

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE
ABACAXIZEIRO ‘GOMO DE MEL’ SUBMETIDO A REGULADORES VEGETAIS**

CHRYSYTIANE BORGES FRÁGUAS

Orientadora: Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU - SP

Setembro – 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Fráguas, Chrystiane Borges, 1976-
FH11a Análises bioquímicas e histológicas na micropropagação
de abacaxizeiro 'gomo de mal' submetido a regulares vege-
tais / Chrystiane Borges Fráguas. - Botucatu : [s.n.],
2006.
iii, 100 f. : il., color., gráfs, tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Facul-
dade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006
Orientador: Giuseppina Face Pereira Lima
Inclui bibliografia

1. Abacaxi. 2. Folhas - Anatomia. 3. Plantas - Propagação.
4. Bioquímica. 5. Reguladores de crescimento. I. Lima, Giu-
seppina Face Pereira . II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade
de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: **ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HISTOLÓGICAS NA MICROPROPAGAÇÃO
DE ABACAXIZEIRO 'Gomo de Mel' SUBMETIDO A REGULADORES
VEGETAIS.**


ALUNO: CHRYSTIANE BORGES FRÁGUAS

ORIENTADOR: PROFA. DRA. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

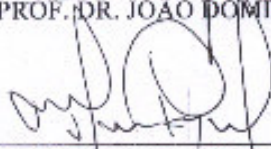
Aprovado pela Comissão Examinadora



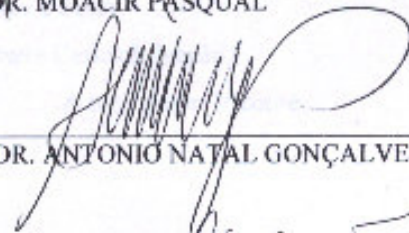
PROFA. DRA. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA



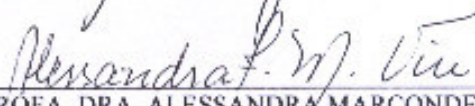
PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES



PROF. DR. MOACIR PASQUAL



PROF. DR. ANTONIO NATAL GONÇALVES



PROFA. DRA. ALESSANDRA MARCONDES FEIJÓ VIU

Data da Realização: 06 de outubro de 2006.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

A meus queridos pais José Carlos e Zilda

A meu irmão Carlos Eduardo

A meu noivo Vicente

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força recebida todos os dias.

À Faculdade de Ciências Agronômicas e ao CNPq, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À profa. Giuseppina Pace Pereira Lima pela orientação, ensinamentos e amizade durante todo curso.

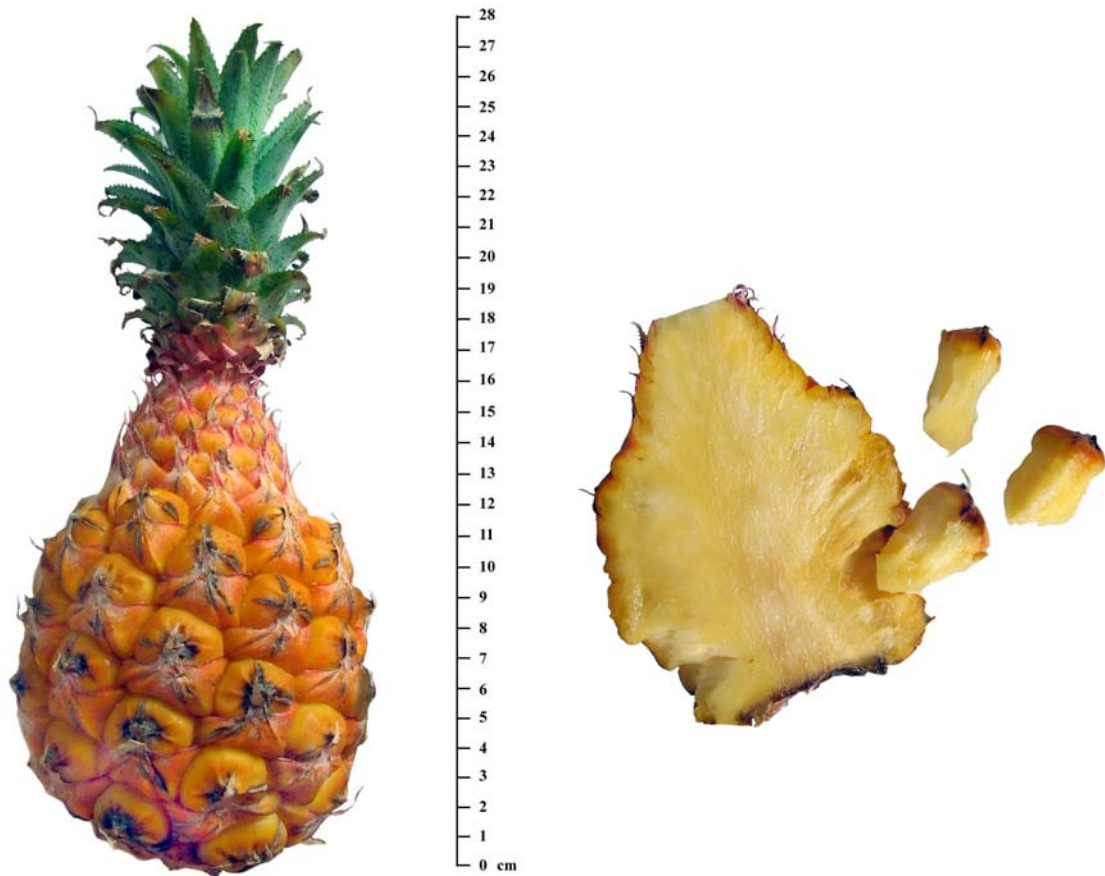
À amiga e colega Daniela Dias Pinto pelo auxílio na realização dos trabalhos de anatomia e pela amizade de sempre.

À Carolina Dornelles pelo precioso auxílio na condução dos experimentos e pelos bons momentos proporcionados durante todo esse período.

Às amigas Ana Maria, Juliana, Karina, Lílian, Camila, Lylian, Márcia, Marco Antônio, Clayton, Cláudio, pelos momentos de estudos, convivência e amizade.

A todos que estavam dia a dia no laboratório de bioquímica realizando seus trabalhos e juntos proporcionando momentos agradáveis.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes nessa etapa da minha vida.



Ananas comosus 'IAC GOMO-DE-MEL'

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação exógena de poliaminas e TIBA (antiauxina) na micropropagação e anatomia foliar de plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' e analisar os teores de poliaminas endógenas, atividade de peroxidase, proteína, IAA-oxidase e a provável relação com as diferentes fases da micropropagação. Inicialmente, retiraram-se as gemas da coroa de frutos sadios e a assepsia foi realizada com hipoclorito de sódio comercial (2 a 2,5% de cloro ativo) a 30% por 20 minutos e lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, inocularam-se as gemas em meio MS sólido contendo diferentes combinações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) e NAA (0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Após 60 dias, foram selecionados os melhores tratamentos para proliferação das brotações, que foram individualizadas e transferidas para estes meios por mais trinta dias, em meio MS líquido. Plantas oriundas do experimento anterior tiveram as folhas cortadas e apenas segmentos de 1 cm foram inoculados em meio MS líquido contendo os diferentes tratamentos: T1-MS, T2-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, T3-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD, T4-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPM, T5-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT, T6-MS + 10 mM SPD, T7-MS + 10 mM SPM e T8-MS + 10 mM PUT. Na última fase, segmentos foram inoculados em meio MS líquido contendo os tratamentos: T1-MS, T2-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, T3-MS + 0,5 µM TIBA, T4-MS + 1,0 µM TIBA, T5-MS + 2,0 µM TIBA, T6-MS + 4,0 µM TIBA, T7-MS + 8,0 µM TIBA e T8-MS + 16,0 µM TIBA. Após, as plantas foram aclimatizadas em substrato Plantmax[®] e houve 100% de sobrevivência, independente do tratamento. Foram realizados cortes histológicos foliares para estudar a influência das poliaminas e TIBA na anatomia foliar. Maior número de brotações foi observada com 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ de NAA, porém com hiperhidricidade. As poliaminas e o TIBA isoladamente não induziram brotações, mas a putrescina reverteu a hiperhidricidade nas plantas. O aumento dos teores de poliaminas endógenas está relacionado com número e comprimento das brotações. Houve aumento na espessura dos tecidos foliares com a aplicação exógena de poliaminas e TIBA.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, organogênese, poliaminas, ácido 2,3,5-triidobenzóico, anatomia foliar

POLYAMINES AND AUXIN RELATION IN PINEAPPLE 'IAC GOMO-DE-MEL' MICROPROPAGATION. TESE (DOUTORADO) FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU. Botucatu, 2006. 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CHRYSTIANE BORGES FRÁGUAS

Adviser: GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

SUMMARY

The effects of exogenous polyamines and TIBA (antiauxin) application in the micropropagation, leaf anatomy of pineapple plants 'IAC Gomo-de-mel' and the contents of endogenous polyamines, peroxidase activity, protein, IAA-oxidase and probable relationship with the different micropropagation phases were studied. Initially, the axillary bud explants were excised from the crown of healthy fruits and the asepsis was accomplished with sodium hypochloride (2 to 2,5% of active chlorine) 30% for 20 minutes and washed 3 times in distilled and autoclaveted water. After, the axillary buds were inoculated in MS solid medium containing the different BAP (0; 0,5; 1,0 and 1,5 mg L⁻¹) and NAA (0; 0,5 and 1,0 mg L⁻¹) combinations. After 60 days, the best treatments were selected for shoot proliferation that were individualized and transferred to these media for more 30 days, in MS liquid medium. Plants from the previous experiment had the leaves cut and just 1 cm segments were inoculated in MS liquid medium containing the different treatments: T1-MS, T2-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, T3-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD, T4-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPM, T5-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT, T6-MS + 10 mM SPD, T7-MS + 10 mM SPM and T8-MS + 10 mM PUT. In the last phase, segments were inoculated in MS liquid medium containing the treatments: T1-MS, T2-MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, T3-MS + 0,5 mM TIBA, T4-MS + 1,0 mM TIBA, T5-MS + 2,0 mM TIBA, T6-MS + 4,0 mM TIBA, T7-MS + 8,0 mM TIBA and T8-MS + 16,0 mM TIBA. After, the plants were acclimatized in Plantmax[®] substrate and there were 100% survival, independent of the treatment. Leaf cuts were made to study polyamines and TIBA influence in the leaf anatomy. The highest shoot number was

observed with 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, however with hyperhydricity. Using only polyamines and TIBA didn't induce shoots, but the hyperhydricity in the plants was reverted by putrescine. The increase of the endogenous polyamine contents is related with shoot number and length. There was increase in the thickness of leaf tissue with exogenous polyamine and TIBA application.

Keywords: *Ananas comosus*, organogenesis, polyamines, 2,3,5-triiodobenzoic acid, leaf anatomy

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o 2º produtor mundial de abacaxi (1,64 milhão de toneladas, em 71.992 hectares plantados) (www.sidra.ibge.gov.br), ocupando a primeira posição na América do Sul, somente suplantado pela Tailândia, com 1,98 milhão de toneladas. Os principais compradores de suco concentrado e de fruto *in natura* são a Argentina, Uruguai, Países Baixos e Estados Unidos. No Brasil, os principais Estados produtores são Minas Gerais (523.800 t), Paraíba (333.100 t) e Pará (177.900 t).

O Estado de São Paulo ocupa, apenas, o 8º lugar (42.600 t) (www.iac.sp.gov.br), entretanto, é o maior consumidor de abacaxi de mesa e o maior produtor de suco concentrado para exportação, apesar de produzir apenas 5% do abacaxi que utiliza. A produção paulista do fruto está concentrada nas regiões Oeste/Noroeste - São José do Rio Preto e Araçatuba (50%) e Central - Bauru e Marília (48%).

A qualidade da polpa é altamente cotada, tanto no mercado internacional como no interno, podendo proporcionar até 60% de aumento de preço do produto. Como fatores desejáveis citam-se: elevado °Brix, baixa a moderada acidez, consistência tenra, suculência e coloração atraente (amarelo-ouro). O novo cultivar 'IAC Gomo-de-mel' reúne todo o conjunto dos caracteres acima citados, ao contrário dos cultivares atualmente disponíveis para o consumo *in natura* ('Pérola' e 'Smooth Cayenne') (www.iac.sp.gov.br).

Existem amplas possibilidades de expansão da abacaxicultura no Estado de São Paulo, tanto para o consumo *in natura* como para o processamento industrial,

desde que novos cultivares, com caracteres desejáveis de planta e fruto sejam colocados à disposição dos produtores.

O maior problema da cultura é a alta susceptibilidade à fusariose observada nos principais cultivares (Ventura, 1994), inclusive o 'IAC Gomo-de-mel'. Considerada a doença de maior importância para a cultura no país, a fusariose, caracteriza-se pela exudação de uma substância gomosa que, além de provocar a podridão do fruto infecta as mudas que são as unidades propagativas desta cultura. A estimativa de perdas situa-se em 30% para os frutos e cerca de 20% para as mudas. Atualmente, a doença ocorre praticamente em todas as regiões produtoras do Brasil (Ventura, 1994). Como essa doença se dissemina através de mudas contaminadas pode-se afirmar que o primeiro passo para o sucesso da cultura é a aquisição de mudas sadias.

A cultura de tecidos é uma técnica de grande importância, pois proporciona a produção de milhares de mudas a partir de uma única gema, em pequeno intervalo de tempo e espaço e totalmente livre de doenças e pragas.

Diversos autores têm observado resultados satisfatórios com a utilização de substâncias que podem favorecer a micropropagação. Entre estas encontram-se as poliaminas, tais como putrescina, espermidina e espermina que são relatadas como substâncias que agem na divisão e crescimento celular, podendo servir como marcadores de organogênese, estresse, maturação e senescência. São estudadas também substâncias tais como inibidores do transporte (ácido 2,3,5-triiodobenzóico 'TIBA' e ácido naftilfitalamico 'NPA') e ação (ácido *p*-clorofenoxi isobutírico 'PCIB') das auxinas, a fim de otimizar a micropropagação e permitir maior esclarecimento do papel da auxina no controle do crescimento de gemas laterais.

Outras substâncias podem também ser usadas como indicadoras de processos fisiológicos e morfológicos de diversos vegetais, como as peroxidases, que são enzimas associadas às paredes celulares, mas também podem ser encontradas em várias organelas e membranas. As isoformas de peroxidase presentes nos vegetais variam tanto quantitativa quanto qualitativamente de acordo com a espécie, tecido, estágio de desenvolvimento ou em função da interação da planta com o meio ambiente. Além disso, podem ser alteradas por fatores externos como luz, temperatura, pH e outros tipos de estresse.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da aplicação exógena de poliaminas e a antiauxina TIBA na micropropagação e anatomia foliar de plantas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' e analisar os teores de poliaminas endógenas, atividade de peroxidase, proteína, IAA-oxidase e a provável relação com as diferentes fases da micropropagação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem

Introduzido da China em 1991, 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.

O nome deste cultivar se deve ao fato dos frutinhos serem soldados menos fortemente entre si, ao contrário do que ocorre em outros cultivares, podendo serem facilmente destacáveis no fruto maduro. Essa singularidade era desconhecida no momento de sua introdução (www.iac.sp.gov.br).

2.2 Características morfoagronômicas

Este cultivar 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 (Tabela 1) (www.iac.sp.gov.br).

Tabela 1. Características da planta do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-Mel’ em comparação com as dos cultivares comerciais Smooth Cayenne (Hawai ou Bauru) e Pérola.

Cultivar	Altura Média da planta (cm)	Número de Folhas	Espinosidade	Coloração da Folha	Ciclo Total (meses)
IAC-Gomo-de-Mel	80	40	Total	verde-escura	19,5
Smooth Cayenne	90	40	Parcial	verde-arroxeadada	20,0
Pérola	70	30	Total	verde-arroxeadada	19,0

2.3 Características externas do fruto

Os frutos deste cultivar são pequenos, de formato quase cilíndrico, com casca de espessura média, apresentando coloração amarelo-ouro quando maduro. Os frutinhos são grandes e salientes, o que provavelmente, pode conferir maior resistência ao transporte. O peso médio de frutos com coroa é de 1,044 Kg, apresentando coroa curta (11 cm) e leve (77g). Apresenta ainda, média de 7,8 filhotes/planta (Tabela 2 e 3) (www.iac.sp.gov.br).

Tabela 2. Características externas do fruto do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-Mel’ em comparação com as dos cultivares comerciais Smooth Cayenne (Hawai ou Bauru) e Pérola.

Cultivar	Comprimento do Fruto (cm)	Diâmetro médio do Fruto (cm)			Espessura da Casca	Frutinho	
		Base	Meio	Ápice		Tamanho	Formato
IAC-Gomo-de-mel	12,9	10,4	11,8	8,8	média	grande	saliente
Smooth Cayenne	15,7	10,3	12,0	9,0	média	médio	achatado
Pérola	16,1	7,9	9,6	7,0	fina	médio	achatado

Tabela 3. Características externas de fruto do abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel' em comparação com as dos cultivares comerciais Smooth Cayenne (Hawai ou Bauru) e Pérola.

Cultivar	Peso médio do fruto com "coroa" (g)	Peso médio (g) coroa	Comprimento médio (cm) coroa	Nº Médio de filhotes/plantas
IAC-Gomo-de-Mel	1044	77,0	11,0	7,8
Smooth Cayenne	1660	220,0	16,7	3,8
Pérola	1212	121,0	20,4	10,4

2.4 Características da polpa

Possui polpa de coloração amarelo-ouro, suculenta, de ótimo sabor, textura macia e com cilindro central de tamanho médio (2,9 cm). A porcentagem de sólidos solúveis (°Brix) é muito 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' (Tabela 4 e 5) (www.iac.sp.gov.br).

Tabela 4. Características da polpa do fruto do abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel' em comparação com as dos cultivares comerciais Smooth Cayenne (Hawai ou Bauru) e Pérola.

Cultivar	Coloração	Suculência	Sabor	Textura (Kgf)	Diâmetro do Cilindro Central (cm)
IAC-Gomo-de-mel	Amarelo-ouro	Suculenta	Ótimo	0,8	2,9
Smooth Cayenne	Amarelo	Suculenta	Bom	2,2	2,8
Pérola	Branco-pérola	Muito suculenta	Muito bom	2,4	2,1

Tabela 5. Características da polpa do fruto do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-Mel’ em comparação com as dos cultivares comerciais Smooth Cayenne (Havai ou Bauru) e Pérola.

Cultivar	Porcentagem de Sólidos Solúveis				Acidez Titulável		Teor de Vitamina C
	Base	Meio	Ápice	Média	Base	Ápice	
IAC-Gomo-de-mel	21,5	21,7	19,6	20,9	0,51	0,63	20,5
Smooth Cayenne	16,6	14,0	10,0	13,5	0,74	0,79	20,0
Pérola	13,4	11,8	10,4	11,9	0,57	0,67	26,6

2.5 Resistência/tolerância a pragas e doenças

Este cultivar também apresenta suscetibilidade à fusariose (*Fusarium subglutinans*) como os cultivares em distribuição comercial, mas apresenta moderada resistência a nematóides (Tabela 6). Apresenta também boa "vida-de-prateleira" quando maduro (até 12 dias, em condição ambiente), maior do que a dos cultivares tradicionais, talvez em virtude de sua provável maior resistência ao transporte.

Este novo material genético é especialmente recomendado para mesa (consumo individual) e as técnicas de plantio, manutenção e colheita de frutos idênticas às utilizadas para os demais cultivares disponíveis (www.iac.sp.gov.br).

Tabela 6. Resistência/tolerância a pragas e doenças do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-Mel’ em comparação com os cultivares comerciais Smooth Cayenne (Havai ou Bauru) e Pérola.

Cultivar	Fusariose	Nematóide
IAC-Gomo-de-mel	Suscetível	Moderadamente resistente
Smooth Cayenne	Suscetível	Suscetível
Pérola	Muito suscetível	Muito suscetível

2.6 Propagação

A reprodução via sementes é utilizada em programas de melhoramento genético, a partir da polinização cruzada entre variedades e/ou espécies diferentes, tendo em vista a obtenção de híbridos com características superiores às das cultivares em uso, tais como resistência à fusariose, tolerância ao ataque de cochonilhas e nematóides, ausência de espinhos nas folhas, entre outras. Em plantios comerciais não há produção de sementes devido à auto-esterilidade das flores e à formação partenocárpica do fruto, sem ocorrer a fecundação (Haroldo e Reinhardt, 1998).

O método convencional de propagação utilizado nos plantios comerciais de abacaxi é a partir de mudas retiradas das próprias plantas. Contudo, o sucesso desta cultura depende muito da qualidade da muda. A sanidade do material para plantio assume importância ainda maior no cultivo do abacaxi, pois mudas com doenças constituem o principal fator de dispersão da fusariose, além de representar um dos veículos de dispersão da cochonilha, a praga mais prejudicial ao abacaxi.

O ciclo da cultura dependerá do tipo de muda utilizado, sendo fundamental a seleção das mudas por tipo e tamanho, favorecendo o escalonamento da produção com maior uniformidade além de facilitar os tratamentos culturais e a colheita (Cunha et al., 1994).

2.7 Micropropagação de abacaxizeiro

A formação de plantas a partir de gemas apicais de mudas de abacaxi, cultivadas *in vitro*, foi demonstrada inicialmente por Sita et al. (1974), Mathews e Rangan (1979) e Zepada e Sagawa (1981).

Até o momento, não há referências sobre a micropropagação do abacaxi 'IAC Gomo-de-mel', porém, para os cultivares mais comuns vários trabalhos são encontrados, o que pode auxiliar na pesquisa deste novo cultivar.

Para iniciar o cultivo *in vitro* e para o posterior crescimento e desenvolvimento das plantas, são utilizados reguladores vegetais, principalmente citocininas e auxinas. As citocininas promovem o desenvolvimento das brotações por aumento da divisão celular (Schmülling, 2002). A aplicação de citocininas no meio de cultura quebra a dominância apical e promove a expressão de um complexo de genes que resulta na formação de brotos (King e Van Staden, 1990; Howel, 2003). As auxinas estão relacionadas a diversos processos fisiológicos nas plantas, inclusive ao controle do crescimento de brotações laterais e raízes, tropismo e dominância apical (Lomax et al., 1995).

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

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

Para o cultivar Pérola, Pescador e Koller (1992) alcançaram taxas de multiplicação de 9,4; 12,0 e 10,1 brotações utilizando meio MS contendo variações de BAP e NAA. Segundo Moore et al. (1992), para a micropropagação do abacaxi os melhores explantes são gemas axilares de coroas ou caules, o melhor meio é o MS básico suplementado com 3% de sacarose, 0,8% de ágar, 0,57 mM de inositol, 1,2 μM de tiamina, 10,8 μM de NAA e 8,8 μM BAP com pH ajustado para 5,7, com subculturas feitas em intervalo de quatro semanas.

Almeida et al. (2002) otimizaram o protocolo de micropropagação observando que a utilização do meio MS líquido com 1,5 mg L^{-1} de BAP resulta em média

2013,5 brotações por explante após 5 subcultivos. Resultados semelhantes foram observados por Guerra et al. (1999).

Albuquerque et al. (2000) concluíram que os meios N₆ (Chu et al., 1975) suplementados com IAA e GA₃ e MS com BAP foram os mais indicados para a regeneração de ápices caulinares e esse cultivo permitiu a limpeza clonal do abacaxizeiro infectado por *Fusarium subglutinans*.

Macêdo et al. (2003) relataram que concentrações mais baixas de BAP e NAA facilitam a individualização dos brotos e apresentam bons resultados para número de brotos e massa fresca, embora, Omokolo et al. (2001) observaram maior taxa de proliferação ao utilizarem 4 mg L⁻¹ de BAP ou 6 mg L⁻¹ de cinetina.

A redução da concentração de IAA em segmentos que tiveram o ápice cortado, o aumento da divisão celular e conseqüente desenvolvimento de gemas axilares, foram relatados por Souza et al. (2003). O grande número de brotos adventícios produzidos na presença de citocininas é consistente com o conhecimento de que as citocininas superam a dominância apical promovendo a quebra de dormência e conseqüentemente, a formação de brotos laterais (George, 1993).

2.8 Poliaminas na Micropropagação

As poliaminas são pequenas aminas alifáticas presentes em plantas, animais e microrganismos. As poliaminas mais predominantes nas plantas são a espermidina (SPD), espermina (SPM) e a diamina precursora putrescina (PUT) (Galston e Kaur-Sawhney, 1990). Podem ocorrer como bases moleculares livres (poliaminas livres) ou associadas a pequenas moléculas como ácidos fenólicos (poliaminas conjugadas) e com várias moléculas como proteínas e parede celular (poliaminas insolúveis) (Galston e Kaur-Sawhney, 1990; Bezold et al., 2003).

As poliaminas atuam em diversos processos biológicos nas plantas, incluindo divisão celular, diferenciação, embriogênese, controle da rizogênese, florescimento, amadurecimento, senescência (Galston e Kaur-Sawhney, 1990; Bezold et al., 2003; Wallace et al., 2003; Jänne et al., 2004), participação na defesa celular contra estresse oxidativo através

da inibição da peroxidação de lipídios (Velikova et al., 2000) e captura de radicais livres (Belle et al., 2004). Pesquisas têm mostrado que a aplicação exógena de poliaminas confere alguns efeitos contra o estresse osmótico (Besford et al., 1993; Liu et al., 2004), tratamento com alta temperatura (Murkowski, 2001), estresse salino (Chattopadhyay et al., 2002), entre outros. A quebra da homeostase das poliaminas pode afetar negativamente a proliferação celular e eventualmente levar à morte celular (Wallace et al., 2003; Takao et al., 2006).

