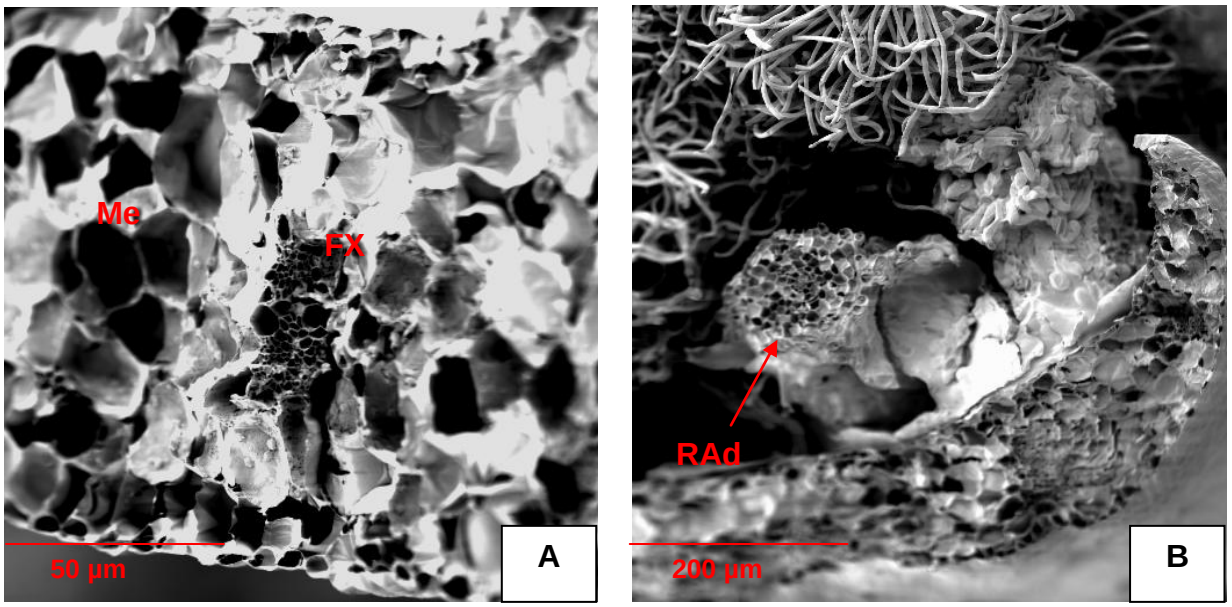

Figura 13 - Eletromicrografia de varredura do mesofilo foliar de microplanta de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNOA); A: detalhe da desestruturação tecidual do mesofilo na região de emissão da raiz adventícia. B: detalhe para mesofilo desestruturado emitindo raízes adventícias. Rad = raiz adventícia, ME = mesofilo, FX = feixe vascular

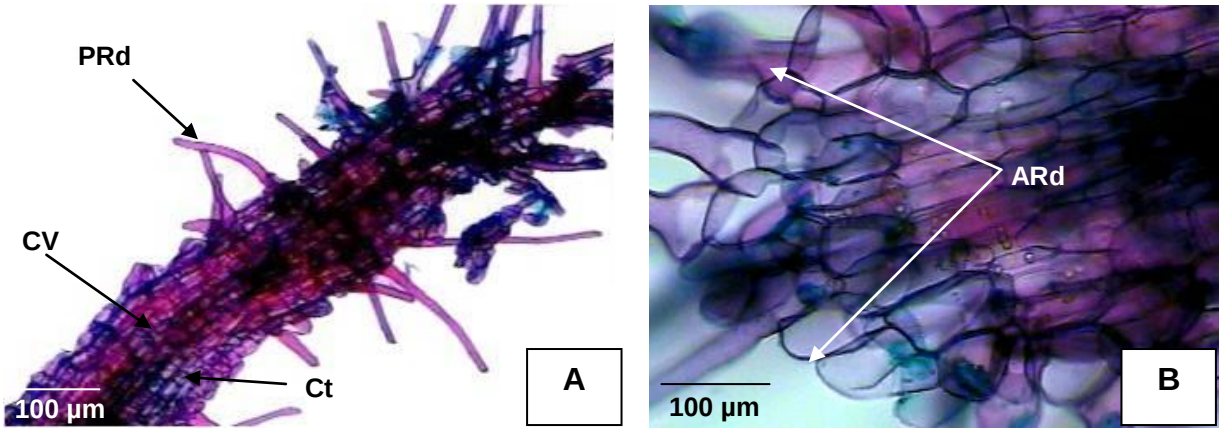

Figura 14 - C.L. de raízes adventícias emitidas pelas folhas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivadas em T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNOA), A: detalhe da epiderme com apêndices, córtex e cilindro vascular, B: detalhe tecido de revestimento na região apical apresenta-se com células vivas, inclusive emitindo pêlos radiculares. PRd = pêlo radicular, Ct = córtex, CV = cilindro vascular e ARd = Ápice Radicular

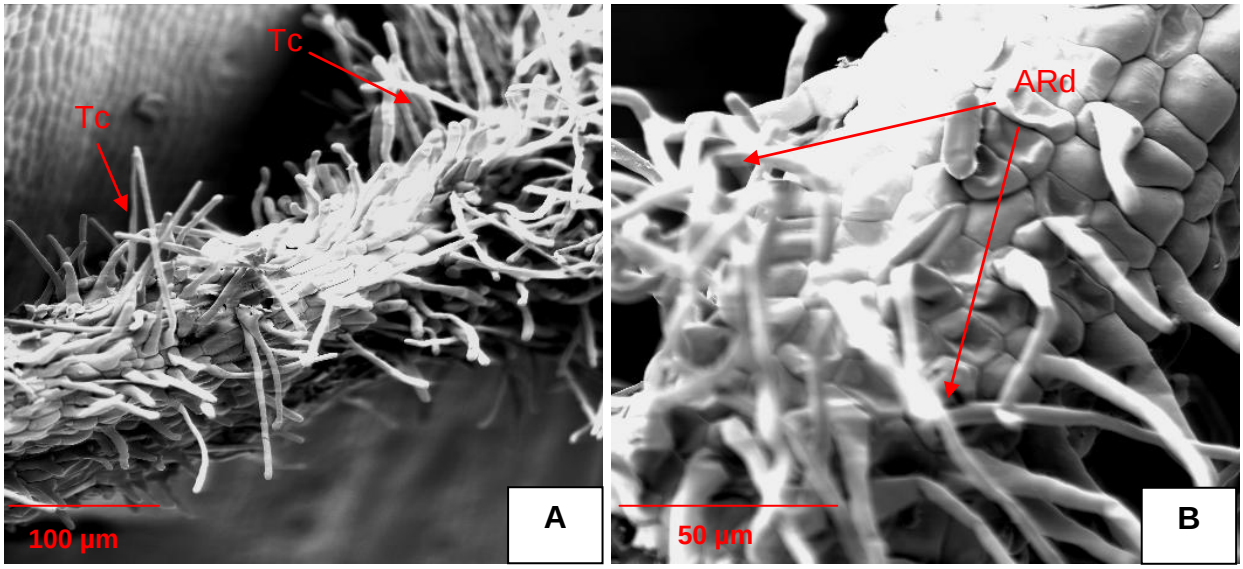

Figura 15 - Eletromicrografia de varredura de raízes adventícias emitidas pelas folhas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada no tratamento T4 (1,5 mg.L^{-1} de βNOA), A: detalhe da epiderme com tricomas, B: detalhe do ápice radicular com tecido vivo emitindo pêlos radiculares. Tc = tricoma e ARd = Ápice radicular

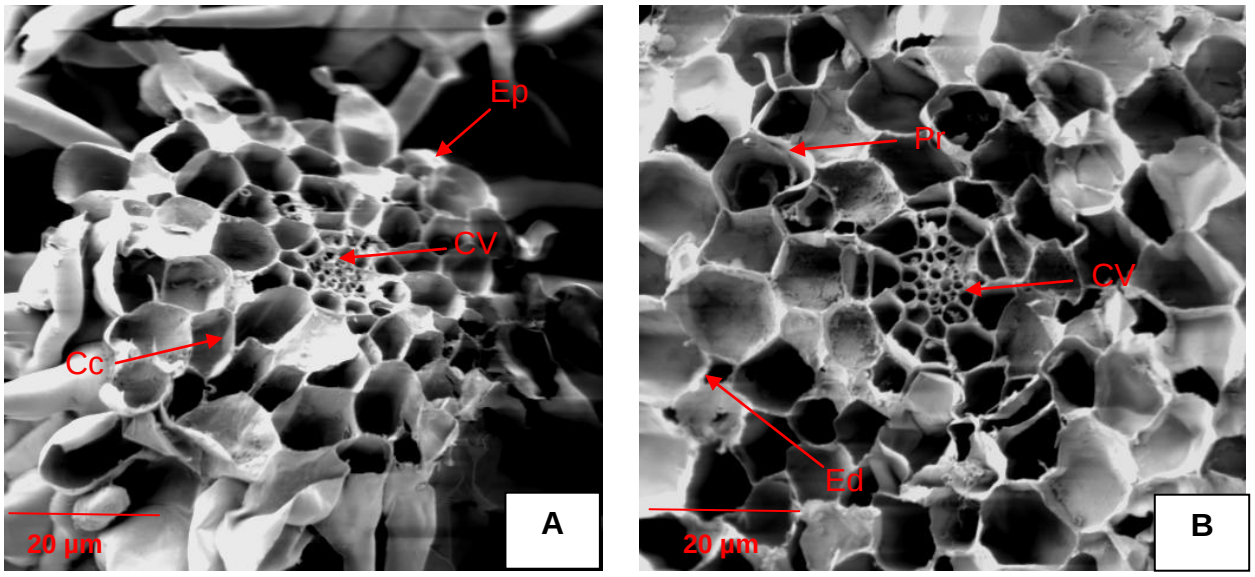

Figura 16 - Eletromicrografia de varredura de raízes adventícias emitidas pelas folhas de *A. comosus* cv. IAC "gomo-de-mel" cultivada em T7 (3,0 mg.L^{-1} de βNOA), A: detalhe da estrutura geral das raízes evidenciando epiderme com tricomas, córtex e cilindro vascular, B: detalhe do cilindro vascular. Ct = córtex, CV = cilindro vascular, Ep = Epiderme, Ed = endoderme e Pr = periciclo

2.5 Discussão

Os melhores resultados em relação ao crescimento em altura, ocorreram com as microplantas submetidas aos tratamentos T1, T2, T3, T5, T12, T14 e T15, aos 90 dias de cultivo, tais observações confirmam que independente das concentrações, combinações e períodos avaliados, a giberelina foi efetiva no processo de crescimento *in vitro* de microplantas do abacaxizeiro “Gomo de mel”. A ação conjunta do AIB e da giberelina evidenciou que o tratamento que apresentou ganho mais representativo em altura aos 90 dias de cultivo foi o T14, porém, ainda assim foram inferiores em relação à atuação da giberelina isolada nas condições consideradas.

O aumento em comprimento atribuído à presença da giberelina pode variar tanto em decorrência do aumento do número de células quanto pela extensibilidade da parede celular de células pré existentes corroborando os relatado de Taiz e Zeiger (2002).

Existem fortes evidências experimentais de que as giberelinas juntamente com as auxinas promovem a expansão e o alongamento celular por exercerem efeitos sobre a parede celular. No entanto, a hipótese mais aceita na atualidade é a de que as giberelinas sejam promotoras do alongamento e as auxinas da expansão celular (KERBAUY, 2008).