As poliaminas são conhecidas também por afetarem a fluidez de membranas. Segundo Tiburcio et al. (1993), este efeito pode ser resultante da interação direta com lipídios da membrana ou indiretamente pela modulação da atividade de enzimas. De acordo com Drolet et al. (1986), poliaminas podem também atuar em nível de membrana promovendo a estabilização de sua composição molecular e, conseqüentemente, concorrendo para preservar sua integridade. Os mecanismos associados a esses efeitos, provavelmente, estão relacionados com a ligação direta das poliaminas às membranas, prevenindo a peroxidação de lipídeos e ataques proteolíticos e a inibição da síntese de etileno através da inibição de ACC sintase (aminociclopropano-carboxílico sintase). Atuam também em muitos processos fisiológicos incluindo respostas a ferimentos (Perez-Amador et al., 2002; Walters et al., 2002), crescimento dos internódios (Hanzawa et al., 2000) e freqüentemente exercem efeitos que se assemelham aos dos reguladores vegetais.

As atividades fisiológicas das poliaminas e citocininas têm muito em comum, entretanto, pouco é conhecido sobre a interação entre as duas substâncias. Os efeitos das citocininas na biossíntese e conteúdo das poliaminas foram reportados por diversos autores (Galston, 1983; Sergiev et al., 1995). Galston (1983) sugeriu que as poliaminas poderiam funcionar como mensageiros secundários para alguns reguladores vegetais, principalmente as citocininas.

A espermidina e espermina são sintetizadas pela diamina putrescina pela consecutiva adição de grupos aminipropil derivados da descarboxilação da S-adenosilmetionina (Tiburcio et al., 1997; Wallace et al., 2003). Existem dois caminhos para a produção da putrescina, ambos envolvendo a descarboxilação de aminoácidos (ornitina e arginina). No primeiro caso, a descarboxilação é catalisada pela ornitina-descarboxilase (ODC) e produz putrescina diretamente (Figura 1). No segundo caso, a arginina é descarboxilada à agmatina pela arginina-descarboxilase (ADC) e subseqüentemente, a

agmatina é convertida em putrescina pela agmatina iminohidrolase e N-carbamoilputrescina amidohidrolase. Na maioria das plantas ambos os caminhos são operacionais (Tiburcio et al., 2004) (Figura 1).

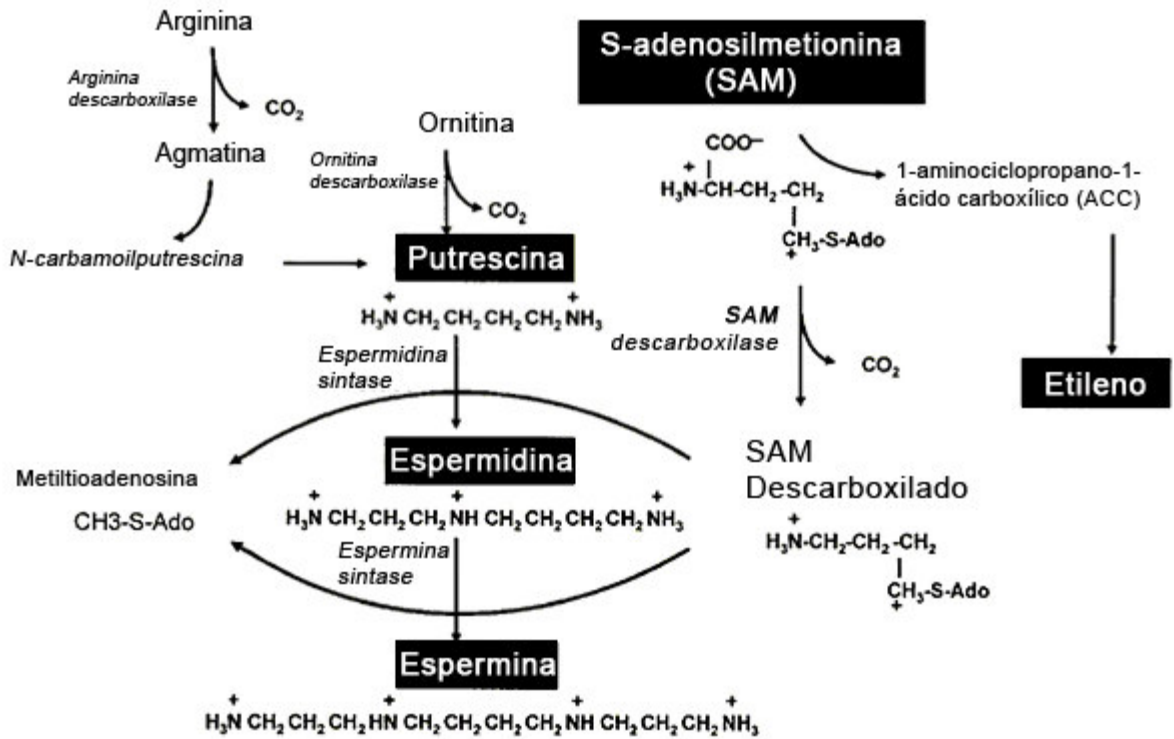


Figura 1. Vias de síntese de poliaminas e etileno (adaptado de Mehta et al., 2002)

Acosta et al. (2005) citam que a ODC está provavelmente associada à células em divisão, principalmente em meristemas, porque essas células estão ativamente envolvidas com a replicação do DNA, e ADC à células em expansão e diferenciação. Altos níveis de ADC em tecidos que não estão em divisão celular estão relacionados com o aumento da síntese de putrescina (Perez-Amador e Carbonel, 1995; Wallace et al., 2003), indicando que a agmatina, sintetizada via ADC, é metabolizada a putrescina e eventualmente, a outras poliaminas. Porém um papel específico para agmatina em plantas não pode ser descartado.

As plantas adquiriram a habilidade para produzir putrescina por ADC para encontrar exigências específicas durante o desenvolvimento normal e também durante a adaptação ao ambiente em resposta ao estresse (Perez-Amador et al., 2002) ou a resposta hormonal (Perez-Amador e Carbonel, 1995).

De acordo com Bortolotti et al. (2004), a atividade de ADC tem sido localizada principalmente em cloroplastos de tecidos fotossintetizantes e no núcleo de tecidos não fotossintetizantes.

Tratamentos que modificam os níveis de poliaminas, tais como aplicação exógena de poliaminas (Altman et al., 1990) ou inibidores específicos da biossíntese de poliaminas (Mengoli et al., 1989), são utilizados para promover a morfogênese.

Astarita et al. (2003) observaram que a relação putrescina/espermina+espermidina foi mais elevada durante as fases iniciais do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia*, correspondendo à multiplicação e alongamento, com decréscimo nos estádios finais, quando ocorre a estabilização do conteúdo da matéria seca.

Malá et al. (2005) relataram o efeito correlacionado das poliaminas, citocininas e auxinas na multiplicação e enraizamento de *Ulmus glabra*.

A putrescina aplicada exogenamente foi transportada para vários órgãos e rapidamente convertida à espermidina e espermina, regulando o metabolismo das poliaminas em *Glycine max* (Ohe et al., 2005).

Fobert e Webb (1988) demonstraram o envolvimento das poliaminas na regulação da morfogênese e na embriogênese somática de cotilédones de berinjela cultivados *in vitro* e concluíram que os níveis de espermidina livre aumentaram durante os estádios iniciais da cultura. Também verificaram que o material com maior potencial morfogênético continha mais putrescina livre. A inibição da síntese de putrescina reduziu o número de embriões formados e estimulou a produção de um grande número de raízes.

Rajam e Bajaj (1996) estudaram a aplicação de espermidina exógena na restauração do potencial morfológico de culturas velhas de calos de arroz. Os autores observaram que o tratamento com espermidina elevou a concentração celular de espermidina, a redução de putrescina e da atividade da arginina descarboxilase (ADC), levando a um ajuste na relação putrescina/espermidina, restaurando o potencial morfogênético.

Estudos sobre o enraizamento de micro-estacas *in vitro* de videira realizados por Martin-Tanguy e Carre (1993), mostraram que a aplicação de putrescina (0,12 mM) e espermidina (0,25 mM) levou ao incremento no número de explantes micropropagados, número de raízes por explante, número de internódios, comprimento das raízes, espessura dos caules e peso de massa seca e fresca. A aplicação de putrescina e espermidina aumentou a concentração de putrescina nas raízes.

Poliaminas aplicadas exogenamente na cultura de tecidos de *Curcuma longa* L., mostraram-se essenciais para a indução de calos rizogênicos quando combinadas com NAA e BAP na formação de plantas vigorosas (Viu, 2000).

Tavares (2000) estudando a aplicação exógena de poliaminas em *Aechmea distichantha* L. verificou que a espermidina estimulou a emissão de brotos, porém, putrescina e espermidina tiveram efeito deletério em relação à emissão de raízes.

2.9. Anatomia de plantas micropropagadas

Estudos histológicos demonstram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciados se comparados à plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Brainerd e Fuchigami, 1981; Sutter e Langhans, 1982; Santos, 2001; Fráguas, 2003; Albert, 2004; Louro et al., 2003; Arigita et al., 2005). Especula-se que o ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta (Albert, 2004).

Diversos autores relatam a utilização de diferentes técnicas a fim de otimizar o desenvolvimento *in vitro* e obter satisfatória aclimatização das plantas (Haisel et al, 1999; Radmann et al., 2001; Kadleček et al., 2003; Zobayed et al., 2001). Algumas substâncias adicionadas ao meio de cultura podem favorecer o crescimento e desenvolvimento dos tecidos ainda na fase de cultivo *in vitro* por atuarem na regulação do crescimento e desenvolvimento, mediando a ação de hormônios e divisão celular, tais como as poliaminas (Galston e Kaur-Sawhney, 1995). Liu et al. (2000) demonstraram que a espermina, espermidina, cadaverina e putrescina são fortes inibidores da abertura e fechamento dos estômatos em *Vicia faba*.

Desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* têm sido descritas principalmente como vitrificação ou hiperhidricidade (Ziv, 1991). A desorganização no desenvolvimento de meristemas e folhas causada pela hiperhidricidade resulta em plantas frágeis, translúcidas e hiperhidratadas. As modificações manifestadas principalmente nas folhas afetam a fotossíntese e as trocas gasosas, que apresentam características intermediárias com relação àquelas que cresceram em casa-de-vegetação ou campo.

Segundo Serret (1996), os explantes apresentam estrutura e fisiologia modificadas devido a algumas condições como baixa irradiância, altos níveis de sacarose e baixo teor de CO₂ disponível, dificultando a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e afetando a sobrevivência *ex vitro*. O mesofilo de plantas micropropagadas apresenta-se não organizado e consiste de parênquima esponjoso, rico em espaços intercelulares (Fidelis, 1998).

Além das alterações anatômicas nos tecidos das plantas micropropagadas, o número e formato dos estômatos também são afetados. Os estômatos são estruturas fundamentais para as plantas porque através deles ocorrem os processos de troca gasosa.

2.10 Antiauxinas

A auxina é um hormônio essencial como regulador do crescimento e desenvolvimento. A principal auxina, ácido indolacético (IAA), é um ácido fraco que é sintetizado em regiões meristemáticas do ápice da parte aérea e transportado à raiz. Então, é redirecionado para a região cortical e tecidos epidérmicos para gerar um gradiente basípeto de auxina (Blakeslee et al., 2005).

O transporte polar da auxina fornece informações essenciais de direcionamento e posicionamento para processos de desenvolvimento, como diferenciação vascular, dominância apical, desenvolvimento de órgãos e tropismo (Benkova et al., 2003; Blancaflor e Masson, 2003; Blilou et al., 2005).

A dominância apical, conceituada como sendo o controle exercido pelo ápice da parte aérea sobre o crescimento das gemas laterais, ramos e folhas, é influenciado por diversos fatores ambientais, genéticos e fisiológicos (Taiz e Zeiger, 2004; Davis e Simmons, 1994; George, 1996). Os diferentes níveis de influência da dominância apical no desenvolvimento das plantas têm sido relacionados ao balanço endógeno entre auxinas/citocininas (Mantedioca, 1996; Zaffari, 1998).

A inativação do IAA é mediada via reações foto-oxidativas e sistemas oxidativos enzimáticos (Salisbury e Ross, 1992). Atribui-se ao sistema oxidativo enzimático, conhecido por IAA-oxidase, um dos papéis de importância maior no controle dos níveis endógenos de IAA nas plantas. Beffa et al. (1990) demonstraram que vários inibidores do transporte de IAA podem igualmente atuar na atividade da IAA-oxidase, em geral, TIBA e NPA (ácido naftilfitalamico). Hrubcová et al. (2000) relataram que o declínio da atividade de IAA-oxidase coincidiu com a diminuição no teor de IAA, devido, provavelmente, à formação de conjugados com IAA, sendo que esses conjugados podem reter ou perder a atividade auxínica (Salisbury e Ross, 1994).

Para maior esclarecimento do papel da auxina no controle do crescimento de gemas laterais, diversos estudos sobre os efeitos de substâncias inibidoras do transporte de auxina, como, por exemplo, o TIBA (ácido 2,3,5-triiodobenzóico) e NPA, e da ação de auxinas, como o PCIB (ácido *p*-clorofenoxi isobutírico), na liberação e/ou diminuição da dominância apical estão sendo realizados (Nakano et al., 2000; Choi et al., 2001; Priyanka e Rao, 2006).

Ross (1998) reportou o efeito do TIBA, NPA e HFCA (ácido 9-hidroxi fluoreno-9-carboxílico) sobre o transporte da auxina endógena em *Pisum sativum* L. demonstrando diminuição dos níveis deste regulador nas plantas tratadas. Hooker e Nabors (1997) e Toldi et al. (1996) reportaram os efeitos benéficos do TIBA quando aplicados no sentido de obter maior número de brotações de beterraba.

Ishikawa et al. (1997) trabalhando com *Linum usitatissimum* L. concluíram que as substâncias morfactina e TIBA induziram a formação de brotos adventícios em mudas intactas suprimindo o movimento basípeto da auxina. Resultados semelhantes foram verificados por Singh e Syamal (2000) quando descreveram que o TIBA aumentou a

taxa proliferativa em variedades de rosa em até 100%, promovendo também aumento do comprimento de brotos e números de folhas por explante.

Resultados contrários foram relatados por Zaffari (1998) ao observar que o TIBA (0,019 μM) suplementado isoladamente ao meio de cultura não apresentava efeito na promoção de brotações de gemas laterais na cv. Grand Naine, enquanto que Hutchinson et al. (1996) citaram que a aplicação de TIBA em calos de gerânio também não surtiu efeitos *in vitro*.

Alterações radiculares foram observadas em plântulas de *Arabidopsis thaliana* na presença de TIBA (Pasternak et al., 2005). Karabaghli-Degron et al. (1998) também relatam que a aplicação exógena de TIBA reduziu significativamente a formação de raízes laterais em plântulas de *Picea abies* inoculadas com ectomicorriza, sugerindo que o TIBA inibiu o transporte do IAA do fungo para as raízes.

2.11 Peroxidase

A peroxidase (E.C.1.11.1.7) (POD) é uma enzima conhecida por desempenhar importante função capturando os radicais livres (peróxidos) além de atuar na síntese de etileno, balanço hormonal, biossíntese de lignina, suberina e alguns fenóis, divisão e diferenciação celular, integridade da membrana e controle respiratório (Regalado et al. 2004).

A peroxidase está relacionada à oxidação do hormônio vegetal, IAA, o qual aparece em altas concentrações em tecidos meristemáticos. Uma das funções da peroxidase é catalisar a degradação de peróxidos formados pelo sistema IAA-oxidase (Van Huystee, 1987).

Segundo Barceló e Muñoz (1982), a peroxidase pode ser utilizada como marcador enzimático de estádios de desenvolvimento de plantas, com função fisiológica na diferenciação, com regulação dos níveis endógenos de IAA nos estádios iniciais e finais de desenvolvimento, resultando no processo de expansão celular.

Utilizando a enzima peroxidase como marcador de organogênese em plantas de *Actinidia chinensis*, Hirsch e Fortune (1986) observaram aumento da atividade da enzima aos 10 dias após a inoculação, correspondendo à fase de crescimento dos explantes.

Piza et al. (1996) observaram menor atividade da peroxidase nos explantes de abacaxizeiro 'Smooth Cayenne' em início de desenvolvimento, aumentando a medida que as plantas continuavam seu ciclo normal de crescimento.

Em trabalho com embriogênese somática de *Lycium barbarum*, Kairong et al. (1999) observaram que o desenvolvimento de células embriogênicas e a embriogênese somática eram reguladas por 3 enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, peroxidase e catalase) onde altos níveis de peroxidase promoveram a formação de células embriogênicas.

Tavares (2000) relatou que as plântulas de bromélia, *Aechmea distichantha*, apresentaram aumento na atividade da peroxidase aos 15 dias de cultivo, início da fase de enraizamento e posterior queda aos 30 dias. O aumento na atividade específica da peroxidase antes da iniciação e crescimento dos primórdios radiculares em plantas micropropagadas pode servir como marcador da performance de enraizamento (Mato et al., 1988). Amarante et al. (2001) concluíram que existe relação entre a atividade da peroxidase e a emissão de raízes, sendo um bom marcador do enraizamento *in vitro* de aspargo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Química e Bioquímica e Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências-UNESP/Botucatu.

3.1 BAP e NAA na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de *Ananas comosus* cv. 'IAC Gomo-de-mel'

Foram utilizadas gemas axilares retiradas da coroa de frutos sadios do cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. As folhas das coroas foram cuidadosamente removidas e as gemas extraídas com auxílio de bisturi, em cortes em formato piramidal com 2 mm, aproximadamente.

As gemas foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, por imersão em hipoclorito de sódio comercial (2 a 2,5% de cloro ativo) a 30% por 20 minutos e lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, foram inoculadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura MS solidificado com ágar a 5%, pH ajustado para 5,7 contendo os tratamentos (Tabela 7):

Tabela 7. Combinações de BAP e NAA utilizadas para desenvolvimento e multiplicação das gemas do abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel', no primeiro experimento.

Tratamentos	BAP (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)
T1	0	0
T2	0	0,5
T3	0	1,0
T4	0,5	0
T5	0,5	0,5
T6	0,5	1,0
T7	1,0	0
T8	1,0	0,5
T9	1,0	1,0
T10	1,5	0
T11	1,5	0,5
T12	1,5	1,0

Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 35 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo e 16 horas de luz.

Após 65 dias, avaliou-se o número e comprimento das brotações e porcentagem de hiperhidricidade das plantas. A partir desta avaliação foram selecionados os melhores tratamentos para proliferação das brotações, que foram individualizadas e transferidas para estes meios em frascos com capacidade para 200 ml, por mais trinta dias, porém em meio MS líquido. Ao final de 95 dias de cultivo foram coletadas amostras para análise de peroxidase e proteína (Figura 2).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial, 4x3 com quatro repetições e cinco plântulas por parcela. Para as análises bioquímicas utilizaram-se cinco repetições com uma planta por parcela. Os fatores foram analisados por meio de regressão polinomial ou pelo teste de médias Skott-Knott, com o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

As plantas obtidas no experimento 1 permaneceram em meio MS líquido sem reguladores vegetais e foram trocadas a cada 20 dias por 2 vezes para o mesmo meio, a fim de reduzir ou eliminar o efeito residual do BAP e NAA. Estas plântulas foram utilizadas nos próximos experimentos.

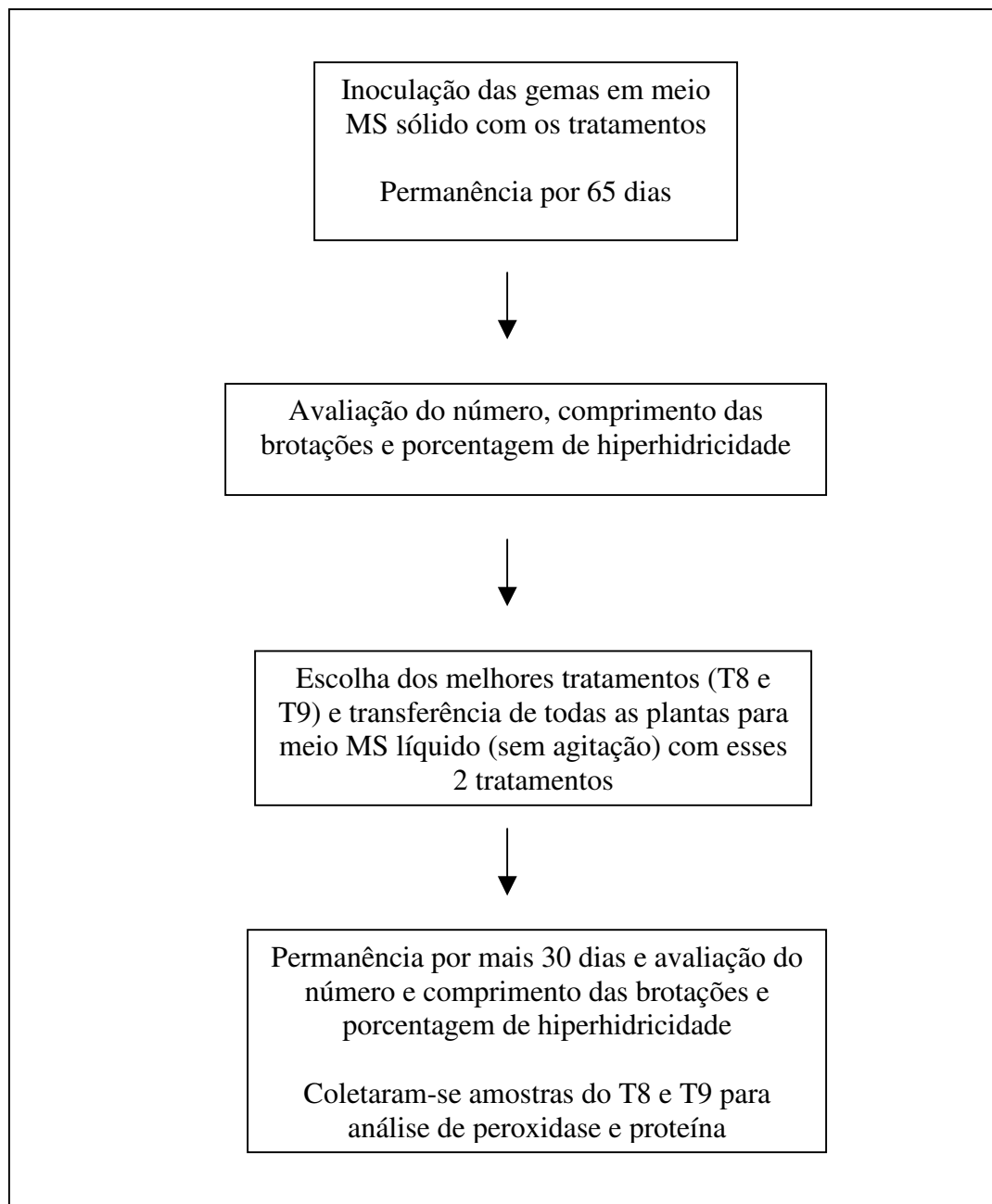


Figura 2. Fluxograma das etapas de cultivo *in vitro* de gemas e plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'.

3.2 Poliaminas na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’

As plantas oriundas de gemas da coroa, do experimento anterior, tiveram as folhas cortadas e apenas os segmentos de, aproximadamente 1 cm, foram inoculados em meio MS líquido contendo os diferentes tratamentos (Tabela 8):

Tabela 8. Diferentes combinações de reguladores vegetais e poliaminas na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’.

Tratamentos	
T1	Meio MS
T2	Meio MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ NAA
T3	Meio MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ NAA + 10 mM SPD
T4	Meio MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ NAA + 10 mM SPM
T5	Meio MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ NAA + 10 mM PUT
T6	Meio MS + 10 mM SPD
T7	Meio MS + 10 mM SPM
T8	Meio MS + 10 mM PUT

SPD = espermidina SPM = espermina PUT = putrescina

As soluções de poliaminas foram adicionadas ao meio MS líquido, previamente autoclavado e resfriado, em câmara de fluxo laminar, com auxílio de seringas descartáveis e filtros acopláveis MILLEX[®] – Millipore, com poros de 0,22 µm.

Após 56 dias, foram avaliados o número e comprimento das brotações, comprimento das plantas-mãe e porcentagem de hiperhidricidade das plantas. Analisaram-se os teores endógenos de poliaminas, proteína e peroxidase nos diferentes tratamentos aos 0 (dia da instalação do experimento), 7, 14, 21, 28, 42 e 56 dias de cultivo. No final do cultivo foram coletadas plantas de cada tratamento para realização de cortes foliares para estudo da influência das poliaminas na anatomia foliar.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições e dez plântulas por parcela. Para as análises bioquímicas utilizaram-se cinco repetições com uma planta por parcela e para o estudo anatômico foram utilizadas cinco repetições com três medições por parcela. A análise estatística foi realizada pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000), por meio do teste de médias Skott-Knott e regressão polinomial.

3.3 TIBA na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’

Segmentos das plantas oriundas das gemas da coroa, com aproximadamente 1 cm, foram inoculados em meio MS líquido contendo os tratamentos a seguir (Tabela 9):

Tabela 9. Diferentes combinações do ácido 2,3,5-triidobenzóico na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’.

Tratamentos	
T1	Meio MS
T2	Meio MS + 1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,5 mg L ⁻¹ NAA
T3	Meio MS + 0,5 µM TIBA
T4	Meio MS + 1,0 µM TIBA
T5	Meio MS + 2,0 µM TIBA
T6	Meio MS + 4,0 µM TIBA
T7	Meio MS + 8,0 µM TIBA
T8	Meio MS + 16,0 µM TIBA

T2: tratamento que proporcionou melhores resultados no experimento 1

Após 60 dias, avaliou-se o número e comprimento das brotações, comprimento da planta-mãe e número de raízes. A atividade da IAA-oxidase foi realizada aos 0 (dia da instalação do experimento), 15, 30, 45 e 60 dias de cultivo. Ao final do cultivo foram coletadas plantas de cada tratamento para realização de cortes foliares para estudo da influência das poliaminas na anatomia foliar.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições e dez plântulas por parcela. Para as análises bioquímicas utilizaram-se cinco repetições com uma planta por parcela e para o estudo anatômico foram utilizadas cinco repetições com três medições por parcela. A análise estatística foi realizada pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000), por meio do teste de médias Skott-Knott e regressão polinomial.