Corroborando essas observações, Dias et al. (2009) avaliaram o estiolamento de ananás do campo em meio de cultivo acrescido de giberelina e constataram um maior aumento em altura das plantas. Da mesma forma, Chagas et al. (2005) relataram que a giberelina foi eficiente no crescimento em altura no cultivo de embriões imaturos *in vitro* de *Citrus*, assim como, no crescimento em altura de *Ficus carica* (FRÁGUAS et al., 2004).

Carvalho et al. (2005) citaram que na avaliação do efeito de giberelina no crescimento de genótipos de bananeira, a concentração de 94,13 $\mu mol.L^{-1}$ de giberelina foi eficiente na identificação precoce do porte de genótipos de Prata-Anã e Prata-Gigante. Além disso, no estudo de germinação, posição e alongamento do explante, de *Uncaria guianensis* foi verificado que o acréscimo de giberelina aumentou o número de brotações e a altura da planta (PEREIRA et al., 2006).

Neste mesmo contexto, Ribeiro et al. (2009), verificaram que a presença de 45,3 g L^{-1} de sacarose com 10 mg.L^{-1} GA_3 propiciaram o crescimento em altura da espécie *Zantedeschia aethiopica* (copo-de-leite), e Diniz et al. (2003), observaram em macela (*Egletes viscosa*), que o maior crescimento em altura ocorreu no tratamento com 0,5 mg.L^{-1} de GA_3, o qual apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos.

Em contrapartida, nossos resultados divergem das observações de Praxedes et al. (2001), os quais observaram que o abacaxizeiro pérola responde bem ao ganho em altura sob meios de cultivo acrescidos com 0,5 e 10µM de ANA e 15 µM de AIA, da mesma forma que Macêdo et al. (2003) relataram que baixas concentrações de BAP e ANA, foram favoráveis à altura para o cultivo de abacaxi hidropônico, e Coelho et al. (2009) os quais verificaram que a combinação de giberelina com BAP apresentou um efeito significativo no crescimento em altura em secções de caule de abacaxizeiros “Smooth Cayenne”.

Dentre os resultados obtidos pela atuação do biorregulador βNOA para a indução rizogênica caulinar em microplantas de abacaxizeiros “gomo de mel”, pode se inferir que foram regulares, até mesmo fracos, quando comparados aos demais tratamentos com a aplicação do AIB, tanto quando aplicados isoladamente, como em combinação com GA_3. De acordo com Bausor (1939a) a indução e a inibição de βNOA em plantas de tomateiros são variáveis, sendo determinada pela concentração utilizada. Segundo, Zimmerman (1941) o ácido ß-naftoxiacético se comparado com outras auxinas poderia apresentar vantagens na prática de produção de plântulas de tomateiro e possivelmente em outras frutas. Nitsch (1950) constatou a sua efetividade para a indução do crescimento e respostas morfogênicas quando aplicados em morangueiros, e Hughes e Dobson (2004) fizeram referência da similaridade do ácido naftoxiacético com outras auxinas, atribuindo esta substância como um potencial regulador de crescimento. Entretanto, Avery et al. (1942) divergiram com os trabalhos citados, na sua utilização, uma vez que apresentou-se inativo para espécie *Avena.*

Nas ultimas décadas, autores como Vidal et al. (2009) verificaram que dentre as auxinas utilizadas em *Vitis vinifera* o ácido ß-naftoxiacético foi um sucesso na promoção de anteras e ovários. Rodrigues et al (1987), afirmaram que o ácido ß-

naftoxiacético é eficiente na obtenção da embriogênese somática em explante de hipocótilo e folha cotiledonar de cenoura *Daucus carota* L. em relação a outros reguladores. Com relação à questão da toxidez nada foi observado. Qureshi e Buttar (1989) citaram que o ácido naftoxiacético é um metabólito secundário absolutamente inativo ao organismo, colaborando para acabar com a dúvida quanto à toxidez discutida no século passado, de que poderia oferecer riscos para a planta ou até ao manipulador do produto. Nossos resultados evidenciaram que o ácido ß-naftoxiacético, embora tenha sido pouco representativo para indução de rizogênese adventícia caulinar, ele se mostrou eficiente para indução da rizogênese foliar, tal fato descrito por Bamel et. al. (2007) em folhas de tomateiros tratados com acetilcolina (neurotransmissor de animais); Davis et al. (1982) com a indução de raiz em pecíolos foliares em *Ficus pumila* L. tratadas com AIB nas concentrações 1,000 e 3,000 $mg.L^{-1}$; e por Barbosa et, al. (2003) em folhas de *A. comosus*.

Em relação a rizogênese adventícia a partir do caule, verifica-se que o ácido indolbutírico (AIB) foi mais eficaz, corroborando com inúmeros trabalhos na literatura que valorizam seu uso para o enraizamento, sendo o ácido indolbutírico, dentre as auxinas comercializadas (ANA e AIA) o que mais se destaca, tanto na micropropagação quanto no enraizamento convencional. Pires e Biasi (2003) atribuem este fato à não toxicidade para grande maioria das plantas. Dentre os trabalhos que tiveram sucesso no seu emprego, isolado ou combinado, destaca-se o trabalho de Magalhães Junior et al. (1991) no enraizamento de ameixeira. Centellas et al. (1999) descrevem que para o enraizamento de macieiras a concentração de 3 µM de AIB é eficaz, bem como a mesma concentração de ANA.

Soares et al. (2006) verificaram que as maiores porcentagens de enraizamento ocorriam em explantes tratados com AIB por uma semana seguida da transferência para meio livre de hormônio em mirtilo 'Georgia Gem'.

No tratamento de amoreira-preta e framboeseira verificou-se que baixas concentrações de AIB foram efetivas na indução de número e comprimento de raiz e em elevadas concentrações promoveram a formação de calos (LEITZKE et al. 2009). Amaral et al., (2008) citaram a eficácia de AIB com porta-enxerto de videira, assim como, Botelho et al. (2009) no trabalho com *Vitis vinifera* L. e *Vitis rotundifolia*

comprovaram a eficácia de BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* (NASCIMENTO et al. 2008).