3.4 Análises Bioquímicas e Anatomia Foliar

3.4.1 Teor de Proteína Total Solúvel

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em 5 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,7 e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C para obtenção do extrato bruto. O sobrenadante foi utilizado para a análise do teor de proteína.

Utilizou-se o método proposto por Bradford (1976). A reação induz a formação de um complexo colorido, devido à associação entre o reativo e as ligações peptídicas das proteínas solúveis. Como padrão, utilizou-se a caseína a 1%. Foi utilizado 0,3 ml de extrato bruto e 5 ml do reativo de Bradford seguido de repouso por 5 minutos. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm e comparadas com a curva padrão de caseína, sendo o teor protéico expresso em μg de proteína mg^{-1} matéria fresca.

3.4.2 Atividade da peroxidase (EC. 1.11.1.7)

Tecidos vegetais foram pesados e homogeneizados (homogeneizador Potter Elvehjem) em 5 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 6,7 e centrifugados a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4° C, obtendo-se dessa maneira o extrato bruto. O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima peroxidase pelo método proposto por Allain et al. (1974), com algumas modificações (Lima et al., 1999).

O sistema de reação foi constituído de 1,0 ml do extrato enzimático (extrato bruto), 0,5 ml de solução de H_2O_2 30 %, 0,5 ml de solução de diclorofenol e aminoantipirina (163 mg de diclorofenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 ml de H_2O).

Os tubos foram mantidos em banho-maria a 30 °C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 ml de etanol absoluto. Precedeu-se a leitura imediatamente, em espectrofotômetro a 505 nm.

A atividade específica da peroxidase foi expressa em μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas solúveis.

3.4.3 Teor de poliaminas livres

O teor de poliaminas livres foi determinado de acordo com o método proposto por Flores e Galston (1982), modificado por Lima et al. (1999).

Tecidos vegetais foram pesados e homogeneizados em HClO_4 5% gelado (100 mg mL^{-1}) e em PVP (polivinilpirrolidona) ($1 \text{ g PVP}/2 \text{ g tecido vegetal}$), deixados em banho de gelo por uma hora e centrifugadas a 10.000 rpm durante 20 minutos. Alíquotas de $200 \text{ }\mu\text{l}$ do sobrenadante foram adicionadas a $200 \text{ }\mu\text{l}$ de carbonato de cálcio saturado e a $400 \text{ }\mu\text{l}$ de cloreto de dansil (5 mg mL^{-1} acetona) e deixadas por 16 horas no escuro a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados à mistura $100 \text{ }\mu\text{l}$ de prolina (100 mg mL^{-1}), as quais ficaram em repouso por 30 minutos no escuro. Foram utilizados $500 \text{ }\mu\text{l}$ de tolueno para retirar as poliaminas livres, obtendo-se então, o extrato dansilado, o qual foi aplicado em placas de vidro recobertas por sílica gel 60-G e cromatografadas. O solvente utilizado foi o clorofórmio-trietilamina (25:2 v/v). Toda separação foi acompanhada mediante luz UV. Após aproximadamente uma hora, as placas foram secas e levadas para quantificação das poliaminas em densitômetro. Os padrões foram dansilados e cromatografados da mesma maneira descrita. Os resultados foram expressos em μmol de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) g^{-1} matéria fresca.

3.4.4 Atividade da IAA-oxidase

A atividade da IAA-oxidase foi determinada de acordo com o método de Huang et al. (1997).

Pesou-se $0,5 \text{ g}$ de material fresco e em seguida macerou-se o material em 8 ml da solução de fosfato de sódio (50 mM pH 7) e polivinilpirrolidona (PVP) (1%) (v/v). Centrifugou-se o homogeneizado macerado a 10.000 rpm , a 4° C , por 25 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato para o ensaio enzimático.

Para o ensaio enzimático reduziu-se a iluminação do ambiente do laboratório durante esta etapa. Foram pipetados $50 \text{ }\mu\text{l}$ do extrato e 1 ml da solução de IAA ($0,15 \text{ mM}$), 2,4-diclorofenol (DCP) ($0,1 \text{ mM}$) e MnCl_2 ($0,1 \text{ mM}$). Após 20 minutos em

temperatura ambiente e no escuro acrescentou-se 6ml do reagente de Salkousk. Imediatamente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 530 nm.

3.4.5 Anatomia Foliar

Para o estudo anatômico das folhas foram utilizadas plântulas cultivadas *in vitro* nos diferentes tratamentos.

Folhas completamente expandidas foram coletadas das mudas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel', em todos os tratamentos. As folhas foram fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940), conservadas em etanol 70% (Jensen, 1962).

Para confecção do laminário permanente, as amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em hidroxil-etil-metacrilato Leica (Gerlach, 1969), seccionadas em micrótomo rotativo, coradas com azul de toluidina (O'Brien et al. 1964) e montadas em resina sintética. Os resultados foram ilustrados por meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio.

A análise dos tecidos foliares da região mediana (medições de espessura das faces adaxial e abaxial da epiderme e dos parênquimas aquífero e clorofiliano) foi efetuada com auxílio de ocular micrométrica. Para as avaliações relativas à caracterização dos estômatos (número médio por mm^2) foram realizados cortes paradérmicos, na região mediana das folhas os quais foram colocados sobre uma lâmina contendo safranina a 1%, e montados em gelatina glicerinada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BAP e NAA na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de *Ananas comosus* cv. 'IAC Gomo-de-mel'

4.1.1 Brotações

Após 12 dias da inoculação das gemas observou-se o início do desenvolvimento da parte aérea. Após 65 dias de cultivo *in vitro* de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel', a partir de gemas, avaliou-se o número e o comprimento das brotações e a porcentagem de brotações hiperhídricas (vitrificadas). Essas brotações foram individualizadas e inoculadas em meio MS líquido, contendo os dois meios selecionados como mais eficientes para número de brotos (T8: 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA e T9: 1,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ NAA), permanecendo por mais 30 dias, totalizando 95 dias de cultivo. Após esse período, avaliou-se novamente o número e comprimento das brotações, além da porcentagem de hiperhidricidade. As análises bioquímicas de teor de proteína total solúvel e atividade de peroxidase foram realizadas aos 95 dias apenas para o T8 e T9.

Não houve efeito significativo, aos 65 dias, para as concentrações de NAA e para a interação entre os reguladores, pelo teste F, assim, avaliou-se o efeito isolado de BAP para número de brotos. Para comprimento das brotações houve interação significativa entre os reguladores vegetais, indicando o efeito correlacionado dos fatores (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de variância para as características número de brotações (NB) e comprimento das brotações (CB) aos 65 dias de cultivo *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-Mel’.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		NB	CB
BAP	3	5,7479**	0,6918**
NAA	2	1,6206 ^{ns}	0,1723**
BAP*NAA	6	0,3551 ^{ns}	0,1469**
Erro	36	0,5186	0,0223
CV (%)		21,03	23,44

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

ns – não significativo

Pela análise de variância, verifica-se que não houve diferença estatística para número de brotações aos 95 dias, porém, pelo teste de Skott-Knott observou-se diferença para comprimento das brotações (Tabela 11).

Tabela 11. Análise de variância para as características número de brotações (NB), comprimento das brotações (CB) aos 95 dias de cultivo *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-Mel’.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		NB	CB
Tratamentos	1	5,2003 ^{ns}	0,0392**
Erro	6	4,1491	0,00111
CV (%)		24,75	4,32

** significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

ns – não significativo

Verifica-se pelo teste F que houve diferença significativa para porcentagem de brotações hiperhídricas, aos 65 e 95 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 12 e 13).

Tabela 12. Análise de variância para porcentagem de hiperhidricidade aos 65 dias de cultivo *in vitro* do abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel'.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios
BAP	3	16361,80**
NAA	2	5589,58**
BAP*NAA	6	1424,30**
Erro	36	7,9861
CV (%)		8,43

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Tabela 13. Análise de variância para porcentagem de hiperhidricidade aos 95 dias de cultivo *in vitro* do abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel'.

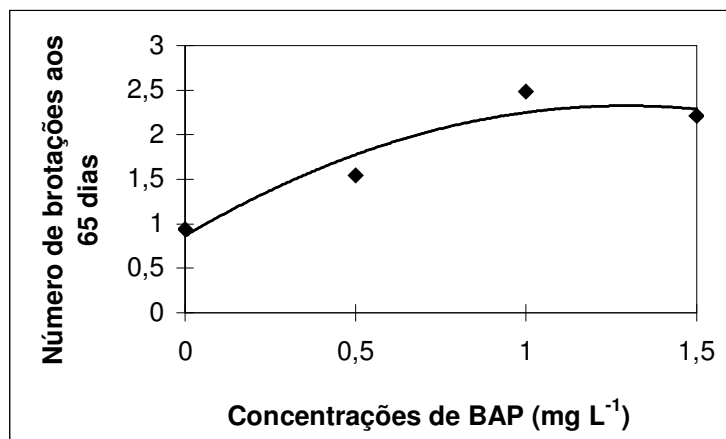
Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios
Tratamentos	1	1800,00**
Erro	6	16,6666
CV (%)		7,42

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Com relação às brotações aos 65 dias, a partir da análise de regressão, maior número (2,32) foi observado na concentração de 1,29 mg L⁻¹ de BAP (Figura 3). Porém, pouca diferença foi verificada quando se utilizou 1 mg L⁻¹ desta citocinina (2,24 brotações). O BAP é uma das citocininas mais utilizadas na indução de brotos (Costa et al., 2000; Malik et al., 2005) e essencial para o estímulo inicial do desenvolvimento dos ápices caulinares (Grattapaglia e Machado, 1998). Geralmente, o nível de citocininas é alto em tecidos com capacidade mitótica, sendo requerida para manter o ciclo de divisão celular, mas também pode estar envolvida em promover a diferenciação celular (Werner et al., 2001). Entretanto, a concentração utilizada varia com o protocolo utilizado, o que pode ser notado nos diversos resultados para cultivares de abacaxizeiros apresentados a seguir.

Liu et al. (1988), trabalhando com o cultivar Red Spanish, revelaram que a maior proliferação de brotos ocorreu em meio MS líquido suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de BAP, enquanto Marciani-Bendezú et al. (1990) e Kiss et al. (1995) obtiveram as maiores taxas de multiplicação quando utilizaram respectivamente 4,5 e 5 mg L⁻¹ do referido regulador

vegetal. Albuquerque et al. (2000) observaram baixo percentual de necrose e aumento no número de brotos ao utilizar 2 mg L⁻¹ de BAP, bem como Barboza e Caldas (2001), porém a partir de brotos estiolados. Omokolo et al. (2001) citou as concentrações de 4 mg L⁻¹ de BAP e 6 mg L⁻¹ de cinetina como sendo as melhores para indução de brotações para a cultivar Cayenne. Almeida et al. (2002) concluíram que 1,5 mg L⁻¹ de BAP foi a melhor concentração para o estágio de multiplicação. As diferenças relatadas pelos autores estão relacionadas com os diversos protocolos utilizados na micropropagação de abacaxizeiro e com a variabilidade genética de cada cultivar.



$$y = 0,8637 + 2,2608x - 0,8750x^2 \quad R^2=0,92$$

Figura 3. Número de brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ cultivadas *in vitro* por 65 dias sob diferentes concentrações de BAP.

Na Figura 4 observa-se que as brotações cultivadas no meio MS na ausência de reguladores apresentaram maior comprimento, porém não houve proliferação de brotos. Com o aumento das concentrações de BAP houve diminuição no comprimento das brotações, para todas as concentrações de NAA utilizadas. Resultado este, normalmente, observado por diversos autores (Araújo et al., 1996; Macêdo et al., 2003; Fráguas et al., 2004; Koubouris e Vasilakakis, 2006).

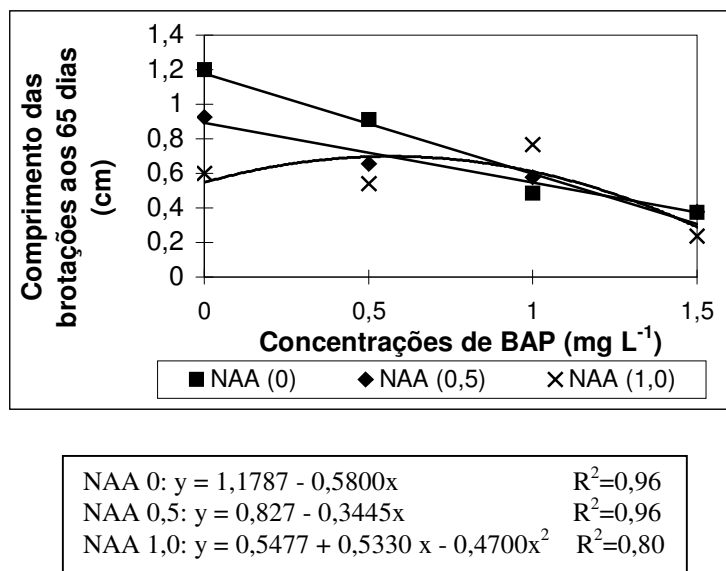


Figura 4. Comprimento das brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ cultivadas *in vitro* por 65 dias sob diferentes concentrações de BAP.

Utilizando-se o meio MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, ou seja, o tratamento 8, verificou-se uma média de 0,53 cm de comprimento das brotações, enquanto que a combinação de MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ NAA (T9) proporcionou uma média de 0,61 cm. As menores brotações foram observadas nos tratamentos que continham 1,5 mg L⁻¹ de BAP, independentemente da concentração de NAA utilizada, ou seja, T10 (0,31 cm), T11 (0,31 cm) e T12 (0,29 cm). Os resultados revelaram uma relação inversa entre altura e número de brotações, corroborando os resultados observados por Debiasi (2000).

Medeiros et al. (2001) mostraram que a utilização da associação de 4 e 2 mg L⁻¹ e 2 e 1 mg L⁻¹ de BAP e NAA, respectivamente, no meio de cultura favoreceram a multiplicação de abacaxizeiro, entretanto, os brotos apresentavam alongamento da parte aérea muito pequeno, dificultando a individualização. Apesar do tratamento de maior concentração de BAP e NAA (1,0 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente) apresentar vantagens como maior número de brotos e massa fresca, os tratamentos de concentrações intermediárias (BAP 0,5 mg L⁻¹ + 0,25 mg L⁻¹ de NAA) e menores (0,25 mg L⁻¹ BAP + 0,12 mg L⁻¹ de NAA) são os mais indicados para serem adicionados ao meio de cultura devido a maior facilidade de individualização dos brotos (Macêdo et al., 2003).

Após as brotações serem subcultivadas por mais 30 dias, observou-se aumento na taxa proliferativa, devido, provavelmente, ao acúmulo de citocinina do cultivo anterior, comumente denominado de efeito residual (Dal Vesco et al., 2001; Fráguas, 2003), porém não houve diferença estatística para número de brotos (Figura 5).

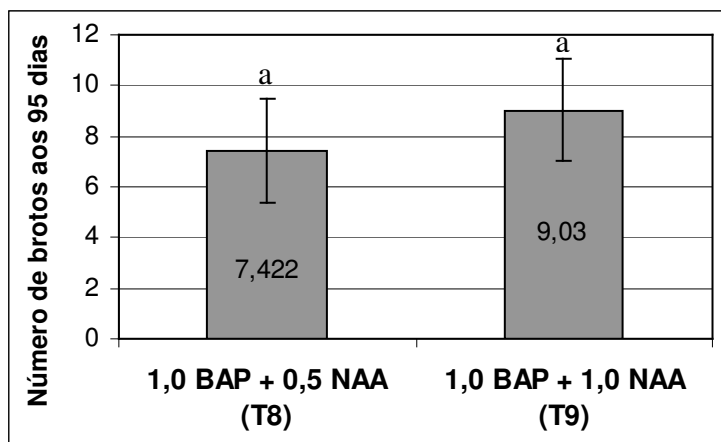


Figura 5. Número de brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ cultivadas *in vitro* por 95 dias nos diferentes tratamentos.

Outra hipótese para esse aumento de brotos seria devido ao cultivo em meio líquido nesta fase. De acordo com Grupta et al. (1981), a utilização de meio líquido facilita a absorção de nutrientes pela planta devido a sua distribuição no meio de cultura. Assim, maiores taxas de proliferação de brotos no presente trabalho estariam relacionadas com a melhor absorção de nutrientes. Resultados similares foram observados por Guerra et al. (1999) que relataram aumento na multiplicação de brotos de abacaxizeiro ‘Perolera’ ao utilizar meio MS líquido e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NAA + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e por Almeida et al. (2002) com a cultivar Pérola.

A alta taxa proliferativa observada poderia também ser devido ao estímulo à divisão celular causado pelo seccionamento das brotações, possivelmente, contribuiu para o desenvolvimento de grande número de gemas adventícias e conseqüentemente aumento no número de brotações produzidas por explante. O

seccionamento das brotações nas regiões meristemáticas pode induzir a divisão celular, devido à alta capacidade mitótica destas células (George, 1993).

Embora o T9 tenha proporcionado maior número de brotações, observou-se aspecto hiperhídrico mais acentuado se comparado ao T8, caracterizando este último como melhor tratamento para a fase de multiplicação do cultivar ‘IAC Gomo-de-mel’ (Figura 6). As plantas hiperhídricas apresentam alterações anatômicas e morfológicas tais como deficiência de cloroplastos, ausência de parênquima paliçádico, parênquima esponjoso preenchendo todo mesofilo, pouca cera epicuticular, baixo nível de lignina e celulose, baixa resistência da parede celular (Kevers e Gaspar, 1986), aspecto vítreo, tamanho reduzido e folhas intumescidas e quebradiças (Debergh e Maene, 1984; Majada et al., 2001).



Figura 6. Aspecto das brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ aos 95 dias de cultivo em meio contendo citocinina e auxina.

Observou-se que aos 95 dias de cultivo o comprimento das brotações teve maior média quando comparadas com o comprimento aos 65 dias (Figura 7). Possivelmente, o menor tamanho (T9) esteja relacionado à maior porcentagem de hiperhidricidade (Figura 8 e 9), embora não tenha aumentado a porcentagem de vitrificação do T8 e T9, aos 95 dias, quando comparada com a avaliação anterior.

Alguns trabalhos relacionam a presença de altas concentrações de citocinina e/ou auxina à hiperhidricidade (Beauchesne, 1981), sendo que, geralmente, existe uma relação negativa entre altura das brotações, proliferação e hiperhidricidade (Yadav et al.,

2003). O mecanismo de ação da citocinina no processo da vitrificação é pouco compreendido. Talvez ela induza uma súbita atividade celular (Bornman e Vogelmann, 1984; Kataeva et al., 1991; Williams e Taji, 1991) e em um meio com alto potencial hídrico e/ou uma atmosfera de elevada umidade relativa no interior dos frascos, resultando em novas células que logo se tornariam túrgidas. Certos autores como Gaspar et al. (1984) citam ainda a possibilidade dos reguladores provocarem um estresse com o posterior desencadeamento da síntese de etileno. Este último seria o responsável pelas alterações observadas na morfogênese anormal ao nível de parede celular.

Alterações na composição do meio de cultura, selamento dos frascos, diminuição ou ausência de reguladores vegetais estão entre as técnicas utilizadas para reverter a hiperhidricidade (Dal Vesco et al., 2001; Tóth et al., 2004; Lai et al., 2005). Park et al. (2004) observaram que plantas de batata cultivadas em frascos completamente selados apresentaram sintomas severos de hiperhidricidade sendo os níveis de etileno internos (frasco) significativamente maior.

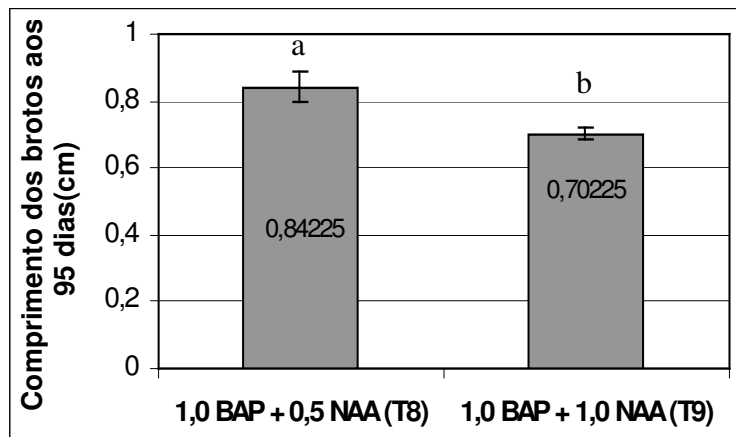


Figura 7. Comprimento das brotações de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' cultivadas *in vitro* por 95 dias nos diferentes tratamentos.

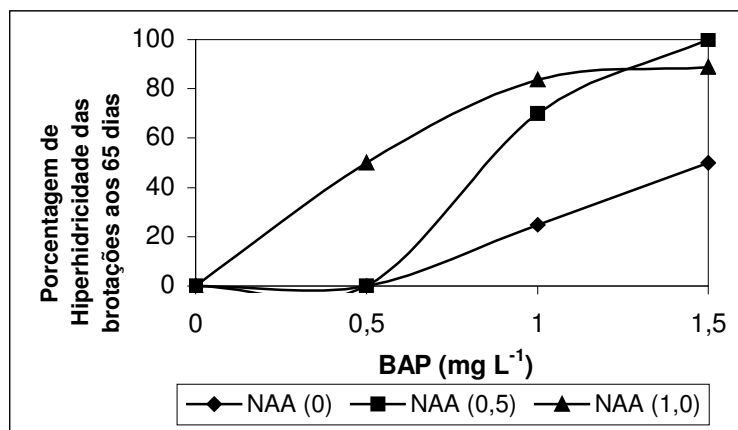


Figura 8. Porcentagem de hiperhidricidade das brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ aos 65 dias de cultivo *in vitro*.

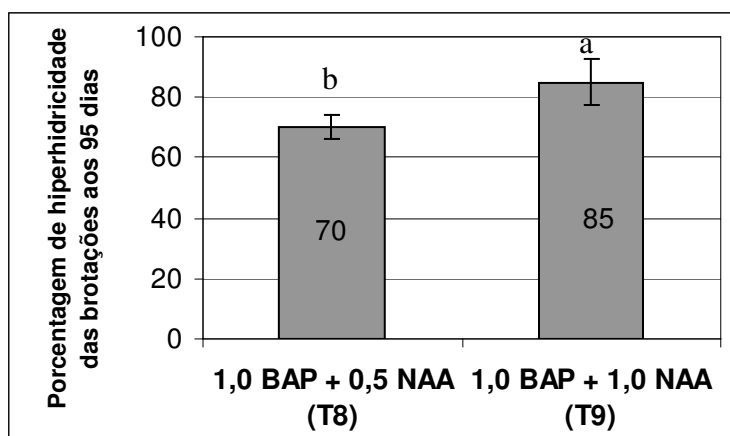


Figura 9. Porcentagem de hiperhidricidade das brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ aos 95 dias de cultivo *in vitro*.

4.1.2 Proteína Total Solúvel e Peroxidase

Analisando a Figura 10, constata-se maior teor de proteína total solúvel, aos 95 dias, no tratamento 8. Possivelmente, a redução no teor de proteína no tratamento 9 esteja relacionado a maior porcentagem de hiperhidricidade. Cuzzuol et al. (1995) também verificaram respostas semelhantes em brotações de cravo mesmo com baixa porcentagem de vitrificação. Análises bioquímicas revelaram que o conteúdo de proteínas em

plantas vitrificadas é superior ao das plantas normais (Phan e Letouzé, 1983; Ziv et al., 1983). Resultados semelhantes foram observados por Paek e Han (1989) e Picoli et al. (2001) em folhas hiperhídricas de *Gypsophila paniculata* e *Solanum melongena*, respectivamente.

Premkumar et al. (2001) relataram diminuição nos teores de proteína em folhas de plantas de abacate cultivadas *in vitro* quando comparadas às plantas cultivadas *ex vitro*.

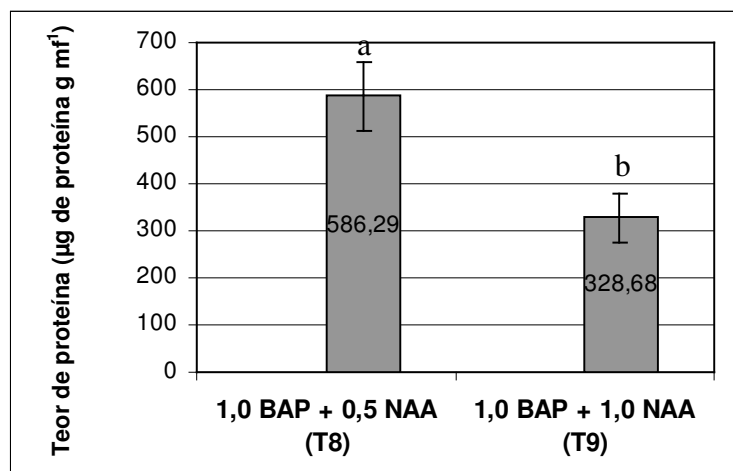


Figura 10. Teor de proteína total solúvel (μg de proteína g^{-1} de massa fresca) em brotações de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' aos 95 dias de cultivo nos diferentes tratamentos.