No enraizamento de estacas de *Allamanda cathartica* L. foi constatado que o AIB influencia positivamente (LOSS et al., 2008). Entretanto para abacaxizeiros, Piza et al. (2001), obtiveram maiores quantidades de raízes por plantas com a aplicação de NAA do que com AIB, salientando ainda que, há casos em que outras auxinas podem ser mais eficientes. Além disso, há relatos como os de Cassol et al. (2009) de que AIB, não estimularam os processos de enraizamento adventício de jabuticabeira, da mesma forma que Kersten et al. (1993) verificaram para ameixeira.

Com relação ao número de folhas, os melhores resultados ocorreram nos tratamentos T2, T3, T4, T7, T8, T9, T11, T12, T14 e T15. Resultado que corrobora a afirmação descrita por Praxedes et. al. (2001), de que a maior produção de folhas ocorreu no tratamento controle, seguido pelos tratamentos com 15µM de ANA e 10 µM de AIA.

Kerbauy (2004) citou que um bom nível de auxina endógena proporciona aumento no número de folhas. No entanto, para as concentrações T2 e T3, Taiz e Zeiger (2002), salientam que as giberelinas atuam na divisão celular, portanto, o aumento do número de folhas pode ser atribuído a essa função. Chagas et al. (2005) observaram na aplicação de giberelina que a concentração de 0,01 mg L^{-1} ocasionou um aumento no número de folhas de embriões imaturos de citrus. No desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite avaliando o efeito das concentrações de sacarose e de ácido giberélico, Ribeiro et al. (2009) constataram que somente a sacarose atuou no aumento do número de folhas. Na análise de plantas cultivadas de *Dendrobium nobile* relacionando variações ontogenéticas, os resultados sugeriram que a giberelina tem alguma participação ativa no controle da morfogênese das folhas (VICHIATO et al., 2006). Diniz et al. (2003), embora não relatem a concentração do cultivo *in vitro* de macela (*Egletes viscosa*), relatam que BAP e giberelina proporcionaram maior número de folhas com malformações e hiperhídricas

Com relação a característica brotamento para as microplantas avaliadas, ocorreu de forma homogênea e independente ao tempo e concentrações de biorreguladores para todos os tratamentos avaliados. Moreira et al. (1999) citaram que o emprego

combinado de ANA (1,8 $mg.L^{-1}$) com BAP (2,0 $mg.L^{-1}$) em meio de cultivo MS, proporcionam uma taxa significativa de brotações em abacaxizeiros na ausência de luz. Posteriormente, Macêdo et al. (2003) relataram que altas concentrações combinadas de BAP e ANA (1,0 e 0,5 $mg.L^{-1}$, respectivamente) em abacaxizeiros híbridos PE x SC – 52, apresentaram vantagens em relação ao número de brotos, porém destacam que concentrações intermediárias como 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP e 0,25 $mg.L^{-1}$ de ANA e ainda menores, como 0,25 $mg.L^{-1}$ de BAP e 0,12 $mg.L^{-1}$ de ANA são mais indicadas para meios de cultivo, devido as facilidades de individualização dos brotos. No trabalho de Piza et al. (2001) com abacaxizeiros “Smooth Cayenne” a aplicação de BAP (2 $mg.L^{-1}$) e NAA (1 $mg.L^{-1}$) foram eficientes na brotação, multiplicação e desenvolvimento das plantas, sendo corroborado por Carvalho et. al (2009), que na ocasião afirmaram que na regeneração de brotos e segmentos nodais de abacaxizeiros, os melhores tratamentos foram obtidos através da combinação de 10µM de ANA com 4,44 µM de BAP. Além disso, Coelho et al. (2009) constataram que no emprego de BAP e giberelina isolados e combinados, somente o BAP foi eficaz no número de brotações de abacaxizeiros “Smooth Cayenne”, seguido do trabalho de Quirino et al. (2009) que descrevem que as maiores taxas de multiplicação e número total de brotos de *Ananas comosus* var. erectifolius, ao final do terceiro subcultivo, foram obtidas em meio MS gelificado contendo 2,0 mg L^{-1} de BAP + 2,0 mg L^{-1} ANA. Salientando que os meios de cultivo não foram suplementados com citocininas, que de acordo com Taiz e Zeiger (2002) é regulador envolvido com a produção de gemas adventícas. Portanto, pode-se afirmar que os resultados obtidos nesse trabalho com relação ao número de brotos, ocorreram dentro da normalidade de acordo com a literatura.

A análise histológica das folhas das microplantas cultivadas no tratamento controle (T1) evidenciaram epiderme, hipoderme, feixe vascular colateral com conformações típicas, inclusões citoplasmáticas (drusas e ráfides), estômatos somente na face abaxial, características semelhantes as descritas por autores como Kraus (1948), Barbosa et al. (2006), Batagin et al. (2008).

Com relação aos cloroplastos, Kraus (1948) reportou para a espécie, a presença de três formas de cloroplastos: os esféricos, os discoidais e os ovalados. Em nossas observações em microscopia de luz e eletrônica de varredura, pode-se verificar que as

estruturas encontradas predominantemente são cloroplastos esféricos, portanto, podemos observar que tanto as características histológicas, como citológicas encontram-se dentro do esperado para a espécie, para as microplantas cultivadas no tratamento T1 (controle).

A análise histológica dos demais tratamentos (T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14 e T15), embora tenham apresentado características típicas e semelhantes ao padrão da espécie, observou-se diferença em relação ao número de raios de xilema e floema do feixe vascular. Com relação à ação hormonal, Martins e Castro (1999), avaliando os efeitos da giberelina e ethephon na anatomia de plantas de cana-de-açúcar, verificaram que nas plantas tratadas com 50 mg. L^{-1} de GA_3 não houve modificações nas faces adaxial e abaxial, nos apêndices epidérmicos, nas células buliformes, porém, os feixes vasculares próximos à nervura principal, apresentaram fibras esclerenquimáticas que se estenderam até a epiderme, permitindo concluir que a giberelina aplicada para aumentar o desenvolvimento e produtividade sob condições invernais, promove a atividade meristemática nos feixes vasculares, com a diferenciação precoce dos elementos de vaso e diminui a quantidade de fibras esclerenquimáticas. No entanto, as auxinas podem induzir a diferenciação vascular, sendo que altas concentrações promovem diferenciações no xilema e baixas concentrações no floema (TAIZ; ZEIGER, 2002). Com relação às modificações no feixe vascular sob estímulo de biorreguladores, nossos resultados corroboram com autores supra citados.

Foram observados em todos tratamentos a presença de hipoderme multi estratificada, estrutura esta característica da espécie e de outras pertencentes a família Bromeliaceae (MADSON, 1977). Segundo Barboza et al. (2006), a presença de hipoderme nas folhas *in vitro* de abacaxizeiros pode estar diretamente relacionada com sua sobrevivência *ex vitro,* uma vez que tal estrutura esta relacionada ao armazenamento de água.

Nossos resultados em relação às alterações epidérmicas, corroboram os relatos de Barboza et. al. (2003), os quais citaram que abacaxizeiros cultivados *in vitro* podem apresentar diferenças como sinuosidade das paredes e até estratificação devido às condições ambientais, considerando que durante todo o período de cultivo as

microplantas foram mantidas *in vitro* e sob vários tratamentos com biorreguladores, inferimos que tal alteração esteja dentro da normalidade.

Em relação a histologia da rizogênese foliar, semelhantemente aos nossos resultados com abacaxi “gomo-de-mel”, Barbosa et al. (2003) citaram brevemente que em folhas de abacaxizeiros a origem destas raízes ocorrem a partir da comunicação transversal dos feixes vasculares sob o estímulo de ácido 2-(3clorofenoxi) propiônico. Bausor et al. (1940) fazem referência quanto a organização de primórdios de raízes em plantas jovens de tomate sob estimulo do ácido β-naftoxiacético, em que se observou que as raízes tinham origem a partir do periciclo, parênquima do floema e até mesmo da endoderme, ou seja, raízes com origens de diferentes centros de crescimento. Cabe ressaltar que centros meristemáticos formados por células pequenas, isodiamétricas, com elevada relação núcleo-plasmática (RNP), características de regiões meristemáticas com intensa atividade de divisão celular, já foi observada por Cutter (1987) e Andrade et al. (2006). Neste contexto, com base na rizogênese a partir da bainha do feixe, autores como Van Fleet (1942, 1961), Guttenberg (1943), Kraus (1948) e Esau (1963) se reportaram a bainha do feixe como uma endoderme, que a partir de divisão celular periclinal emite raízes adventícias, e que essa atividade é comumente atribuída ao periciclo (ESAU, 1965; FAHN, 1974; CUTTER, 1987; OLIVEIRA; AKISUE, 2008; RAVEN et al., 2002). Os resultados evidenciam que as raízes foliares foram induzidas a partir de células das bainhas dos feixes vasculares, e que independentemente de se tratarem de células endodérmicas ou pericíclicas, o que representou importância maior foi sua origem procambial, responsável pela manutenção da capacidade de resposta morfogênica ao estímulo do ácido ß-naftoxiacético. Neste contexto, corroboramos, os trabalhos de Cutter (1987) e Andrade et al. (2006) que salientam a importância da origem dos tecidos em relação a capacidade de resposta morfogênica de indução de centro meristemáticos.

Nossos resultados evidenciaram que algumas alterações foram especificamente decorrentes da ação do ácido β-naftoxiacético, e que podem ser favoráveis a estudos de capacidade meristemática de tecidos como a bainha do feixe, mesmo tendo sido menos eficiente que o AIB na rizogênese caulinar. Além disso, verifica-se que é necessário ampliar estudos sobre a concentração de forma isolada e combinada, bem

como avaliar a alteração estrutural, ou seja, a plasticidade anatômica decorrente da ação de reguladores isolados e combinados e ou de fatores como luz, temperatura no cultivo de *A comosus* (L.) Merrill cv. IAC “gomo-de-mel”.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1- O ácido β-naftoxiacético apresenta capacidade morfogênica de indução de rizogênese foliar nas concentrações 1,5 e 3,0 $mg.L^{-1}$.

2- O ácido indolbutírico mostrou-se mais eficiente para a indução da rizogênese adventícia caulinar do abacaxizeiro “Gomo-de-Mel”.

3- O ácido β-naftoxiacético mostrou-se não tóxico, nas concentrações utilizadas, às microplantas de abacaxizeiro “Gomo-de-Mel”.

4- Constatou-se que a bainha do feixe vascular é potencialmente meristemática, apresentando capacidade de resposta morfogênica para a rizogênese foliar.

5- A ação isolada ou combinada de GA_3 é eficiente para o crescimento das microplantas de abacaxizeiro “Gomo-de-Mel”.

6- A utilização da técnica de “pulsing” pode ser uma alternativa para a rizogênese e crescimento em altura em microplantas de abacaxizeiro “Gomo-de-Mel”.

REFERÊNCIAS

AGHION, D.; BEAUCHESNE, G. Utilization de la technique de culture sterile d'órganes pour des clones d'*Ananas*. **Fruits**, Paris, v. 15, n. 10, p. 464-466, 1960.

ALVARENGA, A.A. **Substâncias de crescimento e regulação do desenvolvimento vegetal.** Lavras: UFLA, 1990. 59 p.

AMARAL, U.; BINI, D.A.; MARTINS, C.R. Multiplicação rápida de porta-enxertos de videira mediante estaquia semilenhosa em Uruguaiana-RS. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 2, p. 85-93, 2008.