Com relação à peroxidase, verificou-se maior atividade no tratamento 9 (Figura 11), possivelmente, devido a maior taxa de multiplicação e maior porcentagem de hiperhidricidade das brotações, provocando um acúmulo de H_2O_2 dentro das células, resultando em condição de estresse. Esses resultados estão de acordo com os observados por Piqueras et al. (2002) em brotações hiperhídricas de *Dianthus caryophyllus*. De acordo com Lima et al. (1999) a formação de peróxidos ocorre quando as plantas estão sob condição de estresse.

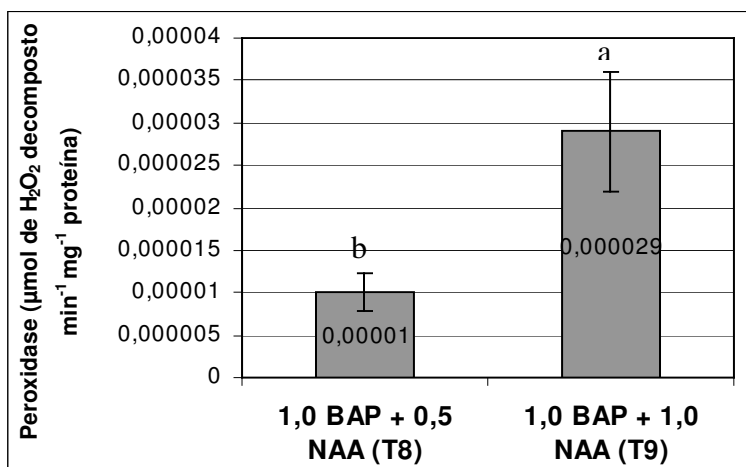


Figura 11. Atividade de peroxidase em brotações de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ aos 95 dias de cultivo nos diferentes tratamentos.

Piza et al. (1996) analisaram a atividade da peroxidase em plântulas de abacaxi ‘Smooth cayenne’ cultivadas *in vitro* e observaram que a atividade foi menor nos explantes em início de desenvolvimento, aumentando a medida que as plantas continuavam seu ciclo normal de crescimento. Estes resultados foram associados à especialização celular, a processos que incluem divisão e diferenciação celular e, ainda, a interações entre os reguladores vegetais utilizados.

Kevers et al. (1984) citam que a maior atividade de peroxidase observada em brotações hiperhídricas de diversas espécies poderia estar relacionada ao etileno. Os autores atribuem que a presença de etileno resultaria em aumento da atividade das peroxidases básicas, as quais são conhecidas por se ligarem às membranas (Penel et al., 1979). Essas peroxidases parecem estar envolvidas, direta ou indiretamente, na conversão de ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) para etileno (Rohwer e Mader, 1981). As peroxidase básicas ligadas às membranas, ou mesmo solubilizadas, teriam papel de IAA-oxidase (Gaspar et al., 1982), o qual ativaria o último passo na biosíntese do etileno (Vioque et al., 1981).

Outros autores também descrevem aumento de etileno em tecidos hiperhídricos. Saher et al (2004) observaram que o conteúdo de etileno foi maior e a produção de H₂O₂ aumentava, assim como a atividade da peroxidase, em tecidos hiperhídricos. Os autores evidenciaram o efeito do peróxido de hidrogênio nestes tecidos, caracterizando

resposta de um sistema antioxidante para estresse oxidativo e apontam o acúmulo de formas tóxicas de oxigênio como um indutor das anomalias observadas.

No presente trabalho, a maior atividade de peroxidase pode estar relacionada ao menor comprimento das brotações (T9), devido, provavelmente, a redução na plasticidade das membranas. De acordo com Davies (1990), a peroxidase age realizando ligações do tipo isoditrosil entre proteínas de parede, e do tipo difurilato entre polissacarídeos de parede, restringindo a plasticidade da parede celular.

4.2 Poliaminas na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’

4.2.1 Brotações

Durante o período de cultivo *in vitro* de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ observou-se a partir do sétimo dia o desenvolvimento de novas folhas nos explantes em todos os tratamentos. Aos 28 dias novas brotações já estavam formadas em alguns tratamentos (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA, MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD e MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT). Notou-se que a presença de BAP e NAA, independentemente das combinações utilizadas, antecipou a formação de novas folhas e conseqüentemente, novas brotações. A utilização de BAP e NAA tem se mostrado essencial na micropropagação de abacaxizeiro, como relatam diversos autores (Souza et al., 2003; Macêdo et al., 2003; Almeida et al., 2002; Barboza e Caldas, 2001; Moreira et al., 2000; Albuquerque et al., 2000; Guerra et al., 1999).

Os explantes cultivados em meio de cultura na presença de espermina, combinados ou não com reguladores vegetais (T4 e T7), apresentaram efeito fitotóxico caracterizado por amarelecimento, culminando com a morte. Desta forma, foram coletadas amostras destes tratamentos apenas até o 14º dia, quando foram descartados.

Os explantes inicialmente adicionados aos diferentes tratamentos primeiramente cresceram, para após 28 dias, emitirem brotações, dependendo do tratamento. Ao final de 56 dias de cultivo separaram-se as brotações adventícias das plantas (explante inicialmente inoculado no meio de cultura) denominadas plantas-mãe e avaliou-se o número e comprimento das novas brotações e o comprimento das plantas-mãe. A formação de raízes foi observada apenas nos tratamentos 1 e 8 (dados não apresentados). Os tratamentos 4 e 7, contendo espermina, não foram avaliados quanto ao número e comprimento das brotações devido os explantes apresentarem amarelecimento seguido de morte.

Houve formação de brotações nos tratamentos 1 (MS), 2 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA), 3 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD) e 5 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT). Nos tratamentos 6 e 8 apenas crescimento das plântulas foi observado, demonstrando que poliaminas isoladas não induzem

brotação em abacaxi 'IAC Gomo-de-mel'. As poliaminas são substâncias de baixo peso molecular e requeridas para o crescimento normal de bactérias, animais e vegetais e podem estimular a divisão celular. Segundo Galston (1983) e Sergiev et al. (1995), a atividade fisiológica das poliaminas e citocininas é muito semelhante, porém pouco se conhece sobre a interação entre estas substâncias.

Pelo teste F verifica-se que os diferentes meios de cultura apresentaram diferença significativa para as variáveis analisadas (Tabela 14 e 15).

Tabela 14. Análise de variância para as características número (NB) e comprimento das brotações (CB) de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel' aos 56 dias de cultivo.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		NB	CB
Meios de Cultura	3	17,68249**	3,63470**
Erro	16	0,08790	0,03626
CV (%)		17,09	20,69

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Tabela 15. Análise de variância para comprimento da planta-mãe (CPM) de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-Mel' aos 56 dias de cultivo.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		NB	CB	CPM
Meios de Cultura	7	17,68249**	3,63470**	18,066488**
Erro	20	0,08790	0,03626	0,084178
CV (%)		17,09	20,69	6,14

Maior número de brotações (3,97) foi observado em meio MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA (T2) (Figura 11A), porém, as brotações apresentavam aspecto hiperhídrico (vitrificado) e oxidação, características, normalmente, observadas com a utilização do BAP, em diversas espécies (Nobre, 1996; Paek e Hahn, 2000; Toma et al., 2004).

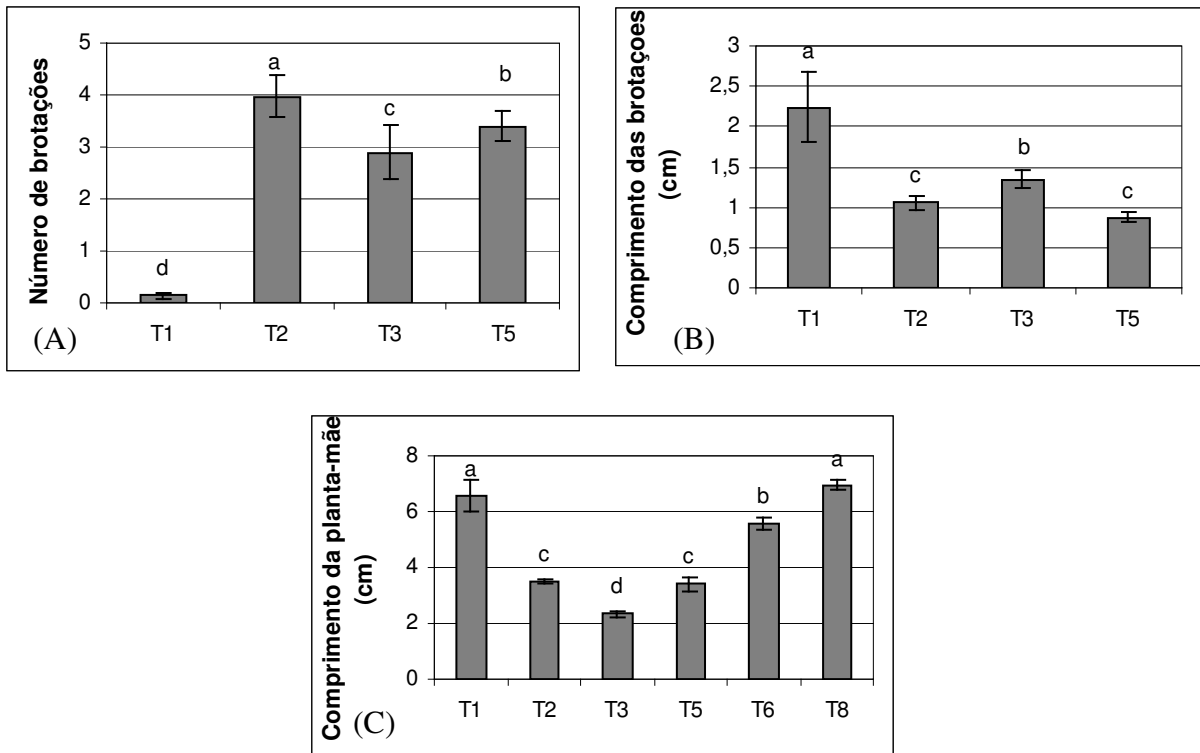


Figura 11. Número (A), comprimento das brotações (B) e comprimento das plantas-mãe (C) de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel', aos 56 dias, cultivadas em diferentes meios de cultura com poliaminas. T1: MS; T2: MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA; T3: MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD; T5: MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT; T6: MS + 10 mM SPD; T8: MS + 10 mM PUT.

As citocininas estão relacionadas a importantes funções nas plantas, tais como estímulo da divisão celular, desenvolvimento de cloroplastos, biosíntese de pigmentos, regulação do crescimento, ramificação de caules e raízes e retardamento da senescência (Rakova e Romanov, 2005).

A hiperhidricidade, geralmente, é mais intensa em cultivos em meio de cultura líquido (Ziv, 1991) ou sob baixas concentrações de ágar (Marga et al., 1997). Quando causada por auxinas, este evento pode ser atribuído ao acúmulo de etileno na cultura (Ziv, 1991). Entretanto, essas alterações parecem ser epigenéticas (Larkin e Scowcroft, 1981; Peschke e Phillips, 1992). Dal Vesco et al. (2001), em estudos com abacaxi 'Pérola', verificaram que a vitrificação foi reduzida em meio isento de reguladores vegetais.

Bons resultados também foram verificados com o meio MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT (T5) com média de 3,39 brotações (Figura 11A). O T5 não diferiu estatisticamente do T2 quanto ao comprimento das brotações (Figura 11B), porém estas apresentaram melhor qualidade, ou seja, sem hiperhidricidade e oxidação, além de melhor coloração das folhas (Figura 12). A aplicação exógena de putrescina pode ter revertido a hiperhidricidade e oxidação, observadas no T2, indicando uma possível ação benéfica desta poliamina na micropropagação de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’.

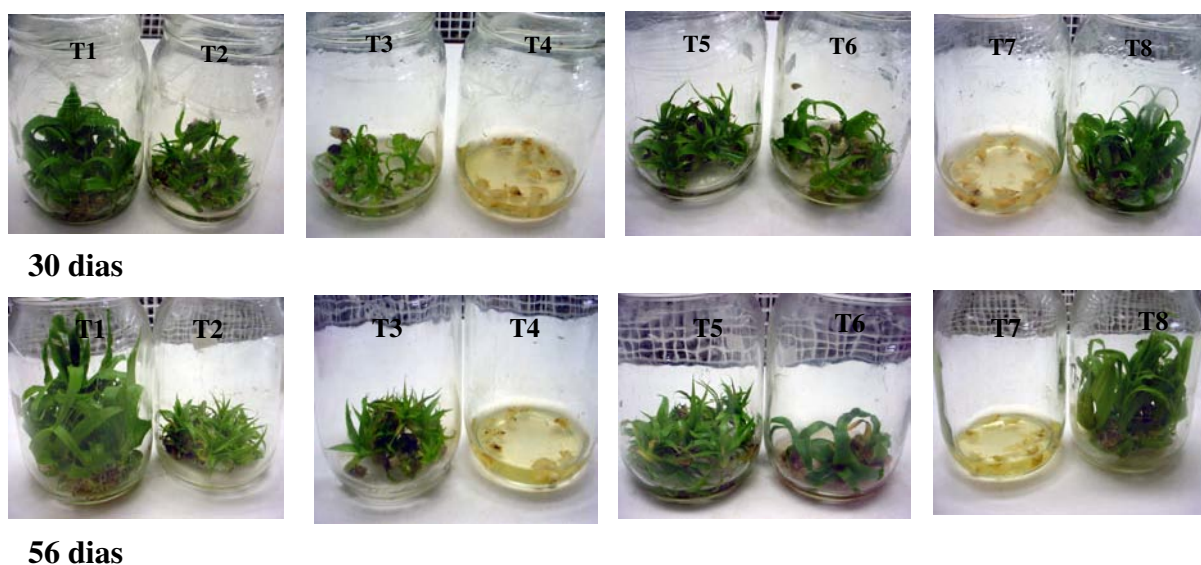


Figura 12. Explantes de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ cultivados em diferentes meios de cultura, aos 30 e 56 dias.

De acordo com Piqueras et al. (2002), o maior teor de PUT observado em folhas hiperhídricas de plântulas de cravo pode estar relacionado com a inibição da atividade da PAO (poliamina oxidase), como consequência da hiperhidricidade e a reversão da vitrificação poderia ser atribuída à alterações nos padrões de poliaminas, isto é, redução no teor de poliaminas livre e aumento do teor de poliaminas conjugadas.

A hiperhidricidade pode estar relacionada com diversos fatores como estresse oxidativo, anoxia, deficiência mineral, alterações da peroxidase e deficiência na biosíntese de lignina, entre outros (Kevers et al., 1984; Frank et al., 1995; Olmos et al., 1997;

Olmos e Hellín, 1998). Ainda há pouca informação sobre a relação das poliaminas com a hiperhidricidade (Gaspar et al., 1997), apesar das semelhanças entre os sintomas da hiperhidricidade nos tecidos vegetais e outras situações fisiológicas que aumentam a síntese de poliaminas (Piqueras et al., 2002). No presente trabalho observou-se que as plantas cultivadas em meio contendo espermidina ou putrescina não apresentaram aspecto hiperhídrico. Apesar de Kevers et al. (2002) terem observado que a aplicação exógena de poliaminas em *Panax ginseng* aumentou a tendência à formação de células hiperhídricas e diminuiu o número de raízes, enquanto que espermina reduziu o efeito vítreo.

Além dos eventos organogênicos conferidos às poliaminas, são atribuídos à estas substâncias efeitos antioxidantes, exercendo proteção às células, incluindo membranas, ácidos nucleicos e ácidos graxos polinsaturados de danos oxidativos (Tang et al., 2004). Segundo Lovaas (1997), as poliaminas atuam como quelantes de metais, diminuindo sua ação oxidativa nas células. Ye et al. (1997) observaram que a aplicação de putrescina dobrou a resistência ao estresse oxidativo em *Coniza bonariensis*, enquanto que Papadaskis e Roubelakis-Angelakis (2005) atribuíram à putrescina efeito protetor contra células programadas para morte (CPM), o qual seria consistente com o efeito estimulante no crescimento, e os aumentos dos níveis de PUT seriam devido ao direcionamento para uma via proliferativa.

As plantas dos tratamentos 6 e 8, que foram mantidos apenas na presença de meio MS + SPD e MS + PUT, respectivamente, não desenvolveram brotações adventícias como na maioria dos tratamentos. Possivelmente, a concentração de 10 mM da poliamina SPD utilizada foi fitotóxica para o T6, em que as plantas apresentaram folhas murchas e oxidação na base do explante. Embora, as poliaminas, principalmente PUT e SPD, têm sido relacionadas com a recuperação da oxidação bem como o aumento do crescimento, formação de brotos e enraizamento em *Pinus* (Tang et al., 2004).

No presente trabalho, a aplicação exógena de poliaminas isoladamente (T6, T7 e T8) não induziu a formação de brotações e não aumentou o comprimento das plantas-mãe (Figura 11 C). Poliaminas têm sido descritas por estimular o desenvolvimento de brotos adventícios em diversas plantas (Tanimoto et al., 1994; Shoeb et al., 2001), porém, Vyas et al. (2005) não observaram este efeito em *Feronia limonia*.

As plantas oriundas do T8 poderiam ser diretamente aclimatizadas ao final de 56 dias, pois, embora com reduzido tamanho, já apresentavam raízes (dados não apresentados). Arena et. al. (2003) afirmaram que maiores teores de putrescina podem estar relacionados com o enraizamento, quando estudaram *Berberis Buxifolia*. Aos 56 dias, verificou-se média de 5,6 cm (T6) e 6,93 cm de comprimento (T8) para a planta-mãe (Figura 11C).

Os explantes cultivados apenas no meio MS (T1) apresentaram média de 0,14 brotações, embora na ausência de reguladores vegetais e/ou poliaminas, efeito, possivelmente, relacionado à concentração endógena de reguladores. Houve também a formação de raízes neste tratamento (dados não apresentados). Devido ao reduzido número de brotações, o comprimento foi maior (2,24 cm) quando comparado aos tratamentos que resultaram em múltiplos brotos. Segundo Debiasi (2000), em geral, o comportamento em relação à média proliferativa e o tamanho dos brotos *in vitro* é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o número de brotos formados em um explante, menor será o seu tamanho. Essas plântulas poderiam ser transferidas diretamente para casa-de-vegetação, pois apresentavam parte aérea e sistema radicular desenvolvidos adequadamente para a etapa de aclimatização.

4.2.2 Atividade de Peroxidase (EC 1.11.1.7) e Teor de Proteína Total Solúvel

Em relação à atividade de peroxidase e teor de proteína total solúvel, observa-se, segundo análise de variância, que existe interação entre os fatores estudados (Tabela 16).

Tabela 16. Análise de variância para atividade de peroxidase (POD) e proteína.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		POD	Proteína
Meios de Cultura	7	1,09895**	11,07788**
Dias	6	0,17149**	4,64791**
Meios de Cultura * Dias	42	0,10881**	0,91909**
Erro	112	0,00111	0,04707
CV (%)		8,93	19,55

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

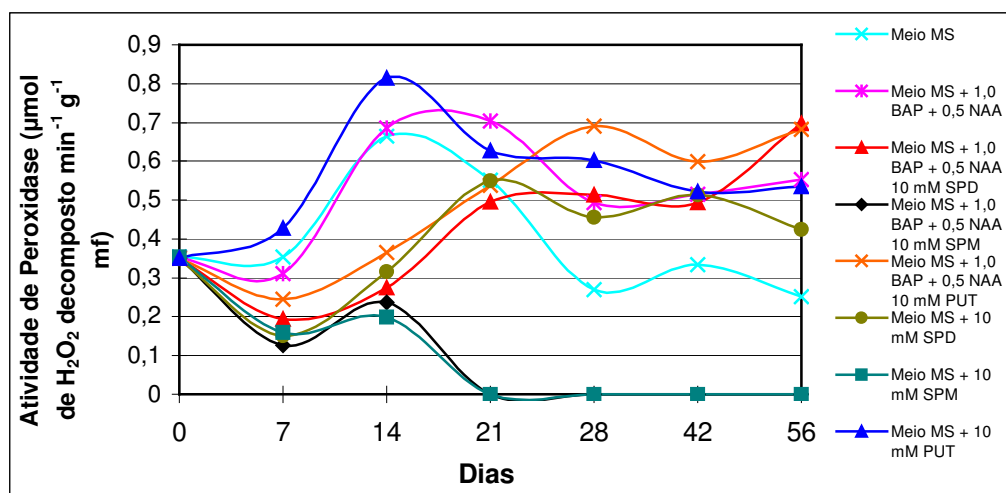
A atividade média inicial de peroxidase dos explantes era de 0,35 μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca (Tabela 17), ocorrendo variações nos diferentes tratamentos durante o ciclo de cultivo.

Tabela 17. Atividade de peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca) em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Tratamentos	Dias						
	0	7	14	21	28	42	56
MS (T1)	0,35325 a	0,35452 b	0,66401 b	0,55186 c	0,26993 e	0,33379 c	0,25215 d
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	0,35146 a	0,31125 c	0,68612 b	0,70360 a	0,49386 c	0,51466 b	0,55250 b
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD (T3)	0,35042 a	0,19440 e	0,27400 e	0,49500 d	0,51343 c	0,49375 b	0,69841 a
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPM (T4)	0,35119 a	0,12609 f	0,23728 e	-	-	-	-
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT (T5)	0,35031 a	0,24456 d	0,36605 c	0,53854 c	0,69152 a	0,59822 a	0,68319 a
MS + 10 mM SPD (T6)	0,34920 a	0,15091 f	0,31528 d	0,54972 c	0,45602 d	0,51266 b	0,42461 c
MS + 10 mM SPM (T7)	0,35310 a	0,16032 f	0,19864 f	-	-	-	-
MS + 10 mM PUT (T8)	0,35079 a	0,42716 a	0,81390 a	0,62714 b	0,60242 b	0,52094 b	0,53509 b

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

Analisando a Figura 13, verifica-se que todos os tratamentos, com exceção do T1 e T8, apresentaram redução da atividade enzimática até o sétimo dia, a partir de onde todos os tratamentos aumentaram a atividade até os 14 dias.



T1: $y = 0,2194 + 0,1624x - 0,0235x^2$	$R^2=0,79$
T2: $y = 0,1373 + 0,2039x - 0,0218x^2$	$R^2=0,81$
T3: $y = 0,2913 - 0,0186x + 0,0107x^2$	$R^2=0,83$
T4: $y = 0,4716 - 0,1545x + 0,0124x^2$	$R^2=0,84$
T5: $y = 0,1830 + 0,0877x - 0,0018x^2$	$R^2=0,83$
T6: $y = 0,1463 + 0,1002x - 0,0076x^2$	$R^2=0,79$
T7: $y = 0,4943 - 0,1677x + 0,0139x^2$	$R^2=0,90$
T8: $y = 0,1457 + 0,2406x - 0,0277x^2$	$R^2=0,82$

Figura 13. Atividade de peroxidase em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Maior atividade ($0,8139 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mf}$) foi observada aos 14 dias no tratamento 8 (MS + 10 mM PUT), seguido por T2 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA) e T1 (MS), com médias de $0,6861$ e $0,6640 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ decomposto min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mf}$, respectivamente. Para esses tratamentos verificou-se diminuição na atividade até 28º dia, tendendo à estabilidade a partir deste ponto.

A alta atividade de peroxidase observada em T2 pode ser devido a hiperhidricidade e/ou ao grande número de brotações, provocando um acúmulo de H₂O₂ dentro das células. Esses resultados corroboram os observados por Frank et al. (1995) e

Piqueras et al. (2002), em brotações hiperhídricas de *Prunus avium* e *Dianthus caryophyllus*, respectivamente.

O aumento da atividade de peroxidase, ocorrido no tratamento 2, poderia ser utilizado como um marcador bioquímico que antecede o evento visual, já que nesse tratamento a alta atividade aos 21 dias antecedeu a formação de grande número de brotos. Por outro lado, no T1 e T8 que apresentaram pouca ou nenhuma brotação, a atividade da peroxidase poderia ser relacionada com o estado fisiológico da planta. Segundo Gaspar et al. (1985) e Lima et al. (1999), ocorre a formação de peróxidos quando as plantas estão sob condição de estresse, podendo a atividade da peroxidase ser utilizada como marcador de estresse, indicando mudanças fisiológicas.

Outra hipótese seria que a alta atividade da peroxidase, observada nos tratamentos 1 e 8, estaria relacionada com o enraizamento ocorrido. De acordo com Gaspar et al. (1992) há necessidade de se detectar a máxima e a mínima atividade da peroxidase para definir o fim ou o início da fase de enraizamento. Hausman (1993) relataram aumento na atividade da peroxidase antes da fase de enraizamento, em brotações tratadas com NAA, correspondendo ao período que as brotações estavam com baixo nível de auxina endógena.

Gaspar et al. (1997) comentam o fato de que a concentração de poliaminas poderia ser alterada durante o enraizamento, mostrando padrão similar ao ácido 3-indolacético (IAA) e oposto à peroxidase, como também observado neste trabalho, isto é, alta atividade da peroxidase e baixo teor de putrescina, podendo ser utilizados como marcadores do enraizamento. Outros autores também observaram padrões semelhantes (Arena et al., 2003; Hausman et al., 1995).

Os tratamentos 4 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPM) e 7 (MS + 10 mM SPM) não foram analisados após o 14º dia, pois os explantes não desenvolveram e foram descartados, pois como relatado anteriormente, apresentaram amarelecimento e morte.

Para o T5 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT) maior atividade de peroxidase foi observado aos 28 dias quando os primeiros brotos começaram a surgir (Figura 13). Este tratamento apresentou os melhores resultados para número e qualidade das brotações. A iniciação e o desenvolvimento dos órgãos em explantes de plantas envolvem a promoção da atividade meristemática, sua manutenção em algumas

regiões e concomitante supressão em regiões de maturação (Kay e Basile, 1987). Tavares (2000) verificou aumento na atividade de peroxidase no início da fase de enraizamento, aos 15 dias cultivo *in vitro* de bromélia *Aechmea distichantha*, sendo que esta enzima poderia estar participando da regulação de IAA endógeno.

De acordo com Rawal e Mehta (1982) a peroxidase pode ser utilizada como indicador de diferenciação celular e, ainda apresenta papel significativo no crescimento da planta, assim como nas mudanças morfológicas observadas em resposta a agentes físicos, químicos e ao estresse biótico (Gaspar et al., 1985) ou abiótico (Lima et al., 1999).

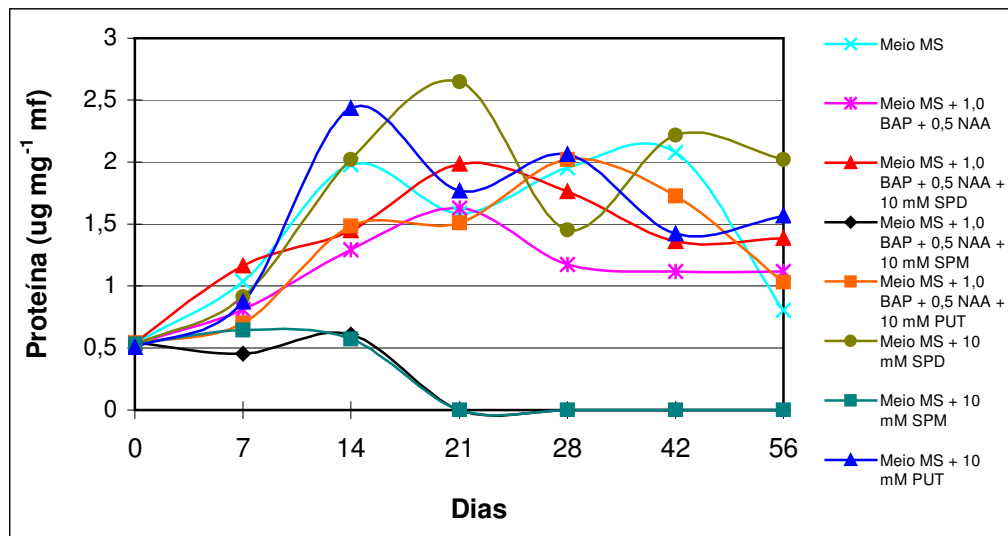
Os teores médios iniciais de proteína total solúvel variaram de 0,50 a 0,54 mg de proteína g⁻¹ de massa fresca, não diferindo estatisticamente (Tabela 18), enquanto que, ao longo do tempo e devido à influência dos tratamentos, alterações foram observadas.

Tabela 18. Teor de proteína total solúvel (mg de proteína g⁻¹ de massa fresca) em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Tratamentos	Dias						
	0	7	14	21	28	42	56
MS (T1)	0,54010 a	1,03598 a	1,97792 b	1,58532 c	1,95424 a	2,07639 a	0,80510 c
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	0,53856 a	0,80842 a	1,29632 c	1,62662 c	1,17505 c	1,12078	1,11963 c
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD (T3)	0,54010 a	1,16541 a	1,44990 c	1,98618 b	1,76171 a	1,35886 c	1,38624 b
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPM (T4)	0,54680 a	0,45570 b	0,61058 d	-	-	-	-
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT (T5)	0,54313 a	0,70196 b	1,48600 c	1,51003 c	2,02237 a	1,72856 b	1,02883 c
MS + 10 mM SPD (T6)	0,53236 a	0,90984 a	2,01936 b	2,64856 a	1,45319 b	2,21883 a	2,02172 a
MS + 10 mM SPM (T7)	0,53150 a	0,64555 b	0,57421 d	-	-	-	-
MS + 10 mM PUT (T8)	0,50755 a	0,87025 a	2,43220 a	1,76996 b	2,06229 a	1,42404 c	1,56497 b

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

Observa-se, na Figura 14, que com exceção dos tratamentos 4 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPM) e 7 (MS + 10 mM SPM), todos apresentaram aumento no teor de proteína até o 14º dia, variando os resultados a partir deste ponto. As proteínas podem ser utilizadas como parâmetro de crescimento e desenvolvimento de células e tecidos e possivelmente, esse aumento nos teores esteja confirmando os bons resultados observados para estes tratamentos. A utilização de apenas SPD (T6) e PUT (T8) no meio MS resultou em maiores teores de proteína aos 21 (2,6485 µg mg⁻¹ mf) e 14 dias (2,4322 µg mg⁻¹ mf). Estes resultados corroboram os descritos por Mehta et al. (1991), em resposta a SPD exógena em cultura de células de arroz, e Tavares (2000) na micropropagação da bromélia *Aechmea distichantha* com PUT e SPD exógenas, isto é, aumento nos teores de proteínas em resposta à aplicação de poliaminas exógenas.



T1: $y = -0,6126 + 1,1886x - 0,1358x^2$	$R^2=0,82$
T2: $y = -0,0272 + 0,6163x - 0,0670x^2$	$R^2=0,85$
T3: $y = -0,2164 + 0,8711x - 0,0944x^2$	$R^2=0,89$
T4: $y = 0,8111 - 0,1988x + 0,0107x^2$	$R^2=0,86$
T5: $y = -0,5330 + 0,9736x - 0,0136x^2$	$R^2=0,87$
T6: $y = -0,4225 + 1,0177x - 0,0981x^2$	$R^2=0,85$
T7: $y = 0,8780 - 0,2126x + 0,0111x^2$	$R^2=0,90$
T8: $y = -0,4970 + 1,1111x - 0,1214x^2$	$R^2=0,89$

Figura 14. Teor de proteína total solúvel (µg de proteína mg⁻¹ de massa fresca) em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Registrou-se redução nos teores protéicos no T8 a partir do 14º dia de cultivo *in vitro*, porém, aos 28 dias verificou-se novo aumento, coincidindo com a emissão de novas brotações. De forma semelhante, observou-se para o T6, porém esse aumento ocorreu aos 42 dias quando as brotações já estavam formadas, embora com tamanho reduzido. Piza (2000) observou que o aumento no teor de proteína aos 30 dias poderia estar relacionado com o período de ativo crescimento das plantas de abacaxizeiro ‘Smooth Cayenne’, em presença de NaCl, coincidindo com a emissão da parte aérea.

Verificou-se redução nos teores de proteína nos tratamentos 2 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA), 3 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD) e 5 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT) a partir de 21 dias até 56 dias de cultivo, constatando-se possível relação com a utilização de reguladores vegetais. Baixos teores de proteína no T2 podem estar relacionados com a hiperhidricidade das plântulas. Significante redução nos teores de proteína em folhas hiperhídricas de *Solanum melongena* (Picoli et al., 2001) e *Gypsophila paniculata* (Paek e Han, 1989) foram descritos.

Alterações nas condições de cultivo podem influenciar a degradação e reconstituição das proteínas. Esse processo é essencial para que as plantas reutilizem os aminoácidos, alterando seu conteúdo protéico durante o desenvolvimento, a fim de se adaptar a novas condições de cultivo (Piza, 2000).

4.2.3 Teor de poliaminas

Através da análise de variância, verifica-se que houve interação significativa entre os diferentes tipos de meio de cultura com os dias de coleta das amostras, para os teores endógenos de putrescina, espermidina e espermina, evidenciando o efeito correlacionado dos fatores (Tabela 19).

Tabela 19. Análise de variância para os teores endógenos de putrescina (PUT), espermidina (SPD) e espermina (SPM).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		PUT	SPD	SPM
Meios de Cultura	7	1,09518**	0,13751**	0,1919**
Dias	6	1,46422**	0,88658**	1,42938**
Meios de Cultura *	42	0,32061**	0,14481**	0,54573**
Dias				
Erro	112	0,01527	0,00159	0,00386
CV (%)		36,95	23,57	17,90

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Verificou-se tendência semelhante para os teores de putrescina, espermidina e espermina endógenas estudadas, com pico entre o 14° e 28° dia, coincidindo com a emissão de novas folhas e formação das brotações e diminuição dos teores até o 56° dia. Resultados semelhantes foram observados por Pizza (1996) quando constatou aumento nos teores de poliaminas no início da emissão da parte aérea de abacaxizeiro ‘Smooth cayenne’, confirmando o envolvimento das poliaminas nos processos de divisão e crescimento celular.

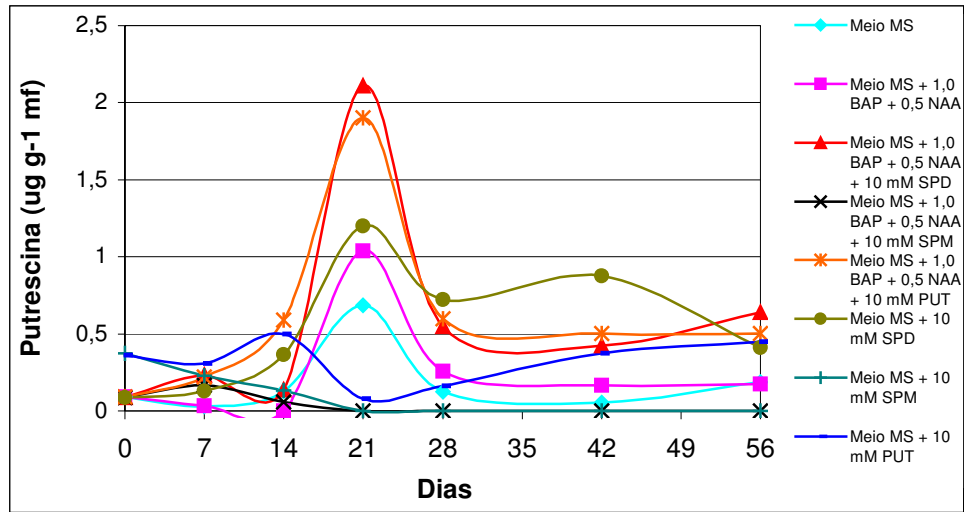
A análise dos teores endógenos das poliaminas para o T4 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPM) e T7 (MS + 10 mM SPM) só foram realizadas até o 14° dia, pois foram descartados devido ao amarelecimento e morte.

Para putrescina, o maior valor (2,1097 µg g⁻¹ massa fresca) foi observado aos 21 dias no T3 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD) (Tabela 20 e Figura 15), seguido do T5 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT) (1,9028 µg g⁻¹ massa fresca), que apresentou melhores resultados para número e qualidade das brotações.

Tabela 20. Teor de putrescina endógena ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca) em plântulas de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ micropropagado.

Tratamentos	Dias						
	0	7	14	21	28	42	56
MS (T1)	0,0923 b	0,0296 a	0,1276 b	0,6863 d	0,1246 b	0,0556 c	0,1866 b
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	0,0900 b	0,0313 a	traços	1,0397 c	0,2592 b	0,1679 c	0,1745 b
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD (T3)	0,0876 b	0,2320 a	0,1391 b	2,1097 a	0,5495 a	0,4242 b	0,6404 a
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPM (T4)	0,0883 b	0,1666 a	0,0572 b	-	-	-	-
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT (T5)	0,0916 b	0,2213 a	0,5883 a	1,9028 b	0,5994 a	0,5018 b	0,5031 a
MS + 10 mM SPD (T6)	0,0886 b	0,1280 a	0,3653 a	1,2021 c	0,7231 a	0,8760 a	0,4117 a
MS + 10 mM SPM (T7)	0,3756 a	0,2298 a	0,1338 b	-	-	-	-
MS + 10 mM PUT (T8)	0,3606 a	0,3059 a	0,4977 a	0,0785 e	0,1612 b	0,3742 b	0,4490 a

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott



T1: $y = -0,1623 + 0,2125x - 0,0250x^2$	$R^2=0,78$
T2: $y = -0,3767 + 0,3722x - 0,0430x^2$	$R^2=0,81$
T3: $y = -0,7335 + 0,7413x - 0,0817x^2$	$R^2=0,82$
T4: $y = 0,1768 - 0,0491x + 0,0032x^2$	$R^2=0,92$
T5: $y = -0,7999 + 0,8455x - 0,976x^2$	$R^2=0,89$
T6: $y = -0,6571 + 0,6314x - 0,0663x^2$	$R^2=0,91$
T7: $y = 0,5623 - 0,2020x + 0,0175x^2$	$R^2=0,98$
T8: $y = 0,5595 - 0,1650x + 0,0209x^2$	$R^2=0,81$

Figura 15. Teor de putrescina endógena ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca) em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Tal resultado concorda com os apresentados por Maki et al. (1991), sugerindo que a putrescina deve agir no controle do progresso das fases da mitose nas células, evidenciando aumento dos teores durante esse período. Fobert e Webb (1988) também verificaram que o material com maior potencial morfogenético continha mais putrescina livre. A inibição da síntese de putrescina reduziu o número de embriões formados e estimulou a produção de um grande número de raízes. Embora Panicot et al. (2002) e Takao et al. (2006) relatam que o acúmulo de putrescina é, geralmente, considerado tóxico às plantas e eventualmente adianta a morte programada das células, quando o teor se torna muito alto.

Resultados semelhantes foram observados por Mógor (2005) quando analisou o teor de putrescina endógena nos perfilhos de babosa, porém o maior número de perfilhos foi verificado na combinação de SPM + SPD, sugerindo que os teores de putrescina aumentam nos tecidos em crescimento ativo (Rey et al., 1994). De forma similar, Desai e

Metha (1985) verificaram em explantes foliares de *Passiflora sp* que os teores de putrescina aumentaram durante a emissão de brotações.

Scholten (1998) observou efeito positivo da putrescina exógena (0,3 mM) no peso das brotações de tomateiro, porém constatou efeito negativo para micropropagação de cactos em concentrações maiores que 1 mM e na porcentagem de enraizamento, quando combinou 1 mM de putrescina com 0,5 mM de IBA (ácido indolbutírico).

Wallace et al. (2003) citam que altos níveis de ADC em tecidos que não estão em divisão celular estão relacionados com o aumento da síntese de putrescina.

No T8 (MS + 10 mM PUT), embora o teor endógeno de PUT tenha sido mais baixo em relação aos demais tratamentos, constatou-se um pico aos 14 dias com diminuição aos 21 dias e aumento contínuo até a última coleta.

Nos tratamentos 4 e 7 o maior teor de putrescina foi verificado aos 7 dias, apresentando diminuição aos 14 dias.

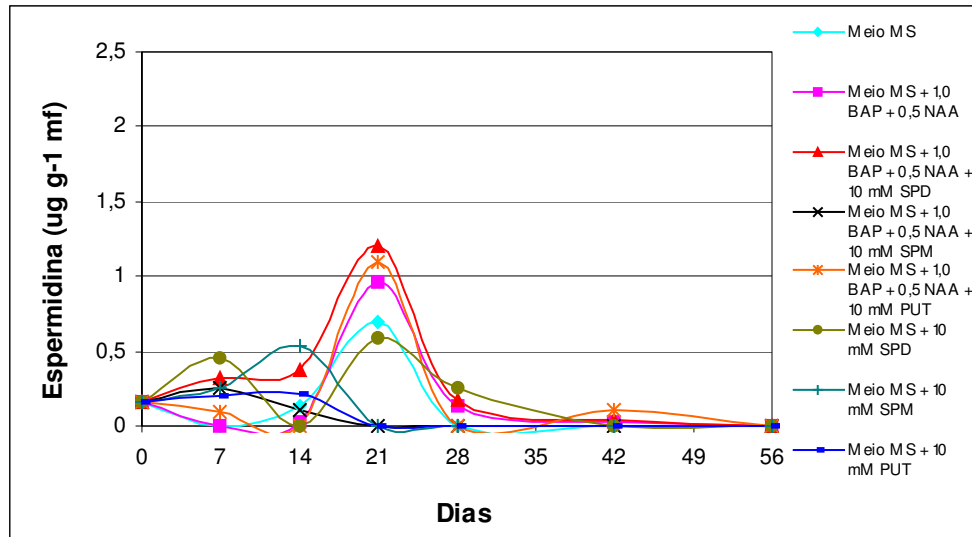
De acordo com a Tabela 21 e Figura 16, maiores níveis de espermidina foram observados nos tratamentos 3 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD), 5 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT) e 2 (MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA), com médias de 1,2082, 1,0980 e 0,9600 µg g⁻¹ massa fresca, respectivamente, aos 21 dias, semelhantemente ao observado para putrescina. No 7º dia houve um pico quando se cultivou em meio MS com 10 mM SPD (T6) e aos 14 dias na presença de meio MS + 10 mM SPM (T7).

Tabela 21. Teor de espermidina endógena em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Tratamentos	Dias						
	0	7	14	21	28	42	56
MS (T1)	0,1581 a	traços	0,1347 d	0,6973 d	traços	traços	traços
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	0,1541 a	0,0006 e	0,0279 e	0,9600 c	0,1328 b	0,0299 b	traços
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD (T3)	0,1539 a	0,3212 b	0,3686 b	1,2082 a	0,1732 b	0,0430 b	traços
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPM (T4)	0,1540 a	0,2537 c	0,1038 d	-	-	-	-
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT (T5)	0,1565 a	0,0877 d	traços	1,0980 b	traços	0,1037 a	traços
MS + 10 mM SPD (T6)	0,1544 a	0,4573 a	traços	0,5939 e	0,2479 a	traços	traços
MS + 10 mM SPM (T7)	0,1561 a	0,2546 c	0,5353 a	-	-	-	-
MS + 10 mM PUT (T8)	0,1564 a	0,2023 c	0,2191 c	traços	traços	traços	traços

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

Resultados positivos para peso e comprimento das brotações de tomateiro foram observados por Scholten (1998) utilizando 0,5 mM de espermidina, porém, altas concentrações desta poliamina foram prejudiciais para número de folhas e taxa de multiplicação.



T1: $y = -0,1147 + 0,2070x - 0,0286x^2$	$R^2=0,83$
T2: $y = -0,2782 + 0,3275x - 0,0422x^2$	$R^2=0,84$
T3: $y = -0,3150 + 0,4983x - 0,0677x^2$	$R^2=0,91$
T4: $y = 0,2919 - 0,0820x + 0,0054x^2$	$R^2=0,93$
T5: $y = -0,2465 + 0,3281x - 0,0429x^2$	$R^2=0,80$
T6: $y = 0,0337 + 0,01832x - 0,0279x^2$	$R^2=0,87$
T7: $y = 0,2334 + 0,0245x - 0,0098x^2$	$R^2=0,89$
T8: $y = 0,2566 - 0,0509x + 0,0014x^2$	$R^2=0,92$

Figura 16. Teor de espermidina endógena em plântulas de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ micropropagado.

Verificou-se para espermina, maiores níveis ($1,6060$ e $1,5052 \mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca) aos 21 dias nos tratamentos 3 (MS + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA + 10 mM SPD) e 5 (MS + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA + 10 mM PUT), de forma semelhante ao verificado pra PUT e SPD, aos 14 dias ($1,5535 \mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca) no T4 (MS + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA + 10 mM SPM) e aos 7 dias ($1,4678 \mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca) no T7 (MS + 10 mM SPM) (Tabela 22 e Figura 17).

Tabela 22. Teor de espermina endógena em plântulas de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’ micropropagado.

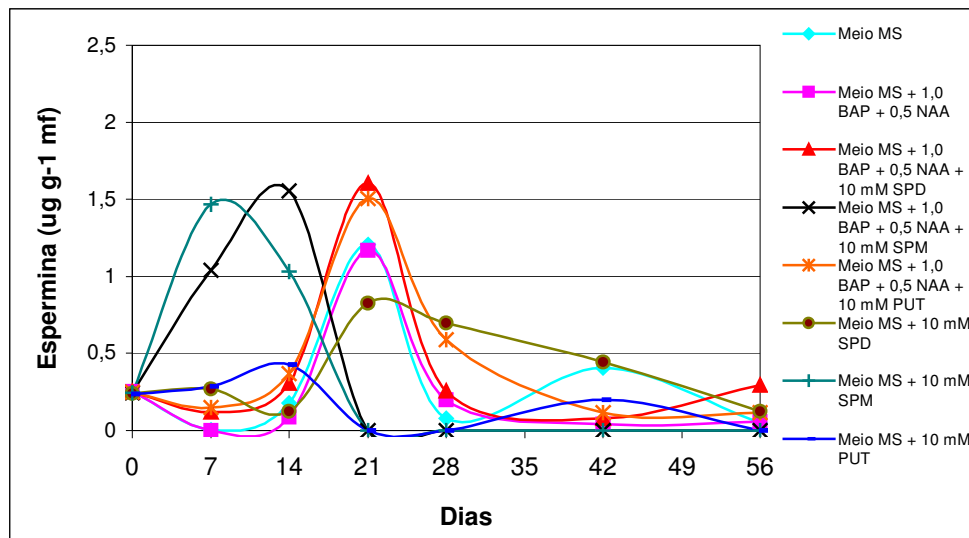
Tratamentos	Dias						
	0	7	14	21	28	42	56
Meio MS (T1)	0,2540 a	0,0055 e	0,1798 d	1,2057 b	0,0773 d	0,4047 a	0,0477 c
Meio MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	0,2511 a	traços	0,0866 d	1,1687 b	0,2006 c	0,0429 c	0,0562 c
Meio MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD (T3)	0,2511 a	0,1211 d	0,3068 c	1,6060 a	0,2569 c	0,0777 c	0,2930 a
Meio MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPM (T4)	0,2429 a	1,0413 b	1,5535 a	-	-	-	-
Meio MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT (T5)	0,2507 a	0,1484 d	0,3682 c	1,5052 a	0,5903 b	0,1173 b	0,1174 b
Meio MS + 10 mM SPD (T6)	0,2424 a	0,2698 c	0,1250 d	0,8264 c	0,6967 a	0,4434 a	0,1258 b
Meio MS + 10 mM SPM (T7)	0,2437 a	1,4678 a	1,0341 b	-	-	-	-
Meio MS + 10 mM PUT (T8)	0,2360 a	0,2855 c	0,4273 c	traços	traços	0,1982 b	traços

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

A partir dos resultados observados neste experimento, constata-se que a espermina, na concentração utilizada, tem efeito deletério para a micropropagação do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’, mesmo em presença dos reguladores vegetais. Isto foi observado nos tratamentos 4 e 7 (Figura 12), caracterizado por excessivo amarelecimento seguido de morte, indicando que um preciso balanço dos níveis celulares de poliaminas é requerido durante os estágios de desenvolvimento da planta. Schoelten (1998) também observou efeito negativo da aplicação exógena de espermina, em todas as concentrações utilizadas, mesmo combinada com espermidina e putrescina para *Syringa vulgaris*. Naik et al. (1980) constataram que a espermina bloqueou o efeito da cinetina, sugerindo que as citocininas e espermina controlam a permeabilidade da membrana por um mesmo receptor. Por outro lado, Rakova e Romanov (2005) citam que as poliaminas afetaram o estágio de pós-transcrição do BA (benziladenina), mas não interferiram no acúmulo de mRNA dependente de

citocininas. Este fato contradiz a hipótese sobre a existência de um receptor comum para poliaminas e BA ou sobre as poliaminas como mensageiros secundários na rota de citocinina.

Scott et al. (1998) afirmam que as poliaminas, apesar de resultarem em efeitos positivos em diversas culturas, em alguns casos mostram-se ineficientes. Os diferentes efeitos que as poliaminas apresentam para um mesmo evento podem estar relacionados com a aplicação de uma concentração inadequada à espécie ou a altas concentrações endógenas já existentes nos tecidos, podendo ocorrer ação das poliaminas oxidases, gerando peróxidos (Smith e Davies, 1985) ou mesmo à reconversão à putrescina (Tassoni et al., 2000).



T1: $y = -0,2840 + 0,3919x - 0,0486x^2$	$R^2=0,80$
T2: $y = -0,2584 + 0,3672x - 0,0476x^2$	$R^2=0,82$
T3: $y = -0,3253 + 0,5134x - 0,0642x^2$	$R^2=0,95$
T4: $y = 0,5367 + 0,1723x - 0,0410x^2$	$R^2=0,97$
T5: $y = -0,5311 + 0,6634x - 0,0840x^2$	$R^2=0,97$
T6: $y = -0,2527 + 0,3946x - 0,0468x^2$	$R^2=0,98$
T7: $y = 0,7947 + 0,1115x - 0,0224x^2$	$R^2=0,96$
T8: $y = 0,3366 - 0,0371x - 0,0012x^2$	$R^2=0,95$

Figura 17. Teor de espermina endógena em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado.

Geralmente, na literatura, a putrescina é descrita como a poliamina mais predominante nas plantas (Arena et al., 2003). Neste trabalho, verificou-se que essa diamina não parece ser a poliamina predominante, como ocorre em diversas outras culturas

(Arena et al., 2003; Gaspar et al., 1997), onde parece estar relacionada com o enraizamento. Possivelmente, neste trabalho, a baixa taxa de enraizamento notada poderia ser atribuída à menor concentração de putrescina, em relação às outras aminas, exceto no tratamento 8, onde a aplicação de putrescina exógena pode ter promovido a maior rizogênese.

Notou-se que nos altos teores de putrescina, assim como de espermina e espermidina obtidos neste trabalho, isto é, nos tratamentos 2, 3 e 5, foram aqueles que apresentaram os melhores resultados para número e comprimento de brotações. Estes resultados poderiam levar a consideração de que essas substâncias atuem como marcadores de crescimento e brotação em abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'.

Processos de diferenciação dependem de fatores endógenos e acredita-se que as poliaminas têm função importante nesta fase (Couée et al., 2004). O conteúdo de poliaminas livres é muitas vezes associado com a divisão celular e/ou com a reprogramação das células em um novo padrão de desenvolvimento (Torrighiani et al., 1987).

Malá et al. (2005) verificaram altos teores de espermidina e putrescina na parte apical de *Ulmus glabra*, que apresentaram múltiplas brotações, e este fato poderia estar relacionado com altos teores de citocinina, pré-requisitos para a formação de brotos, semelhante ao observado para abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel', onde em meio contendo PUT e SPD, associadas a citocinina, maiores valores para brotação foram observados.