AMIN, T. **In vitro propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by adventive buds.** 2000. Thesis - Faculty of Agriculture, Thshreen University, Lattakia, 2000.

ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, dez. 2006.

ARAUJO, A.G.; COSTA, F.C.; NUNES, C.F.; BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; FERREIRA, K.S. Bap e ga3 no estiolamento *in vitro* de abacaxi - iac “gomo de Mel” In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Out., 2008. Vitória. **Anais...** Disponível em: <http://200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/Biotecnologia/20080703_160555.pdf >. Acesso em: 10 jun 2009.

AVERY JR., G.S.; BERGER, J.; SHALUCHA, B. Comparative activity of synthetic auxins and derivatives. **Botanical Gazette,** Chicago, v. 104, n. 2, p. 281-287, 1942.

BAMEL, K.; GUPTA, S.C.; GUPTA, R. Acetylcholine causes rooting in leaf explants of in vitro raised tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) seedlings **Life Sciences,** Amsterdam, v. 80, p. 2393–2396, 2007.

BARBOSA, N.M.L.; CUNHA, G.A.P.; REINHARDT, D.H.; BARROS, P.G.; SANTOS, A.R.L. Indução de alterações morfológicas e anatômicas em folhas de abacaxizeiro ‘pérola’ pelo ácido 2-(3-clorofenoxi) propiônico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 386-389, dez. 2003.

BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52(1). **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 36, n. 3, p. 417-423, mar. 2001.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A.; SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

BARTEL, B.; LECLERE, S.; MAGIDIN, M.; ZOLMAN,B.K.; Inputs to the active índole-3-acetic acid pool: synthesis, conjugate hydrolysis, and acid indole-3-butyric acid b-oxidation. **Journal of Growth Regulation,** v. 20, p. 198-216, 2001.

BAUSOR, S.C. A new growth substance β-naphthoxyacetic acid. **American Journal of Botany**, New York, v. 26, n. 6, p. 415-418, June 1939. Disponível em: < http://www.jstor.org/stabe/2436843> Acesso 16 jul. 2009.

BATAGIN, K.D.; ALMEIDA, C.V; TANAKA, F.A.O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC "Gomo-de-mel" micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasílica,** Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
BAUSOR, S.C. Responses of tomato plant to β-naphthoxyacetic acid. **American Journal of Botany**, New York, v. 26, n. 9, p. 733 - 736, Nov. 1939. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/247026> Acesso 14 jul. 2009.

_____. Effects of growth substances on research starch. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 104, n. 1, p. 115-121, Sept. 1942. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2436904> Acesso 14 jul 2009

BAUSOR, S.C.; REINHART, W.L.; TICE, G.A. Histological changes in tomato stems incident to treatment with β-naphthoxyacetic acid. **American Journal of Botany**, New York, v. 27, n. 9, Nov. 1940. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2436904>. Acesso em: 29 set. 2009.

BRITO, C.A.K.; SATO, H.H.; PIRONELLO, A.S.; SIQUEIRA, W. J. Características da atividade da peroxidase de abacaxis (l.) Merrill da cultivar IAC "gomo-de-mel" e do clone iac-1 *Ananas comosus.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 244-249, abr./jun. 2005.

BOTELHO, L.; CONCEIÇÃO, A.; CARVALHO, V.D. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi "Smooth Cayenne", **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 362-367, mar./abr. 2002.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; PIRES, E.J.P.; TERRA, M.M.; SCHUCK, E. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira '43-43' (*vitis vinifera x v. rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 6-8, abr. 2005.

BUKATSCH.F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos,** Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BUTTON, J.; BORGNMAN, C. H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*. **Journal of South Africa Botany**, [S.l.], v. 37, p. 127-134, 1971.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, 1998. pt. 2, p. 81-130.

CANTERLE, V. A.; GIOVANNINI, E.; BERND, R.B. **Desenvolvimento de embriões somáticos de brs clara em diferentes meios de cultura.** Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2007. v. 1, 22 p.

CARIMI, F.; BARIZZA, E.; CARDIMAN, M.; LO SCHIAVO, F. Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Oxon, v. 41, p. 249-252, 2005.

CARVALHO, J.A.B. S.; SILVA, C.P.P.; S. O. LEDO, C.A.S.; PEIXOTO, M.F.S.P. ALVES, J. S. Uso da giberelina GA_3 na seleção do porte de bananeira das cultivares prata e prata-anã. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 449-453, dez. 2005.

CASSOL, L.F.; FORTUNATO, R.P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural,**
Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 57-60, 2009.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.; PERES, L. **Manual de fisiologia vegetal:** teoria e prática. Piracicaba: Livroceres, 2005. 650 p.

CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A. de; KLUGE, R.A. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal.** Maringá: Eduem, 2002. 254p.

CAZETTA, J. O. Cultivo de embriões imaturos de *Citros* em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1125-1131, nov./dez. 2005

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.D.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, fev. 1999.

CHAGAS, E.A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; SALLES, L. A. DUTRA, L. F. PEREIRA, R.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CASTRO, E.M.; SILVA, F.G. Germinação, avaliação de ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (unha-de-gato)
Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006.

CHARLES, H.P. Studies on the rowth of excised roots VII Effects of 2-naphthoxyacetic acido n excised roots from four strains of groundsel. **New Phytologist,** Lancaster**,** v. 58, n. 1, p.81-84, Apr. 1959. Disponível em: <http://www.jstor.org.br/stable/2429410> Acesso em: 14 jul. 2009

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas, oque é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, p. 18-21, 1998

COELHO, R.I.; CARVALHO, A.J.C.; 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**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 203-209, mar. 2009

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. Trad. de G.V.M.C. Catena. 2. ed. São Paulo: Roca, 1987. pt. 2: Órgãos, experimentos e interpretação, 336p.