4.2.4 Aspectos da anatomia foliar

Observou-se em abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' que a face adaxial e abaxial da epiderme são uniestratificadas, hipoestomática do tipo tetracítico, tricomas tectores em ambas as faces, mesofilo homogêneo, com parênquima aquíífero voltado para face adaxial e o parênquima clorofiliano voltado para face abaxial. Verificaram-se inúmeros idioblastos contendo ráfides no mesofilo.

Não se realizou o estudo anatômico para os tratamentos 4 e 7, pois estes explantes cultivados em meio de cultura na presença de espermina, apresentaram efeito fitotóxico e não se desenvolveram, sendo descartados após 14 dias. Na Tabela 23 pode-se observar, por meio do teste F, que houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 23. Análise de variância para espessura da epiderme adaxial (EAD) e abaxial (EAB), parênquima aquífero (PA) e clorofiliano (PC).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios			
		EAD	EAB	PA	PC
Meios de Cultura	7	122,303**	142,476**	6760,214**	13954,433**
Erro	32	0,8840	0,5501	0,8861	1,5371
CV (%)		4,33	1,23	2,15	5,64

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Maiores espessuras da epiderme adaxial foram observadas nos tratamentos com putrescina (Tabela 24). Para epiderme abaxial, maior espessura foi constatada no tratamento 6 (21,548 μm), seguido por T5 (16,488 μm). Verificou-se menor espessura da epiderme abaxial no tratamento 1 (6,310 μm), 3 (10,776 μm) e 8 (10,276 μm).

Tabela 24. Espessura média (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima aquífero e clorofiliano em plantas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' cultivados em meio de cultura MS com poliaminas.

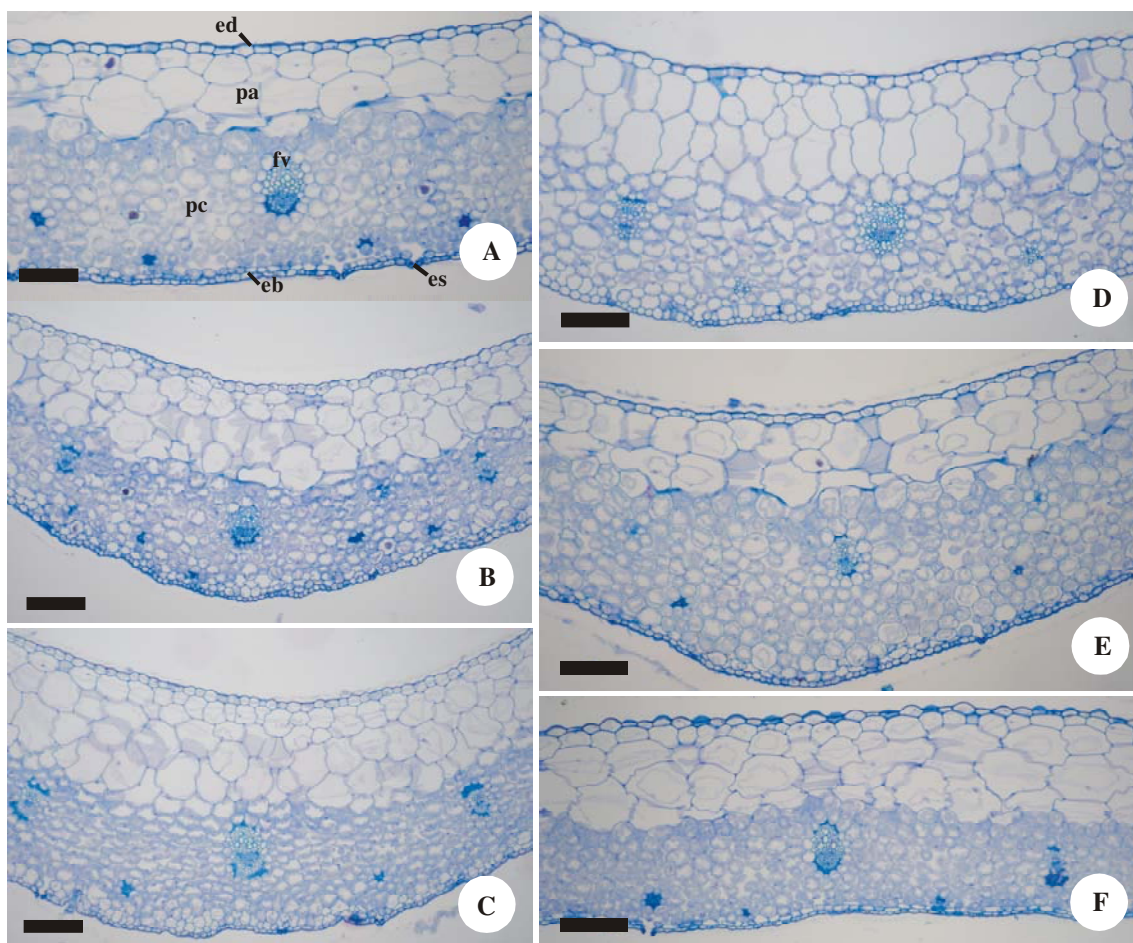
Tratamentos	Epiderme adaxial	Parênquima aquífero	Parênquima clorofiliano	Epiderme abaxial
MS (T1)	16,734 d	133,240 f	276,632 c	6,310 e
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	20,980 c	206,752 e	266,072 d	13,506 c
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM SPD (T3)	16,480 d	223,786 b	283,956 b	10,776 d
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA + 10 mM PUT (T5)	26,392 b	216,066 c	240,060 e	16,488 b
MS + 10 mM SPD (T6)	21,220 c	210,972 d	366,712 a	21,548 a
MS + 10 mM PUT (T8)	28,602 a	238,118 a	210,454 f	10,276 d

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

Observou-se diferença na espessura e formato celular do parênquima aquífero (Tabela 24 e Figura 18). As maiores médias foram observadas nos tratamentos com reguladores vegetais e poliaminas. Estas substâncias podem ter favorecido a divisão celular e o crescimento, aumentando o número de células ou seu tamanho. Segundo Galston e Kaur-

Sawhney (1995), as poliaminas atuam na regulação do crescimento e desenvolvimento, mediação de ação de hormônios e divisão celular. Menor espessura (133,240 μm) foi observada no T1, apresentando 2 a 3 camadas de células, devido, possivelmente, à ausência de substâncias reguladoras do crescimento e desenvolvimento, como por exemplo, os reguladores vegetais e/ou as poliaminas. A maior espessura do T2 (4 camadas de células) em relação ao T1, pode estar relacionada à hiperhidricidade ocorrida com a utilização de 1,0 mg L^{-1} BAP + 0,5 mg L^{-1} NAA. De acordo com Kevers et al. (1984) e Debergh e Maene (1984), folhas hiperhídricas podem não apresentar parênquima paliçádico e o parênquima esponjoso ocupar todo mesofilo. As células do T5 sofreram compressão e apresentaram formato oval, em relação aos outros tratamentos.

Verificou-se em todos os tratamentos, a presença de tricomas tectores por toda a extensão da epiderme, em ambas as faces.



Figuras A-F. Corte transversal de folhas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'. A. T1- MS. B. T2 - MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA. C. T3 - MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM SPD. D. T5 MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 10 mM PUT. E. T6 MS + 10 mM SPD. F. T8 - MS + 10 mM PUT. (eb = face abaxial da epiderme; ed = face adaxial da epiderme; es = estômato; fv = feixe vascular; pa = parênquima aquífero; pc = parênquima clorofiliano). Barra = 150 μm.

Maior parênquima clorofiliano foi observado no T6 (366,712 μm) e T3 (283,956 μm), com o número de camadas variando de 10 a 11 e 11 a 12, respectivamente, sendo que as células do T6 apresentavam maior volume e espaços intercelulares. Verificaram-se as menores médias para o parênquima clorofiliano nos tratamentos com putrescina (T5 e T8) (Tabela 19), contendo de 7 a 8 e 8 a 9 camadas de células, respectivamente, observando-se maior volume e espaços intercelulares no T5.

O aumento na espessura destes tecidos pode favorecer a aclimatização das plantas em casa-de-vegetação por apresentarem o parênquima aquífero e clorofiliano mais espessos, uma vez que o estresse hídrico e a luminosidade são maiores em relação ao ambiente de cultivo *in vitro*.

4.3 TIBA na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’

4.3.1 Brotações e Rizogênese

No presente experimento, objetivou-se analisar o crescimento e desenvolvimento das plantas sob ação do TIBA (ácido 2,3,5-triodobenzóico). No período de cultivo *in vitro* do abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’, em meios de cultura na presença de diferentes concentrações de TIBA, observou-se, uma semana após a inoculação dos explantes, a emissão de novas folhas sendo que aos 30 dias de cultivo novas brotações estavam formadas (Figura 19). As plantas do tratamento 8 (MS + 16,0 μ M TIBA) não se desenvolveram bem, sendo que a maioria oxidou e morreu após a primeira semana de cultivo. Verificou-se, para todos os tratamentos, que após 30 dias de cultivo novas raízes estavam sendo formadas.

Ao final de 60 dias avaliou-se número e comprimento das brotações, comprimento da planta-mãe (explante inicialmente inoculado no meio de cultura a partir do qual formaram-se as novas brotações) e o número de raízes. A análise bioquímica da atividade da IAA-oxidase foi realizada aos 0 (dia da instalação do experimento), 15, 30, 45 e 60 dias de cultivo.

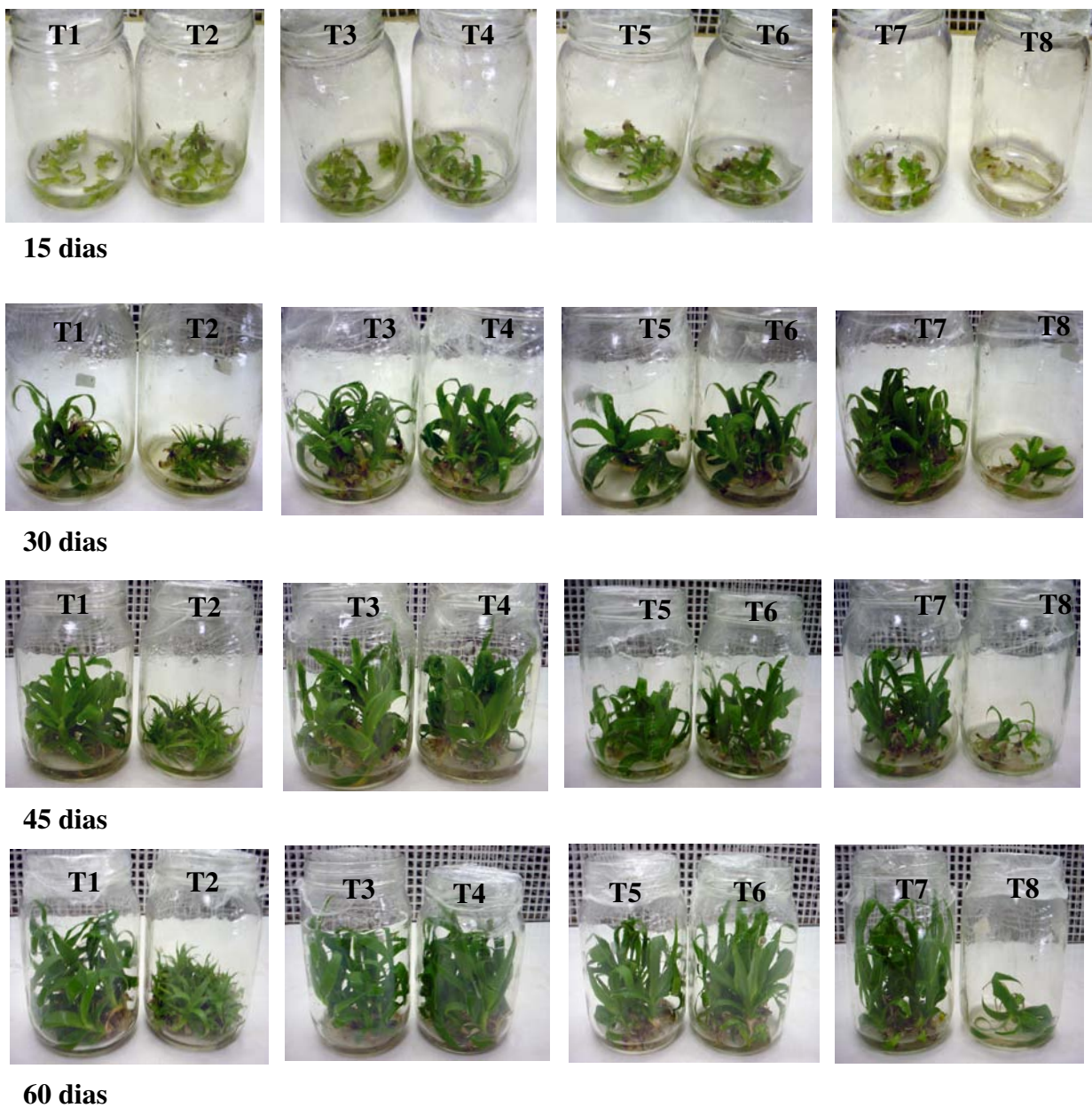


Figura 19. Explantes de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de TIBA, aos 15, 30, 45 e 60 dias.

Houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas pelo teste de Scott-Knott (Tabela 25).

Tabela 25. Análise de variância para as características número de brotações (NB), comprimento das brotações (CB) e da planta mãe (CPM) e número de raízes (NR).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios			
		NB	CB	CPM	NR
Meios de Cultura	7	4,4609**	0,62999**	6,34594**	7,39858**
Erro	20	0,1114	0,10938	0,45194	0,12496
CV (%)		20,51	26,26	12,46	11,9

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Maior número de brotações (3,98) foi observado no tratamento 2 (MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA), porém as plântulas apresentavam aspecto hiperhídrico (aparência vítrea, folhas túrgidas, pequenas e endurecidas) e tamanho reduzido (Figura 19 e Figura 20A). Embora com grande eficiência em promover a formação de brotações adventícias, para muitas espécies o BAP tem proporcionado alterações morfológicas, principalmente quando utilizado em altas concentrações (Lai et al., 2005; Tóth et al., 2004; Fráguas, 2003; Diniz et al., 2003; Leshem et al., 1988).

Apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, por excessivo número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e hiperhidricidade (Leshem et al., 1988). O efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, sendo comum a constatação de efeito residual em subculturas subsequentes, afetando o alongamento e tornando-se fator limitante na fase de enraizamento.

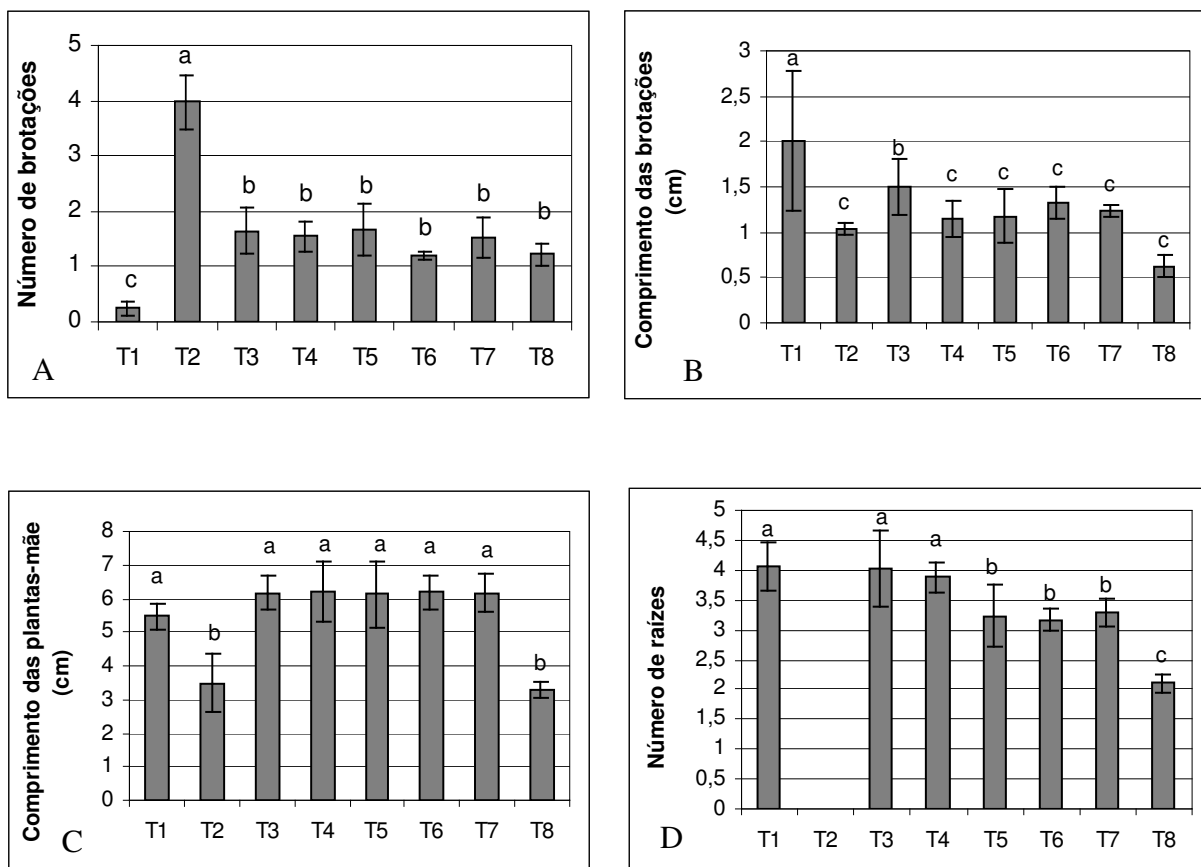


Figura 20. Número de brotações (A), comprimento das brotações (B) e das plantas-mãe (C) e número de raízes (D) de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel', aos 60 dias, cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de TIBA.

Não se observou diferença significativa para número de brotações entre os tratamentos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, variando de 1,19 a 1,67 brotações em média. O T1 (MS) apresentou média de 0,24 brotações, devido, provavelmente, à concentração endógena de reguladores vegetais.

A hiperhidricidade foi verificada apenas no tratamento 2 (MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA), ou seja, a presença de TIBA não influenciou a formação de brotações com hiperhidricidade, embora já tenha sido relatado a influência de TIBA (1 mg L^{-1}) na formação de brotos de *Beta vulgaris* hiperhídricos (Toldi et al., 1996).

No presente trabalho, a suplementação do meio MS com TIBA isoladamente não aumentou o número de brotações, sugerindo que pode não ter havido a

inibição do transporte de auxina e conseqüentemente, não ocorrendo alteração no balanço auxina/citocinina. Resultados semelhantes foram descritos por Strabala et al. (1996) em que a organogênese *in vitro* a partir de folhas de tabaco só ocorria em resposta a suplementação do meio de cultura com TIBA (50 μM) associada a zeatina (50 μM). Em experimentos com bananeira cultivada *in vitro*, Zaffari (1998) observou que o TIBA (0,019 μM), suplementado isoladamente ao meio de cultura não apresentava efeito na promoção de brotações de gemas laterais na cv. Grand Naine, enquanto que Hutchinson et al. (1996) citaram que a aplicação de TIBA em calos de gerânio também não surtiu efeitos *in vitro*. Por outro lado, Singh e Syamal (2000) descreveram que o TIBA aumentou a taxa proliferativa em variedades de rosa em até 100%, promovendo também aumento do comprimento de brotos e números de folhas por explante. Resultados semelhantes foram descritos por Lakshmanan et al. (1997).

Verificou-se tendência de diminuição do número de raízes e comprimento dos brotos com o aumento das concentrações de TIBA aplicado exogenamente. Desta forma, supõe-se que a utilização de uma citocinina juntamente com o TIBA poderia favorecer a proliferação de novas brotações de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' através da ação conjunta destas substâncias. O TIBA poderia inibir a translocação do IAA às gemas laterais e o BAP, por exemplo, contribuir para o aumento das concentrações de citocininas. Goldworthy e Rathore (1985) e Rubery (1987) propuseram que esta antiauxina atua como inibidor do transporte basípeto de auxina, favorecendo a relação citocinina/auxina requerida para a proliferação máxima de brotações axilares.

A partir desse pressuposto, Debiasi (2000) verificou aumento do número de brotos laterais de bananeira formados quando o TIBA (0,019 μM) foi associado ao TDZ (0,090 μM) e da mesma forma Hooker e Nabors (1997) e Toldi et al. (1996) observaram inibição do transporte do IAA em resposta ao uso do TIBA (1,0 mg L^{-1}) associado com BA (1,0 mg L^{-1}) em plantas de beterraba, constatando maior número de brotações formadas. Nakano et al. (2000) conseguiram regenerar brotações de *Lilium formosanum* a partir de suspensão celular de 72 meses utilizando a combinação de TIBA (0,5 e 5 μM) e BA (0,5 e 5 μM). Aumento na taxa proliferativa de brotações de roseira foi observado na concentração de 1 e 3 mg L^{-1} de TIBA quando associado a 3 mg L^{-1} de BA e 0,3 mg L^{-1} de IAA, sendo que o

número de novas brotações aumentou ainda mais durante o subcultivo em meio sem TIBA, porém com BA e IAA (Voyiatzi et al., 1995).

Orlikowska et al. (2000) não constataram aumento no número de brotações de *Codiaeum variegatum* com a utilização de TIBA, porém houve aumento no comprimento destas brotações.

No presente trabalho, maior comprimento das brotações (2,01 cm) foi verificado no T1 (MS), efeito relacionado ao pequeno número de brotações formadas, permitindo melhor crescimento e desenvolvimento das plantas (Figura 20B). Resultado semelhante foi descrito por Debiasi (2000) na micropropagação de bananeira ‘Grand Naine’, ‘Nanicão’ e ‘Enxerto’, isto é, maior comprimento dos brotos na ausência de reguladores vegetais.

Quando utilizou-se o meio MS + 0,5 μ M TIBA (T3) observou-se 1,51 cm de comprimento para as brotações, diferindo estatisticamente do T1. Para os demais tratamentos não houve diferença estatística, sendo que a média não ultrapassou 1,32 cm de comprimento (Figura 20B). Embora não diferindo estatisticamente, as brotações do tratamento 8 não ultrapassaram 0,62 cm de comprimento e as folhas apresentavam aspecto de murcha, além da maioria dos explantes inoculados terem morrido após uma semana de cultivo (Figura 19). Possivelmente, a concentração utilizada do TIBA (16 μ M) foi fitotóxica para esta variedade, inibindo o desenvolvimento das plântulas e novas brotações (Figura 19).

Verificou-se comprimento semelhante para os explantes inicialmente inoculados ao meio de cultura (plantas-mãe), diferindo apenas do T2 (MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA) e T8 (MS + 16,0 μ M TIBA) que tiveram as menores médias, 3,49 e 3,3 cm, respectivamente (Figura 20C).

Com relação ao sistema radicular, observou-se maior número de raízes nos tratamentos 1 (4,07), 3 (4,03) e 4 (3,88), seguidos pelos tratamentos 5, 6 e 7, sendo que o último apresentou desenvolvimento radicular reduzido (Figura 20D). Pode-se relacionar esses resultados ao balanço hormonal endógeno favorável à auxina, comprovando que não houve efeito do TIBA na inibição da translocação do IAA. No T2 não houve formação de raízes, devido, provavelmente, ao balanço favorável a citocinina conferido pela utilização de 1,0 mg L⁻¹ de BAP (Figura 20D). Liu et al. (1996) relatam o aumento do número de raízes adventícias

com o aumento de IAA endógeno e conseqüente diminuição na atividade da IAA-oxidase e baixo conteúdo de lignina.

Alterações radiculares como diminuição no alongamento, localização dos tricomas próximo ao meristema, aumento da densidade de tricomas e não formação de raízes laterais foram observadas em plântulas de *Arabidopsis thaliana* na presença de TIBA (Pasternak et al., 2005). Karabaghli-Degron et al. (1998) também relatam que a aplicação exógena de TIBA reduziu significativamente a formação de raízes laterais em plântulas de *Picea abies* inoculadas com ectomicorriza, sugerindo que o TIBA inibiu o transporte do IAA do fungo para as raízes.

A capacidade de formação de raízes laterais está diretamente relacionada ao padrão de auxina e/ou sua distribuição (Reinhardt et al., 2003). A inibição do transporte polar de auxina por TIBA e NPA impede a formação de raízes laterais e isto reflete o acúmulo de auxina no ápice radicular e redução no periciclo (Casimiro et al., 2001).

4.3.2 Atividade da IAA-oxidase

O estudo bioquímico da parte aérea de abacaxizeiro ‘IAC Gomo-de-mel’, realizado através da atividade da IAA-oxidase, cultivado *in vitro* sob o efeito de substância inibidora do transporte do IAA, demonstrou diferenças significativas entre os fatores, indicando efeito correlacionado dos meios de cultura (TIBA) e dias de coleta para análise das amostras (Tabela 26).

Tabela 26. Análise de variância para a atividade da IAA-oxidase em brotações de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios
		IAA-oxidase
Meios de Cultura	7	0,00000521356 **
Dias	4	0,00006366703 **
Meios de Cultura * Dias	28	0,00000351818**
Erro	120	000000,18415
CV (%)		9,84

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

A atividade média inicial de IAA-oxidase estava em 0,00335 $\mu\text{mol IAA g mf}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Tabela 27), observando-se variações nos diferentes tratamentos durante o ciclo de cultivo.