DAVIES, F.T.; LAZARTE JUNIOR, J. E.; JOINER, J.N. Initiation and Development of Roots in Juvenile and Mature Leaf Bud Cuttings of *Ficus pumila* L. **American Journal of Botany**, New York, v. 69, n. 5, p. 804-811, May/June1982. Disponível em: http://www.jstor.org/stable/2442971 Acesso: 02 out. 2009.

DEVI, Y.S.; MUJIB, A.; KUNDU, S.C. Efficient regenerative potential from long term culture of pineapple. **Phytomorphology,** Delhi, v. 47, p. 255-259, 1997.

DIAS, M.M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G., NIETSCHE, S.; PEREIRA, M. C. T.; SANTOS, V. A. Diferentes concentrações de reguladores de crescimento no estiolamento *in vitro* de ananás do Campo 2009. In: FÓRUM DE ENSINO, 9.; SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 10.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; MOSTRA CIENTÍFICA DE ENSINO MÉDIO, 3.; SEMANA DE EXTENSÃO, 4., 2009, Montes Claros. **Anais...** Disponível em: <http://www.fepeg.unimontes.br/index.php/fepeg/fepeg2009/paper/viewFile/266/219.>. Acesso em: 09 dez. 2009.

DINIZ, J.F.D.N.; ALMEIDA, J.L.; TEIXEIRA, A.L.A.; GOMES, E.S.; HERNANDEZ, F.F.F. Ácido giberélico (ga3) e 6-benzilaminopurina (bap) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.] **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 27, n. 4, p. 934-938, jul./ago. 2003.

EAPEN, S.; GEORGE, L. Somatic embryogenesis in peanut: Influence of growth regulators and sugars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Boston, v. 35, p. 151-156, 1993.

ESAU, K. Vascular differentiation in plants.1 ed, Rinehart and Winston, New York. p.157 160, 1965,

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2. ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

FAHN, A. **Plant anatomy.** 4th ed. Oxford: Pergamon Press, 1990. 588 p.

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotececnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, jan./fev. 2004

GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 495-505.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by culture.** Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GÖKMEN, V.; ACAR, J. Liquid of chromatographic determination of β-naphthoxyacetic acid in tomatoes. **Journal of Liquid Chromotograpy**, New York, v. 798, p. 167-171, 1998.

GRATTAPAPLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa, SPI, 1998. p. 183-260.

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

GUTTENBERG, H.V. Die Aufgaben der endodermis. **Biol Zentrablatt**, Berlin, v. 63, p. 236–251, 1943.
HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. **Plant propagation:** principles and practices. 5th ed. New Jersey: [s.n.], 1990. 647 p.

HOPKINS, W.G.; HÜNER, N.P.A. **Introduction to plant physiology**. 3rd ed. Hoboken: John Wiley, 2004. 560 p.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R. **Handbook PF plant cell cultures.** New York, Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

HUGHES, M.; DOBSON, A.J. Structure determination and hydrogen bonding of 1 - naphthoxyacetic, a potencial plant growth hormone. **Journal of Chemical Crystallography**, New York, v. 34, n. 10, Oct. 2004.

IRVINE, V.; Studies in growth-promoting substances as related to x-radiation and phoperiodism. Thesis abstract, Colorado, v. 26, n. 1, p. 69-70, 1938.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J..**Biologia celular e molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 339 p.

KARNOWSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology,** New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2008.

KERSTEN, E.; LUCCHESI, A.A.; GUTIERREZ, L.E. Efeito do ácido indol-butírico no enraizamento de estacas de ramos de plantas de ameixeira (*Prunus salicina*, Lindl). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, fev./maio 1993.

KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L.E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, p. 127-129, 1995.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura.** 2. ed. Piracicaba: NAP/MEPA, 1999. 48 p.

KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Continued) II. The leaf. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 110, n. 3, p. 333-404, Mar. 1949. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2472619> Acesso: 29 set. 2009.

LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Meio de cultura, concentração de aib e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, jun. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil:** nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOSS, A.; TEIXEIRA M.B.G.; ASSUNÇÃO, M.; HAIM, P.G.; LOUREIRO, D.C.; SOUZA, J.R. Enraizamento de estacas de *Allamanda cathartica* L. tratadas com ácido indolbutírico (AIB). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias,** Recife, v. 3, n. 4, p. 313-316, 2008.

LUDERGAN, C.A.; JANICK, J. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. **Horticultural Research,** Edinburgh, v. 20, p. 19-24, 1980.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indol-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation,** Dordrecht, v. 32, p. 219-230, 2000.

MACÊDO, C.E.C.; SILVA, M.G.; NÓBREGA, F.S.; 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**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 501-504, dez. 2003.

MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana,** Sarasota, v. 2, p. 1-13, 1977.

MAGALHÃES JUNIOR, A.M.; PETERS, J.A. Cultura “in vitro” de ameixeira: efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 57-61, 1991.

MARGARIDO, S.M.F. **Abacaxi:** “O rei dos frutos”. São Paulo: Ícone, 1991. (Coleção Brasil Agrícola)

MARTINS, M.B.G.; CASTRO, P.R.C. Efeitos de giberelina e ethephon na anatomia de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1855-1863, out. 1999.

MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 39-44, dez. 2007.

MORALES, G.C.F. **Influência do AIB e da presença de folhas no enraizamento de estacas de laranjeira "Valencia" e tangerineiras Montenegrinas".** 1990. 125 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

MOREIRA, B.A.; WANDERLEY, M.G.L.; BARROS, M.A.V.C. **Bromélias:** importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia - Curso de Capacitação de Monitores. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 12 p.

MOREIRA, M.A.; ANJOS SOBRINHO, A.; PASQUAL, M. Indução ao estiolamento *in vitro* de brotos de abacaxi cv. Pérola. **Revista da Universidade de Alfenas,** Alfenas, v. 5, p. 193-197, 1999.

MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 1002-1006, 2003.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology,** Columbus, v. 25, p.135-166, 1974.