Tabela 27. Atividade de IAA oxidase ($\mu\text{mol IAA g mf}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em brotações de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de TIBA, aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

Tratamentos	Dias				
	0	15	30	45	60
Meio MS (T1)	0,003357 a	0,007688 b	0,005371 a	0,003088 d	0,004340 a
Meio MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	0,003349 a	0,004344 f	0,003912 b	0,003775 c	0,003614 a
Meio MS + 0,5 μM TIBA (T3)	0,003321 a	0,007908 b	0,003785 b	0,003696 c	0,003342 b
Meio MS + 1,0 μM TIBA (T4)	0,003341 a	0,006913 c	0,004069 b	0,002739 d	0,002593 b
Meio MS + 2,0 μM TIBA (T5)	0,003359 a	0,005844 d	0,003699 b	0,005503 a	0,003965 a
Meio MS + 4,0 μM TIBA (T6)	0,00334 a	0,007046 c	0,003898 b	0,004795 b	0,002729 b
Meio MS + 8,0 μM TIBA (T7)	0,003353 a	0,005142 e	0,003652 b	0,002926 d	0,004074 a
Meio MS + 16,0 μM TIBA (T8)	0,003361 a	0,009500 a	0,005684 a	0,004870 b	0,003045 b

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

Na Figura 21, observa-se de forma geral, que os tratamentos apresentaram respostas semelhantes em relação à atividade da IAA-oxidase. Até o 15º dia verificou-se aumento da IAA-oxidase, sugerindo uma possível inibição no transporte de IAA até este período de cultivo, e logo após, diminuição.

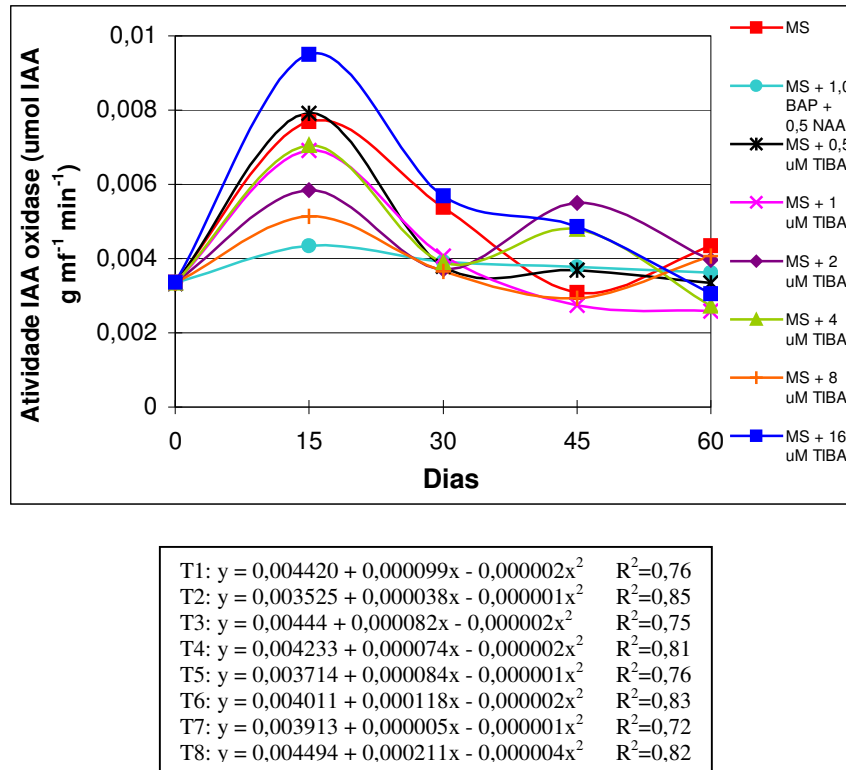


Figura 21. Atividade de IAA oxidase ($\mu\text{mol IAA g mf}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em plântulas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de TIBA, aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

Zaffari (1998) observou maior atividade da IAA-oxidase aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS inicial, decrescendo progressivamente até os 150 dias de cultivo em meios de cultura MS contendo BAP, TIBA ou PCIB (ácido *p*-clorofenoxi isobutírico). Beffa et al. (1990) demonstraram que vários inibidores do transporte de IAA podem igualmente atuar na atividade da IAA-oxidase, em geral, TIBA e NPA.

Debiasi (2000) relatou maior atividade da IAA-oxidase nos rizomas de bananeira nos dois primeiros dias de cultivo, quando o meio de cultura MS foi suplementado com BAP ($11,1 \mu\text{mol L}^{-1}$). Estes resultados indicaram a necessidade da redução nos níveis endógenos de IAA para promover uma relação auxina/citocinina favorável as citocininas, uma vez que o sinal para a indução do desenvolvimento das gemas laterais é dado já nos primeiros dias da presença de citocinina no meio (Zaffari, 1998).

A inativação do IAA é mediada via reações foto-oxidativas e sistemas oxidativos enzimáticos (Taiz e Zeiger, 2004; Salisbury e Ross, 1992). Atribui-se ao sistema oxidativo enzimático, conhecido por IAA-oxidase, o desempenho do controle dos níveis endógenos de IAA nas plantas (Gaspar, 1982). O ácido indolacético tem importante função atuando na regulação do crescimento e desenvolvimento, incluindo o alongamento celular (Normanly, 1997). Segundo Hrubcová et al. (2000), o declínio da atividade de IAA-oxidase coincidiu com a diminuição no teor de IAA, devido, provavelmente, à formação de conjugados com IAA. O IAA pode se ligar a outras moléculas na planta produzindo conjugados que podem reter ou perder a atividade auxínica (Salisbury e Ross, 1994).

Verificou-se no tratamento 8 as maiores atividades enzimáticas até os 30 dias, sendo que após este período as plantas já estavam murchas e, possivelmente, os resultados posteriores sejam influência do estado fisiológico do vegetal. Neste tratamento observou-se o menor número de raízes e de comprimento das brotações. Galston e Dalberg (1954) foram os primeiros pesquisadores a demonstrarem que a aplicação de TIBA induz a formação de IAA-oxidase em plantas de ervilha. Resultados semelhantes são descritos também por Audus e Bakhsh (1961) e Meudt e Stecher (1971).

No tratamento 2, contendo citocinina e auxina, observou-se a tendência das menores atividades de IAA-oxidase e ausência de formação de raízes. Saleh (1981) também verificou que a aplicação de cinetina induziu à baixa atividade da IAA-oxidase em milho e feijão.

A partir de 15 dias de cultivo *in vitro* houve considerável redução na atividade enzimática da IAA-oxidase, coincidindo com a emissão de novas brotações, sendo que aos 30 dias já estavam completamente formadas. Possivelmente, a atividade desta enzima foi reduzida após a segunda semana contribuindo para o balanço endógeno favorável às citocininas, permitindo a formação de novas brotações.

Os tratamentos 5 e 6 apresentaram novamente aumento na atividade da enzima dos 30 aos 45 dias, decrescendo até o final do cultivo. Porém, este aumento foi menor do que o observado até os 15 dias.

Os maiores valores para atividade da IAA-oxidase foram observados no tratamento 8 (MS + 16,0 μM TIBA), 3 (MS + 0,5 μM TIBA) e 1 (MS) com médias de 0,00950, 0,007908 e 0,007688 $\mu\text{mol IAA g mf}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Embora a utilização de 16,0 μM TIBA tenha proporcionado maior atividade da IAA-oxidase, não foi suficiente para aumentar o número de brotações, além de ter oxidado a maior parte dos explantes na primeira semana de cultivo.

A formação de raízes coincidiu com a redução da atividade da IAA-oxidase aos 30 dias (Figura 21), corroborando os resultados observados por Liu et al. (1996), Vazquez e Mato (1991) e Al Barazi e Schwabe (1984), indicando que a redução da atividade da IAA-oxidase acompanha a formação de raízes adventícias. Na Figura 21 verifica-se aumento da atividade enzimática antes da emissão das raízes, indicando alterações bioquímicas no processo de enraizamento. Resultados semelhantes foram relatados por Liu et al. (1996) para o enraizamento de plântulas de soja.

Quaddoury e Amssa (2004) encontraram que a formação de raízes em *Phoenix dactylifera* coincidiu com a diminuição da atividade da IAA-oxidase. A redução da atividade e o aumento da concentração endógena de auxinas indicam que a auxina é necessária para o processo de enraizamento (Vasquez e Mato, 1991; Liu et al., 1996).

4.3.3 Aspectos da anatomia foliar

Em abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' micropropagado, como na maioria das bromeliáceas, observou-se que a lâmina foliar apresenta nas faces adaxial e abaxial epiderme uniestratificadas, hipostomática do tipo tetracítico, tricomas tectores em ambas as faces, mesofilo homogêneo, com parênquima aquífero voltado para face adaxial e o parênquima clorofiliano voltado para face abaxial. Verificaram-se inúmeros idioblastos contendo ráfides no mesofilo.

Os órgãos vegetativos de plantas cultivadas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas menos desenvolvidos ou pouco diferenciados se comparados com os de plantas cultivadas de forma convencional (Fidelis, 1998; Santos, 2001; Fráguas, 2003; Albert, 2004).

De acordo com a análise de variância, existem diferenças anatômicas entre as plantas cultivadas em diferentes concentrações de TIBA. As dimensões dos tecidos foliares e o número de estômatos foram influenciados pelos diferentes tratamentos (Tabela 28).

Tabela 28. Análise de variância para espessura da epiderme adaxial (EAD) e abaxial (EAB), parênquima aquífero (PA) e clorofiliano (PC) e número de estômatos (NE).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios				
		EAD	EAB	PA	PC	NE
Meios de Cultura	7	151,570**	30,169**	22662,822**	6479,796**	4,429**
Erro	32	1,5828	1,5521	5,5130	19,0997	0,3249
CV (%)		7,10	4,24	4,02	14,26	14,25

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

Observa-se na Tabela 29, que a espessura da epiderme adaxial e abaxial variaram de acordo com os tratamentos. Maior espessura da epiderme adaxial foi verificada no tratamento 1, onde, provavelmente, a ausência de reguladores possibilitou melhor desenvolvimento deste tecido. Embora, a epiderme abaxial, neste tratamento, apresentou as menores médias, não diferindo estatisticamente dos tratamentos 3, 4, 5, 6, e 7 (Tabela 29).

Tabela 29. Espessura média (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima aquífero e clorofiliano e número de estômatos (μm^2) em plantas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' cultivados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de TIBA.

Tratamentos	Epiderme adaxial	Parênquima aquífero	Parênquima clorofiliano	Epiderme abaxial	Número de estômatos
MS (T1)	26,902 a	77,114 f	177,366 g	6,724 c	2,892 b
MS + 1,0 BAP + 0,5 NAA (T2)	10,146 e	137,352 e	196,622 f	10,116 b	2,264 b
MS + 0,5 μM TIBA (T3)	15,868 c	206,800 c	176,968 g	8,426 c	4,532 a
MS + 1,0 μM TIBA (T4)	16,840 c	236,982 b	209,740 d	7,560 c	4,330 a
MS + 2,0 μM TIBA (T5)	19,564 b	206,002 c	245,594 c	7,484 c	4,930 a
MS + 4,0 μM TIBA (T6)	21,648 b	149,420 d	272,726 a	8,364 c	4,796 a
MS + 8,0 μM TIBA (T7)	20,498 b	297,500 a	253,052 b	6,984 c	4,262 a
MS + 16,0 μM TIBA (T8)	13,286 d	206,282 c	202,576 e	14,216 a	3,996 a

Médias seguidas da mesma letra (na vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott

A hiperhidricidade das plantas pode ter alterado o desenvolvimento das células da epiderme resultando em menor espessura da epiderme adaxial no tratamento 2. O tratamento 8 também apresentou resultado semelhante. Embora não tenha sido observada hiperhidricidade neste tratamento, a concentração de TIBA utilizada pode ter sido muito alta, refletindo em baixo desenvolvimento da epiderme adaxial. As plantas do T8 não se desenvolveram bem, sendo que a maioria oxidou e morreu após a primeira semana de cultivo.

Verificou-se em todos os tratamentos, a presença de tricomas tectores por toda a expansão da epiderme, em ambas as faces.

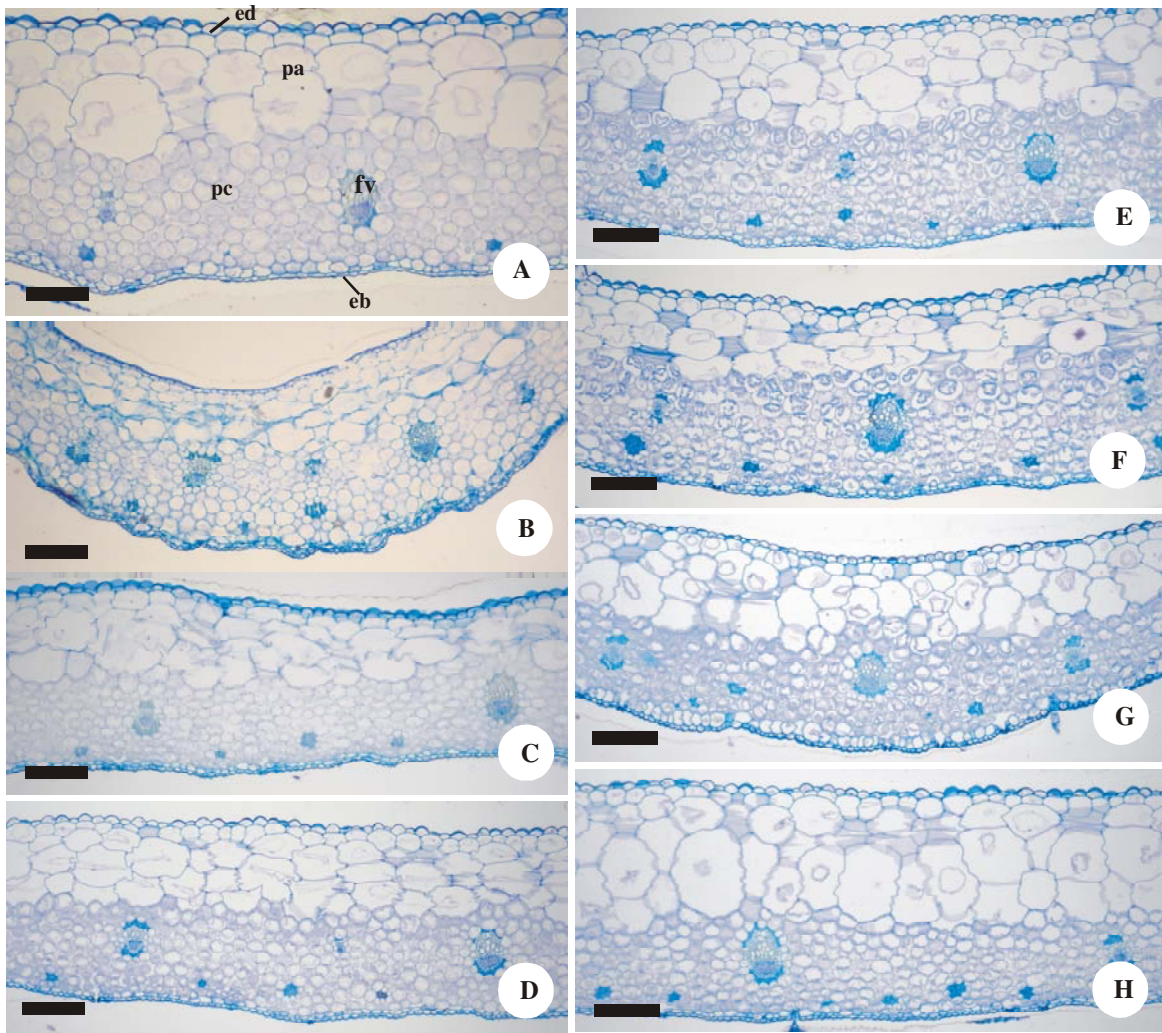
Analisando os tecidos do parênquima aquífero e clorofiliano, observa-se que a presença de TIBA, independentemente da concentração, aumentou a espessura destes tecidos, quando comparados com o tratamento 1 e 2 (Tabela 29 e Figura 22). Redução na espessura do parênquima clorofiliano de plantas cultivadas com diferentes reguladores vegetais foi descrito por Toma et al. (2004). Resultados contrários foram relatados por

Pasternak et al. (2005), ou seja, inibição da expansão das células do mesofilo e alterações no conteúdo de clorofila de *Arabidopsis thaliana* cultivadas na presença de TIBA.

Maior espessura (297,500 μm) do parênquima aquífero foi constatado em plantas cultivadas em meio MS com 8,0 μM TIBA (T7) seguido por T4 (MS + 1,0 μM TIBA) (236,982 μm), com 4 e 5 camadas. As plantas cultivadas apenas no meio MS apresentaram parênquima aquífero com 2 a 3 camadas e grande volume celular, quando comparadas aos outros tratamentos. Por outro lado, a espessura do parênquima clorofiliano deste tratamento não diferiu estatisticamente do tratamento com 0,5 μM TIBA (T3) (Figura 22C, D e G).

Observou-se no mesofilo do tratamento 2, células colapsadas (Figura 22B), possivelmente, devido à hiperhidricidade das plantas. Debergh e Maene (1984) citam que a hiperhidricidade pode modificar a constituição do mesofilo e em alguns casos o parênquima esponjoso ocupar todo espaço.

No estudo da epiderme abaxial, observou-se maior número de estômatos em plantas cultivadas com TIBA, mas não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 29). Não houve diferença entre o tratamento 1 e 2, apresentando menor número médio de estômatos por μm^2 . Sun et al. (1995) citam que os estômatos são estruturas fundamentais para as plantas porque através deles ocorrem os processos de troca gasosa. Portanto, qualquer variação em número e/ou tamanho destes pode acarretar uma maior ou menor eficiência da planta quanto à taxa fotossintética.



Figuras A-H. Corte transversal de folhas de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'. A. T1 - MS. B. T2 - MS + 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ NAA. C. T3 - MS + 0,5 µm TIBA. D. T4 - MS + 1,0 µm TIBA. E. T5 MS + 2,0 µm TIBA. F. T6 MS + 4,0 µm TIBA. G. T7 - MS + 8,0 µm TIBA. H. T8 - MS + 16,0 µm TIBA. (eb = face abaxial da epiderme; ed = face adaxial da epiderme; fv = feixe vascular; pa= parênquima aquífero; pc = parênquima clorofiliano). Barra = 150 µm.

4.3.4 Aclimatização

Após 60 dias de cultivo, as plantas restantes de cada tratamento foram aclimatizadas em substrato Plantmax[®], em casa-de-vegetação com nebulização intermitente. Apenas as plantas do tratamento 8 não foram aclimatizadas devido ao pequeno número de plantas sobreviventes à concentração de TIBA utilizada.

Houve 100% de sobrevivência das plantas, independentemente do tratamento (dados não apresentados), mostrando resultado superior ao encontrado por outros autores. Brotos de abacaxizeiro ‘Perolera’ e ‘Primavera’, enraizados ou não, com altura igual ou superior a 3 cm, apresentaram valores médios de 95,5% de sobrevivência (Guerra et al., 1999). Dal Vesco et al. (2001) verificaram a sobrevivência de 93,8% das plantas que foram transferidas para casa-de-vegetação com 7,0 cm de comprimento.

Esses resultados demonstram que o cultivar ‘IAC Gomo-de-mel’ pode ser facilmente aclimatizado nas condições deste experimento.

5. CONCLUSÕES

É possível a micropropagação de abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel' a partir de gemas da coroa. O meio de cultura mais adequado é o MS líquido associado a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, proporcionando boa taxa de multiplicação e menor porcentagem de hiperhidricidade.

A atividade da peroxidase é maior em plantas com alta taxa de multiplicação e em tecidos hiperhídricos.

As poliaminas isoladamente não induzem brotações em abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel', porém revertem a hiperhidricidade nas plantas, principalmente a putrescina. O aumento dos teores de poliaminas endógenas está relacionado com número e comprimento das brotações. A espermina aplicada exogenamente é fitotóxica à micropropagação do 'IAC Gomo-de-mel'.

Aumento na espessura dos tecidos foliares pode ser observado com a aplicação exógena de poliaminas.

O TIBA isoladamente não induz brotações em abacaxizeiro 'IAC Gomo-de-mel'.

A redução na atividade da IAA-oxidase está relacionada com a emissão de novas raízes.

Aumento na espessura dos tecidos foliares pode ver observado com a aplicação exógena TIBA, possibilitando melhor aclimatização com 100% de sobrevivência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, C.; PÉREZ-AMADOR, M.A.; CARBONELL, J.; GRANELL, A. The two ways to produce putrescine in tomato are cell-specific during normal development. **Plant Science**, v.168, p.1053–1057, 2005.

AL BARAZI, Z.; SCHWABE, W.W. The possible involvement of polyphenol-oxidase and the auxin-oxidase system in root formation and development in cuttings of *Pistacia vera*. **Journal Horticulturae Science**, v.59, p.453-461, 1984.

ALBERT, L.H.B. **Apectos morfo-anatômicos de mudas de abacaxizeiro “Smooth Cayenne” micropropagadas**. 2004. 60 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.363-366, 2000.

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, v.120, p. 470-475, 1974.

ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA, G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M.; COSTA, M.P.C.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.296-300, 2002.

ALTMAN, A.; NADEL, B.; FALASH, Z.; LEVIN, N. **Somatic embryogenesis in celery: induction, control, and changes in polyamines and proteins**. In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN ARRTRIJK, J. Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrech, p. 454-459, 1990.

AMARANTE, L.; COLARES, D. S.; MARIOT, M.P.; FORTES, G.R. L.; ZANELLA, F.; ALVES, A. Influências do ácido naftaleno acético e escuro e atividade da peroxidase no enraizamento *in vitro* de aspargo (*Asparagus officinalis* L.) **Revista Brasileira de Agrocência**, v.7 n.1, p. 4-9. jan-abr, 2001.

ARAÚJO, R. F.; SIQUEIRA, D. L.; COUTO, F. A. D'A.; SALOMÃO, L. C. C. Proliferação de brotos de abacaxi, *in vitro*, em concentrações de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Naftalenoacético (ANA). In: CONGRESSO Brasileiro de Fruticultura, 14., 1996, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 1996. 561p.

ARENA, M.E., PASTUR, G.M., BENAVIDES, M.P., ZAPPACOSTA, D., ELIASCO, E.; CURVETTO, N. Peroxidase and polyamine activity variation during the *in vitro* rooting of *Berberis buxifolia*. **New Zealand Journal of Botany**, v.41, p.475-485, 2003.

ARIGITA, L.; FERNÁNDEZ, B.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S. Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatisation and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43. p.161-167, 2005.

ASTARITA, L.V.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Botânica**, V.26, n.2, p.163-168, jun. 2003.

AUDUS, L. J. AND J. K. BAKHSHS. **On the adaptation of pea roots to auxins and auxin homologues**. In: Fourth International Conference on Plant Growth Regulation. Iowa State University Press, Ames. pp. 109-126, 1961.

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

BARCELÓ, A.R.; MUÑOZ, R. Peroxidases: their role in the control of plant cell growth. In: GASPAR, T.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Geneve: University of Geneve. 1982. p.71-91.

BEAUCHESNE, G. le miliex minéraux utilises en culture in vitro et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. **Acad. Agric.**, v.67, p.1389-1397, 1981.

BEFFA, R.; MARTIN, H.V.; PILET, P.E. *In vitro* oxidation of IAA by soluble IAA-oxidases and peroxidases from maize roots. **Plant Physiology**, v.94, p.485-491, 1990.

BELLE, N.A.; DALMOLIN, G.D.; FONINI, G.; RUBIN, M.A.; ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, v.1008, p.245-51, 2004.

BENKOVA, E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVA, D.; JURGENS, G.; FRIML, J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. **Cell**, v.115, p.591-602, 2003.

BESFORD, R.T.; RICHARDSON, C.M.; CAMPOS, J.L.; TIBURCIO, A.F. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. **Planta**, v.189, p.201-206, 1993.

BEZOLD, T.N.; LOY, J.B.; MINOCHA, S.C. Changes in the cellular content of polyamines in different tissues of seed and fruit of a normal and a hull-less seed variety of pumpkin during development. **Plant Science**, v.164, p.743-752, 2003.

BLAKESLEE, J.J.; PEER, W.A.; MURPHY, A.S. Auxin transport. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.494-500, 2005.

BLANCAFLOR, E.B.; MASSON, P.H. Plant gravitropism: unraveling the ups and downs of a complex process. **Plant Physiology**, v.133, p.1677-1690, 2003.

BLILOU, I.; XU, J.; WILDWATER, M.; WILLEMSSEN, V.; PAPONOV, I.; FRIML, J.; HEIDSTRA, R.; AIDA, M.; PALME, K.; SCHERES, B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. **Nature**, v.433, p.39-44, 2005.

BORNMAN, C.H.; VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*, **Physiologia Plantarum**, v.61, p.505-512, 1984.

BORTOLOTTI, C.; CORDEIRO, A.; ALCAZAR, R.; BORRELL, A.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T. Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants, **Physiologia Plantarum**, v.120, p.84-92, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.2482-54, 1976.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, v.16, n.2, p.173-175, 1981.

CABRAL, J. R. S.; CUNHA, G. A. P.; RODRIGUES, E. M. Micropropagação do abacaxizeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, V. Florianópolis, 1983. **Anais**. Florianópolis, SBF. v.5, p.124-7. 1984.

CASIMIRO, I., MARCHANT, A., BHALERAO, R., BEECKMAN, T., DHOOGHE, S., SWARUP, R., GRAHAM, N., INZÉ, D., SANDBERG, G., CASERO, P., BENNETT, M. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. **Plant Cell**, v.13, p.843–852, 2001.

CHATTOPADHAYAY, M.K.; TIWARI, B.S.; CHATTOPADHYAY, G.; BOSE, A.; SENGUPTA, D.N.; GHOSH, B. Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.192–199, 2002.

CHOI, Y.E.; KATSUMI, M.; SANO, H. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. **Plant Science**, v.160, p.1183–1190, 2001.

CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v.18, p.659-668, 1975.

COSTA, M.G.C.; ALVES, V.S.; LANI, E.R.G.; MOSQUIMA, P.R.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, v.100, p.63–74, 2000.

COUÉE, I.; HUMMEL, I. SULMON, C.; GOUESBET, G. El Amrani, A. Involvement of polyamine in root development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.1-10, 2004.

CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZ,L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H..R.C. **Abacaxi para exportação: aspectos técnicos da produção**. Embrapa/FRUPEX, 1994, p.41.

CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; ALMEIDA, M.; CROCOMO, O.J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agrícola**, v.52,n.3, p.604-614, 1995.

DAL VESCO, L.L.; PINTO, A.A.; ZAFFARI, G.R; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**, v.56, p.143–154, 2001.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: ed. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. New York: Kluwer Academic, p.1-11, 1990.

DAVIS, M.H.; SIMMONS, R. Far-red light reflected from neighbouring vegetation promotes shoot elongation and accelerates flowering in spring barley plants. **Plant Cell Env.**, 17:829-836, 1994.

DEBERGH, P.; MEANE L. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. **Parasitica**, v.40, p.69-75, 1984.

DEBIASI, C. Efeitos de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira *in vitro* cvs. Grand Naine (AAA), Nanicão (AAA) e Enxerto (AAB). Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). 2000, 96p. **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, Santa Catarina.

DESAI, H.V.; MEHTA, A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, v.119, p.45-53, 1985.

DINIZ, J.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**, v.27, n.4, p.934-938, 2003.

DROLET, G.; DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. **Phytochemistry**, v.25, p.367-371, 1986.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. , 2000, São Carlos. **Anais. . . São Carlos: UFSCar**. 2000. p. 255-258.

FIDELIS, A. **Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (Mama-Cadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Polyamine and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock, **Science**, v.217, p.1259–1261, 1982.

FOBERT P, R.; WEBB, D.T. Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. **Canadian Journal of Botany**, v.66, n.9, p.1734-1742, 1988.

FRÁGUAS, C.B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; CAZETTA, J.O. Micropropagation of fig (*Ficus carica*) ‘Roxo de Valinhos’ plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.40, n.5, p.471-474, 2004.

FRANK, T.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Protective enzymatic system against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L. raised in vitro, **Plant Growth Regulation**, v.16, p. 253-/256, 1995.

GALSTON, A. W.; L. Y. DALBERG. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. **Amer. J. Bot.**, v.41, p.373-380, 1954.

GALSTON, A.W. Polyamines as modulators of plant development, **BioScience**, v.33, p. 382–388, 1983.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Boston: Kluwer Academic, 1995. p.158-178.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiology**, v.94, p.406-410, 1990.

GASPAR, T.H., PENEL, C.L., THORPE, T. **Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève, Université de Genève, Centre de Botanique, 1982, 313p.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PASQUES M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONG, J.M.; DURZAN, D.J., (ed), **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, v.1, p. 152-166, 1984.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J. F.; BERTHON, J. Y.; RIPETTI, V. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. **Agronomie**, v.12, p.757-765, 1992.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J.F. **Indissociable chief factors in the nductive phase of adventitious rooting**. In: ALTMAN, A; WAISEL, Y. (eds) *Biology of root formation and development*. New York, Plenum Press, p.55-63, 1997.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acid peroxidases and significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, v.64, p.418-423, 1985.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. The technology. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. Part 1. 574p.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 and 2**. Exegetics Ltd., England. 1996.

GERLACH, G. **Botanische mikrotechnik, eine einfuhrung**. George Thieme, Stuttgart. 1969.

GOLDWORTHY, A.; RATHORE, K.S. Electrical control of *in vitro* plant tissue cultures the polar transport of auxin. **J. Exp. Bot.** v.36, p.1134-1141, 1985.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília-DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 183-260.

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

GRUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**, v.20, p.195–201, 1981.

HAISEL, D.; POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H.; ČATSKÝ, J.; WILHELMOVÁ, N.; PLZÁKOVÁ, S. Photosynthetic pigments and gas exchange of *in vitro* grown tobacco plants as affected by CO₂ supply. **Biologia Plantarum**, v.42, n.3, p.463-468, 1999.

HANZAWA, Y.; TAKAHASHI, T.; MICHAEL, A.J.; BURTIN, D.; LONG, D.; PINEIRO, M. ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. **Embo J**, v.19, p.4248–4256, 2000.

HAROLDO, D.; REINHARDT, R.C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, v.19, n. 195, p.13-19, 1998.

HAUSMAN, J.F. Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, v.13, p.263-268, 1993.

HAUSMAN, J.F.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots *in vitro*, and the adversary effect of spermidine. **Journal of plant physiology**, v. 146, n. 5-6, p.681-685, 1995.

HIRSCH, A.M.; FORTUNE, D. Peroxidase as markers of organogenesis and dioecism in tissue of *Actinia chinensis* L. Planchon cultured *in vitro*. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Geneve: Université du Genève, 1986, p.361-366.

HOOKER, M.P.; NABORS, M.W. Effect of TIBA in sugarbeet. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.84, p.237-246, 1997.

HOWELL, L.S.; CHE, P. Cytokinin and shoot development, **Trend Plant Sci.**, v.8, p. 453–459, 2003.

HRUBCOVÁA, M.; CVIKROVÁA, M.; EDERA, J.; ZON, J.; MACHÁČKOVÁA, I. Effect of inhibition of phenylpropanoid biosynthesis on peroxidase and IAA-oxidase activities and auxin content in alfalfa suspension cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.949–956, 2000.

HUANG, S.; DAI, Q.; PENG, S.; CHAVEZ, A.Q.; LOURDES, M.A; MIRANDA, L.; VISPERAS, R.M.; VERGARA, B.S. Influence of supplemental ultraviolet-B on indoleacetic acid and calmodulin in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Growth Regulation**, v.21, p.59–64, 1997.

HUTCHINSON, M.J.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P.K. Morphological and physiological changes during thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (pelargonium x hortorum bailey) hypocotyl cultures. **Int. J. Plant Sci.**, v.157, n.4, p.440-446, 1996.

INSTITUO AGRONÔMICO – IAC. Disponível em <<http://www.iac.sp.gov.br>> Acesso em 15 set. 2006.

ISHIKAWA, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. Another evidence for inhibitory effect of auxin in adventitious bud formation of decapitated flax (*Linum usitatissimum*L.) Seedlings. **J. Plant. Res.**, v.110, p.387-392, 1997.

JÄNNE, J.; ALHONEN, L.; PIETILA, M.; KEINÄNEN TA. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. **Eur J Biochem**, v.271, p.877–94, 2004.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. W.H. Freeman, San Francisco. 1962, 408 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book, New York. 1940, 523, p.

KADLECEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. in vitro grown plantlets. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1017–1024, 2003.

KAIRONG, C.; GENGSHEG, X.; XINMIN, L.; GENGMEI, X.; YAFU, W. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant Science**, v. 146, p.9-16, 1999.

KARABAGHLI-DREGON, C.; SOTTA, B.; BONNET, M.; GAY, G.; LE TACON, F. The auxin transport inhibitor 2,35-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, v.140, n.4, p.723-733, 1998.

KATAEVA, N.V.; ALEXANDROVA, I.G.; BUTENKO, R.G.; DRAGAVTCEVA, E.F. Effect of applied internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, n.2, p.149-154, 1991.

KAY, L.E.; BASILE, D. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. **Plant Physiology**, v.84, p.99-105, 1987.

KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.61, p. 69-74, 1984.

KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. **Biomedical and Life Sciences**, v.70, n.2, p.181-188, 2002.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. **Physiologic Vegétale**, v.24, n.6, p.647-653, 1986.

KING, R.A.; VAN STADEN, J. The metabolism of N⁶ (D₂-isopentenyl) [3H]adenine by different stem sections of *Pisum sativum*. **Plant Growth Regulation**, v.9, p.237-246, 1990.

KISS, E.; KISS, J. GYULAI, G.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, v.30, n.1, p.127-129, 1995.

KOUBOURIS, G.; VASILAKAKIS, M. Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar 'Bebecou'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.85, p.173-180, 2006.

LAI, C.C.; LIN, H.M.; NALAWADE, S.M.; FANG, W.; TSAY, H.S. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.355-361, 2005.

LAKSHMANAN, P.; LEE, C.L.; GOH, C.J. An efficient *in vitro* method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. **Plant Cell Reports**, v.16, p.572-577, 1997.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures for plant improvement, **Theor. Appl. Genet**, v.60, p.197-214, 1981.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The Effect of Cytokinins on Vitrification in Melon and Carnation. **Annals of Botany**, v.62, p.271-276, 1988.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v.56, n.1, 1999.

LIU, H.P.; DONG, B.H.; ZHANG, Y.Y.; LIU, Z.P.; LIU, Y.L. Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. **Plant Science**, v.166, p.1261-1267, 2004.

LIU, L. J.; ROSA-MARQUEZ, E.; LIZARDI, E. *In vitro* propagation of spineless Red Spanish pineapple. **Phytopathology**, St. Paul, v.12, n.77, p.17-21, 1988.

LIU, Z.H.; HSIAO, I.C.; PAN, Y.W. Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyls cuttings of soybean during root formation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.37, p.247-253, 1996.

LOMAX, T.L.; MUDAY, G.K.; RUBERY, P.L. **Auxin transport**. In: DAVIES, P.J. (Ed.), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Kluwer, Dordrecht, 1995, p. 509–530.

LOURO, R.P.; SANTIAGO, L.J.M.; SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* *E. urophylla* plants cultivated ex vitro in greenhouse and field conditions. **Trees**, v.17, p.11–22, 2003.

LOVAAS, E. Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. **Advance in Pharmacology**, v.38, p.119–149, 1997.

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

MAJADA JP, SIERRA MI, SANCHEZ-TAMES R. Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. **Science Horticulturae**, v.87, p.121–30, 2001.

MAKI, H.; ANDO, S.; KODAMA, H.; KOMAMINE, A. Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture. **Plant Physiology**, v.96, p.1008-1013, 1991.

MALÁ, J.; GAUDINOVÁ, A.; DOBREV, P.; EDER, J.; CVIKROVÁ, M. Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots **Biologia Plantarum**, v.50, n.1, p.8-14, 2005.

MALIK, S.K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, v.106, p.539–553, 2005.

MANTEDIOCA, S. **Estudo sobre o controle da brotação das gemas epífilas em *Bryophyllum calycinum***. Campinas: UNICAMP, 1996. 126f. Tese (Doutorado em Biologia). Universidade de Campinas. 1996.

MARCIANI-BENDEZÚ, J.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.12, n.1, p.35-39, 1990.

MARGA, F.; VEBRET, L; MORVAN, H. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.1-5, 1997.

MARTIN-TANGUY, J.; CARRE, M. Polyamines in grapevine microcuttings cultivated *in vitro*. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. **Plant Growth Regulation**, v.13, n.3, 1993.

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

MATO, M. C.; RÚA, M. L.; FERRO, E. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.84-88, 1988.

MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, A. da S. et al. Uso da cultura de tecidos no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.8, p. 2-5, 1988.

MEDEIROS, D. N.; MACÊDO, C. E. C.; ALLOUFA, M. A. I. Efeito do NaCl sobre a multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1,p.01-05, 2001.

MEHTA, A.M.; SAFTNER, R.A.; SCHAEFFER, G.W.; MATOO, A.K. Translational modification of an 18-kilodalton polypeptide by spermine in rice cell-suspension cultures. **Plant Physiology**, v.95, n.4, p.1294-1297, 1991.

MEHTA, R.A.; CASSOL, T.; LI, N.; ALI, N.; HANDA, A.K.; MATOO, A.K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. **Nature Biotechnology**, v. 20, p.613-618, 2002.

MENGOLI, M.; ROSSELL, P.; BAGNI, N. Effect of long term treatment on growth, bud formation and free amine and hydroxycynamoyl putrescina levels in leaf explants of *Nicotiana tabacum* cultivated *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.27, p.1-8, 1989.

MEUDT, W. J. AND K. J. STECHER. Peroxidase in *Xanthi tobacco* plants treated with auxins and benzoic acid derivatives. **Plant Physiology**, v.47, S4, 1971.

MÓGOR, G. **Compostos fenólicos e peroxidases em *Aloe vera* (L.) Burm. (babosa) micropropagada**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). 2005, 75 p. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

MOORE, G. A.; DeWALD, M. G.; EVANS Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 18**; High-Tech and micropropagation II. New York: Springer-Verlag. p. 461-70.1992

MOREIRA, M. A. ; PASQUAL, M.; ANJOS SOBRINHO, A. Indução à brotação das gemas de brotos estiolados *in vitro* de abacaxi cv. Pérola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16, 2000. Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 26.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia plantarum**, Rehovot, v.15, p.473-97, 1962.

MURKOWSKI, A. Heat stress and spermidine: effect on chlorophyll fluorescence in tomato plants. **Biologia Plantarum**, v.44, p.53–57, 2001.

NAIK, B.I., SHARMA, V., AND SRIVASTAVA, S.K., interaction between growth regulator and polyamine effects on membrane permeability, **Phytochemistry**, v.19, p. 1321–1322, 1980.

NAKANO, M.; SAKAKIBARA, T.; SUZUKI, S.; SAITO, H. Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lilium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor, 2,3,5-triiodobenzoic acid. **Plant Science**, v.158, P.129–137, 2000.

NOBRE J. In vitro cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.46, n.2, p.151-155, 1996.

NORMANLY, J. Auxin metabolism, *Physiologia. Plantarum*, v.100, p.431–442, 1997.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-373, 1964.

OHE, M.; KOBAYASHI, M.; NIITSU, M.; BAGNI, N.; MATSUZAKI, S. Analysis of polyamine metabolism in soybean seedlings using ¹⁵N-labelled putrescine. **Phytochemistry**, v.66, p.523–528, 2005.

OLMOS, E.; HELLIN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants, **Science Horticulturae**, v.75, p.91–101, 1998.

OLMOS, E.; PIQUERAS, A.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; HELLIN, E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydric leaves of regenerated carnation plants, **Plant Science**, v.130 p. 97-105, 1997.

OMOKOLO, N.D.; TITA, F.M.A.; NIEMENAK, N. Régénération directe *in vitro* de *Ananas comosus* (L.) Merrill var. Cayenne à partir de couronnes cultivées en milieu liquide. **Fruits**, v.56, p.415-421, 2001.

ORLIKOWSKA, T.; SABAOA, I.; KUCHARSKA, D.. The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. **Scientia Horticulturae**, v.85, p.103-111, 2000.

PAEK, K.Y.; HAN, B.H. Physiological characteristics of vitrified plantlets of *Gypsophyla paniculata* L. in vitro, **Kor. J. Plant Tiss. Cult.**, v.16, p.203–209, 1989.

PAEK, K.Y.; HAHN, E.J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip culture of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.36, n.2, p.128-132, 2000.

PANICOT, M.; MASGRAU, C.; BORRELL, A.; CORDEIRO, A.; TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T. Effects of putrescine accumulation in tobacco transgenic plants with different expression levels of oat arginine decarboxylase. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.281–287, 2002.

PAPADAKIS, A.K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death syndrome induced by the polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. **Planta**, v.220, p.826-837, 2005.

PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, S.H.; PARK, Y.M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.99, p.199–205, 2004.

PASTERNAK, T.; RUDAS, V.; POTTERS, G.; JANSEN, M.A.K. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.53, p.299–314, 2005.

PENEL, C.; DARIMONT, E.; GREPPIN, H.; GASPAR, T. Rôle du calcium dans l'asciation des peroxidases à des membranes de raciness de lentille. **Acad. Agric. Sér. D.** 289, p.29-33, 1979.

PEREZ-AMADOR, M.A.; CARBONELL, J. Arginine decarboxylase and putrescina oxidase in ovaries of *P. sativum*. **Plant Physiology**, n.07 p.865–872, 1995.

PEREZ-AMADOR, M.A.; LEON, J.; GREEN, P.J.; CARBONELL, J. Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 130, p.1454–63, 2002.

PESCADOR, R.; KOLLER, O. C. Propagação 'in vitro' do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, v.14, n.2, p.1-4, 1992.

PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. **Adv.Genet.**, v.30, p.41–75, 1992.

PHAN, C.T.; LETOUZE, R. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxinnamate: CoA activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*, **Plant Science Letters**, v.31, p.323–327, 1983.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C.; FIGUEIRA, M.L.; CAROLINO, S.M.B.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, E.A.M.; CARVALHO, C.R.; FONTES, E.P.B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, v.160, p.857–868, 2001.

PIQUERAS, A.; CORTINA, M.; SERNA, M.D. CASAS, J.L. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. **Plant Science**, v162, p. 671-678, 2002.

PIZA, I.M.T. **Bromelina e peroxidase em plantas de *Ananas comosus* L. Merrill, sob condições de salinidade “in vitro”**. 2000. 117p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Peroxidase em plântulas de abacaxi (*Ananas comosus*, L. Merr.) cultivadas *in vitro*. In: CONGRESSO SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 11, São Carlos, 1996, p.38. **Anais...** São Carlos: UFSC, 1996. plants, **Plant Cell Tiss. Org.**, v.46, p.151–155, 1996.

PREMKUMAR, A.; MERCADO, J.A.; QUESADA, M.A. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.835–840, 2001.

PRIYANKA, K.; RAO, I.U. *In vitro* rhizome induction and plantlet formation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. gigantea Bennet and Gaur by using growth regulators and sucrose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.85, p.211–217, 2006.

QADDOURY, A. AMSSA, M. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date Palm offshoots. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.127-131, 2004.

RADMANN, E.B.; BRAGA, E.J. B.; KARAN, M.A. L.; POSADA, M.A.C.; PETERS, J.A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n.3, p.171-175, 2001.

RAJAM, V.; BAJAJ, S. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. **Plant Physiology**, v.112, n.3, p.1343-1348, 1996.

RAKOVA, N.Y.; ROMANOV, G.A. Polyamines suppress manifestation of cytokinin primary effects. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.52, n.1, p.50-57, 2005.

RAWAL, S. K.; MEHTA, A. R. Changes in enzyme activity and isoperoxidases in haploid tobacco callus during organogenesis. **Plant Science Letters**. v.24, p.67-77, 1982.

- REGALADO, C.; GARCIA-ALMENDAREZ, B.E.; DUARTE-VANQUEZ, M.A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.2, p.243-256, 2004.
- REINHARDT, D.; FRENZ, M.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. **Development**, v.130, p. 4073-4083, 2003.
- REY, M.; TIBURCIO, A.F.; DÍASZ-SALA, C. RODRÍDUEZ, R. Endogenous polyamine concentrations in juvenile, adult and in vitro reinvigorated hazle. **Tree Physiology**, v.14, n.2, p.191-200, 1994.
- ROHWER, F.; MADER, M. The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Z. Pflanzenphysiol.** v.104, p.363-372, 1981.
- ROSS, J.J. Effects of transport inhibitors on gibberellins in Pea. **J. Plant Growth Regul.**, v.17, p.141-146, 1998.
- RUBERY, P.H. Auxin transport. In: DAVIES, P.J. (ed.): **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.1987, p.341-362.
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.120, n.1, p.152-161, 2004.
- SALEH, A.N. The effect of kinetin on the indolacético acid level and indolacético acid oxidase activity in roots of young plants. **Physiologia Plantarum**, v.51, p.399-403, 1981.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. Waadswoth Publishing Campany, Belmont, California, 682 p. 1992.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Fisiologia Vegetal**. México: Grupo Editorial Iberoamérica, 759 p, 1994.
- SANTANA, L.L de A.; REINHARDT, D.H.; CUNHA, G.A.P. da; CALDAS, R.C. Altas densidades de plantio na cultura do abacaxi cv. Smooth Cayenne, sob condições de sequeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.353-358, 2001.
- SANTOS, C. G. dos. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em *Coffea arabica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SCHMÜLLING, T. New insights into the functions of cytokinins in plant development, **Journal of Plant Growth Regulators**, v.21, p.40-49, 2002.

SCHOLTEN, H.J. Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micropropagation. **Scientia Horticulturae**, v.77, p.83-88, 1998.

SCOTT, E.A.; DHUNDY, R.B.; SUBHASH, C.M. Metabolism of polyamines in transgenic cells of carrot expressing a mouse ornithine decarboxylase cDNA. **Plant physiology**, v.116, p.299-307, 1998.

SERGIEV, I.G.; ALEXIEVA, V.S.; KARANOV, E.N. Cytokinin and anticytokinin effects on growth and free polyamine content in etiolated and green radish cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, v.145, p.266–270, 1995.

SERRET, M. D. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, n.1, p.1-16, 1996.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, v.160, p.1229-1235, 2001.

SINGH, S.K.; SYAMAL, M.M. Anti-auxin enhance *Rosa hybrida* L. micropropagation. **Biologia Plantarum**, v.43, n.2, p.279-281, 2000.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA – SIDRA. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em 15 set. 2006.

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

SMITH, M.A.; DAVIES, P.J. Separation and Quantitation of Polyamines in Plant Tissue by High Performance Liquid Chromatography of Their Dansyl Derivatives. **Plant Physiology**, v.78, p.89-91, 1985.

SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; ENDRES, L.; MERCIER, H. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.733–739, 2003.

STRABALA, T.J.; WU, Y.H.; LI, Y. Combined effects of auxin transport inhibitors and cytokinin: Alteration of organ development in tobacco. **Plant Cell Physiology**, v.37, n.8, p.1177-1182, 1996.

SUN, O. J.; SWEET, G. B.; WHITEHEAD, D.; BUCHAN, G. D. Physiological responses to water stress and waterlogging in nothofagus species. **Tree Physiology**, Victoria, v.15, n.10, p. 629-638, Oct. 1995.

SUTTER, E. G.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture, **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 12, p. 2896-2902, Dec. 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

TAKAO, K.; RICKHA, G.M.; HEGARDT, C.; OREDSSON, S.; PERSSON, L. Induction of apoptotic cell death by putrescine. **Int J Biochem Cell Biol**, v.38, p.621-62, 2006.

TANG, W.; NEWTON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p.386-395, 2004.

TANIMOTO, H.; MATSUBARA, Y.; ISHIOKA, N. Significance of Spermidine in the Initiation of Adventitious Buds in Stem Segments of *Torenia*. **Plant and Cell Physiology**, v.35, n.7, p.1071-1077, 1994.

TASSONI, A; FORNALE, S.; BAGNI, N. Putative ornithine decarboxylase activity in *Arabidopsis thaliana*: inhibition and intracellular localization, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.871-875, 2003.

TAVARES, A.R. **Poliaminas na micropropagação de *Aechmea distichantha* Lemaire**. 2000. 77 p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation, **Physiologia Plantarum**, v.100, p.664-674, 1997.

TIBURCIO, A.F.; CAMPOS, J.L.; FIGUERAS, X.; BESFORD, R.T. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.331-340, 1993.

TOLDI, O.; GYULAI, G.; KISS, J.; TAMÁS, I.A.; BALÁSZ, E. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Report**, v.15, p.851-854, 1996.

TOMA, I.; TOMA, C.; GHIORGHITA, G. Histo-anatomy and in vitro morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae). **Acta Bot. Croat.**, v.63, n.1, p.59-68, 2004.

TORRIGIANI, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; BAGNI, N. Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* Tuber. **Plant Physiology**, v.84, p.148-152, 1987.

TÓTH, S.; SCOTT, P.; SORVARI, S.; TOLDI, O. Effective and reproducible protocols for in vitro culturing and plant regeneration of the physiological model plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. **Plant Science**, v.166, p.1027-1034, 2004.

VAN HUYSTEE, R.B. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**, v.38, p.207-219, 1987.

VAZQUEZ, A.; MATO, M.C. Effect of hydroxybenzaldehydes on rooting and indole-3-acetic acid oxidase activity in bean cutting. **Physiologia Plantarum**, v.83, p.584-589, 1991.

VELIKOVA V, YORDANOV I, EDREVA A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v.151, p.59-66, 2000.

VENTURA, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro in vitro**. Viçosa, 1994. 111p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

VIOQUE, A.; ALBI, M.A.; VIOQUE, B. Role of IAA-oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Phytochemistry**, v.20, p.1473-1475, 1981.

VIU, A.F.M. **Organogênese e poliaminas em açafrão (*Curcuma longa* L.)**. 2000. 125 p. Tese (Doutorado em Horticultura) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

VOYIATZI, C.; VOYIATZIS, D.G.; TSIKMAKI, V. *In vitro* shoot proliferation rates of the rose cv. (hybrid tea) 'Dr. Verhage', as affected by apical dominance regulating substances. **Scientia Horticulturae**, v.61, p.241-249, 1995.

VYAS, S.; JOSHI, N.; TAK, K.; PUROHIT, S.D. *In vitro* adventitious shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Feronia limonia* L. (Swingle). **In vitro Cell, Development and Biology – Plant**, v.41, p. 296-302, 2005.

WALLACE, H.M.; FRASER, A.V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism, **Biochem. J.**, v.376, p.1-14, 2003.

WALTERS, D.; COWLEY, T.; MITCHELL, A. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. **J Exp Bot**, v.53, p.747-56, 2002.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMULLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.10487-10492, 2001.

WILLIAMS, R.R.; TAJI, A.M. Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. Black) in vitro shoot cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.26, p.1-6, 1991.

YADAV, M.K.; GAUR, A.K.; GARG, G.K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, n.153-156, 2003.

YE, B.; MULLER, H.H.; ZHAN, J.; GRESSEL, J. Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. **Plant Physiology**, v.115 p.1443-1451, 1997.

ZAFFARI, G. **Aspectos hormonais, estruturais e genéticos relacionados à micropropagação de gemas adventícias de *Musa acuminata* (AAA) cv. Grand Naine.** USP, São Paulo, SP. 112p. 1998.

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

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.) **Micropropagation – Technology and Application.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 45-79.

ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A.H. Factors influencing the production or hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.2, n.1, p.55-60, 1983.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v.161, p.537–548, 2001.