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

NASCIMENTO, A.C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; PORTO, J.M.P.; NOGUEIRA, G.F.; SOARES, F.P. Bap e aib no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias e Ambientais,** Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, abr./jun. 2008.

NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S.R.O.D.; PELACANI, C.R.; SANTANA, J.R.F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

NITSCH, J.P. Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. **American Journal of Botany**, New York, v. 37, n. 3, p. 211-215, Mar. 1950. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2437903>. Acesso em: 29 set. 2009.

NUTMAN, P.S.; THORNTON, H.G. Inibhition of plant growth by 2:4 – dichlorophexyacetic acid and other plant – growth substances. **Nature**, London v. 155, p. 498-500, april, 1945.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal, 3 ed. Atheneu, São Paulo, 2008, 228p.

PEREIRA, R.C.A.; PINTO J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CASTRO, E.M.; SILVA, F.G. Germinação, Avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006

PIRES, E.J.P.; BIASI, L.A. Propagação da videira In: POMMER, C.V. **Uva:** tecnologia de produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 295-350.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Ceres**, Lavras, v. 48, n. 280, p. 681-690, 2009.

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,** Mossoró, v. 14, p. 13-15, 2001.

QUIRINO, Z.B.R.; BARBOZA, S.B.S.C.; VIÉGAS, P.R.A.; LEDO, A.S. **Multiplicação in vitro do abacaxizeiro ornamental, *Ananas comosus* var. erectifolius, em meio líquido e gelificado.** Brasília: EMBRAPA, 2009. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 40).

QURESHI, S.A.; BUTTAR, S. A comparative study of the pharmacokinetics of propanolol and its major in the rat after oral and vaginal administration. **Xenobiotica**, London, v. 19, n. 8, p. 883-890, 1989.

RANGAN, T.S. Pineapple. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. v. 3, p. 373-382.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. A composição molecular das células vegetais. In: RAVEN, P.H.; EVERT R.F.; EICHHORN, S.E. (Org.). **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 17-39.

RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; CAVALLARI, L.L. Desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite: efeito das concentrações de sacarose e de ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 575-580, jul./set. 2009

ROCHA, M.A.C.; COSTA, M.A.P.C.; SILVA, S.A.; LEDO, C.A.S.; MOREIRA, M. J.S.; BASTOS, L.P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro

(*Genipa americana* l.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 769-774, set. 2008.

RODRIGUES, B.M.; SIQUEIRA, W.J.; FORNASIER, J.B.; LISBÃO, R.S. H.P. MEDINA FILHO. Embriogênese somática *in vitro* de cultivares de cenoura. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 303–314, 1987.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, May 1987.

SANDOVAL, J.A.F. In vitro recognition of high structure somaclonal variants in banana (Cv. 'Grand Naine, *Musa* AAA) response to a GA_3 treatment. **Guapilles**, Costa Rica, v. 24, p. 11-19, 1999.

SKOOG, F., AND MILLER, C.O**.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symp. Society Experiment Biology. v. 11**,** p.118–131, 1957.

SOARES, G.C.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Efeito do tempo de exposição do AIB no meio de cultura no enraizamento *in vitro* de Mirtilo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 8., 2006, Pelotas. **Anais...**

SOUSA, G.M.; WANDERLEY, M.G.L. *Aechmea rodriguesiana* (L. B. Sm.) L.B. Sm. (Bromeliaceae) uma espécie endêmica da Amazônia brasileira. **Acta Amazônica,** Manaus, v. 37, n. 4, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p. 423-460.

TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de *Ananas comosus* (L.) Merril cultivar “Smooth Cayenne” em diferentes concentrações de macronutrientes, **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 69-73, 2007.

TELLES, A.; BIASI, L.A. Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa-de-vegetação do caquizeiro (*Diospyrus kaki* L.) Charles. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 481-484, mar./abr. 2005.

THIRD INTERNATIONAL CONFERENCE PLANT GROWTH SUBSTANCES, **Nature,** v. 176, p. 529-531, 1955.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; REIS, G.G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, p. 1-7, 2003.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

USBERTI FILHO, J.A.; SIQUEIRA, W.J.; SPIRONELLO, A.; TANAKA, M.A.S.;SIGRIST, J.M.M.; MARTINS, A.L.M.; BORTOLETTO, N.; TSUHAKO, A.T.; GUSHIKEN, A. **IAC Gomo-de-mel**. Campinas: IAC, 1999. 1 Folder.

VAN FLEET, D.S The development and distribution of the endodermis and an associated oxidase system in monocotyledonous plants. **American Journal of Botany**, New York, v. 29, p. 1-15, 1942.

_____. Histochemistry and function of the endodermis. **The Botanical Review,** Chicago, v. 27, n. 2, p. 165-222, 1961.

VAN OVERBEEK, J.; BLONDEAU, R.; HORNE, V. Difference in activity between 2-4dichlorophenoxyacetic acid and other auxins, and its significance in herbicidal action. **Plant Physiology,** Rockville, v. 26, n. 4, p. 687-694, 1951.

VICHIATO, M.R.M.; VICHIATO, M.; CASTRO, D.M.; DUTRA, L.F.; PASQUAL, M.; MARCHIORI JÚNIOR, W.; LIMA, C.D.F.; SALGADO, C.C. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diplóides e tetraplóides de *Dendrobium nobile* Lindl. **Revista Ceres,** Lavras, v. 53, n. 310, p. 541-548, 2006

VIDAL, J.R.; RAMA, E.J.; TABOADA, L.; MARTIN, C., IBANEZ, M.; SEGURA, A.; GONZALEZ-BENITO, M.E. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, v. 96, p. 85–94, 2009.

ZEPEDA, C.; SAGAWA, Y. *In vitro* propagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 495, 1981.

ZIMMERMAN, P.W. Effects of β-naphthoxyacetic acid on plants. **Nature,** London, v. 147, p- 780, June, 1941.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo