



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA –UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE PROCESSOS
REGENERATIVOS EM *Ananas comosus* var. *comosus* cv. PÉROLA**

Joyce Meire Gomes Ferreira

**Brasília, DF
Abril de 2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE PROCESSOS
REGENERATIVOS EM *Ananas comosus* var. *comosus* cv. PÉROLA**

Joyce Meire Gomes Ferreira

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Torres

Co-orientador: Prof. Dra. Dalva Graciano Ribeiro

Brasília, DF

Abril de 2009

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE PROCESSOS REGENERATIVOS
EM *Ananas comosus* var. *comosus* cv. PÉROLA**

Aprovado pela banca examinadora:

**Dr. Antônio Carlos Torres
Presidente
Embrapa Hortaliças**

**Dra. Neuza Maria de Castro
Membro titular
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Dr. Luis Pedro Barrueto Cid
Membro Titular
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

**Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral
Suplente
Universidade de Brasília**

Data da defesa: 24 de abril de 2009.

Dedico esse trabalho a minha mãe Wanda Gomes Ferreira, ao meu pai João Batista Ferreira e ao meu irmão Rodrigo Gomes Ferreira.

Quero sempre poder ter um sorriso estampando meu rosto, mesmo quando a situação não for muito alegre... E que esse meu sorriso consiga transmitir paz para os que estiverem ao meu redor. (Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus criador por minha existência, pelo amor que deposita em mim, por me fazer acreditar que sou capaz de realizar os meus sonhos e pela força espiritual sempre constante.

Aos meus pais pela estrutura familiar sempre constante, pelo amor incondicional, pelo apoio em todos os momentos, pelo exemplo de vida, por acreditar no meu potencial e me dar forças nos momentos difíceis.

Ao meu irmão pela eterna amizade, meu fiel escudeiro e protetor presente em todos os momentos da minha vida, por me apoiar e defender nas mais diversas situações.

À Universidade de Brasília por possibilitar a realização do mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo apoio para a realização das práticas de cultura de tecidos e por todo aprendizado na área de pesquisa e vivência.

Ao Dr. Antônio Carlos Torres pela prestatividade, atenção, dignidade e ética.

À Profa. Dra. Dalva Graciano Ribeiro pela co-orientação, pela prestatividade, pela amizade constante, por acreditar no trabalho desenvolvido, pelas sugestões e por todo o carinho durante a execução do trabalho.

Ao Pesq. Dr. João Batista Teixeira pela co-orientação, pelo apoio, pela acolhida, por seus ensinamentos e atenciosidade, além de contribuir com sua experiência profissional e de vida.

À Profa. Dra. Maria das Graças Machado pela amizade, prestatividade, por possibilitar a locação do apartamento como minha avalista e pelos mais diversos passeios.

À Profa. Dra. Lourdes Isabel Velho do Amaral pela grande amizade, pelos conselhos, pelos ensinamentos de vida, pelo profissionalismo, pelos auxílios prestados, por me mostrar como trabalhar com amor e dedicação, pelo exemplo de vida.

Ao Dr. Luis Pedro Barrueto pela amizade, pelo respeito ao meu trabalho, por todo o carinho, pelos grandes ensinamentos de cultura de tecidos, fisiologia vegetal, ética profissional, dignidade e vivência.

Ao Dr. Kazumitsu Matsumoto pela amizade, pelos auxílios e esclarecimentos sempre com muita presteza.

Ao meu eterno amigo Weliton José da Silva, meu pseudomarido, pela grande amizade, pelos diversos momentos vividos, pela perseverança e garra, pela dedicação, por sempre me apoiar e me levantar nos momentos difíceis, por me proporcionar as mais belas e doces lembranças durante a nossa vida acadêmica.

Aos colegas da Embrapa Cenargen, Bruna Araújo “Bruninha”, Larissa Tancredi “Lara”, Luciana Freire “Lú”, Laynhón Oliveira “Leãozinho”, Leonardo Soriano “Léo”, Marcelo Ferreira, Valkíria Lacerda “Val”, Felipe “Lipi”, Natália “Nat”, Ingrid, Gabriel, Tiago, André “Pig”, Ana Paula, Mônica, Andrea, Andréia Cruz, Gabriela “Gabi”, Fernanda “Fê”, Juliana “Jú”, Aline, Heloísa “Helô”, Arethusa “Arê”, pelos grandes e mais divertidos momentos, pelo apoio, incentivo e amizade.

Às funcionárias e colegas da Embrapa, Antônia, Francisca, Izabel e Marlene pela companhia, amizade, auxílio, prestatividade e boa convivência no trabalho.

Aos colegas doutorandos, Zé Geraldo Paiva, Nádia Somavilla e Sérgio Figueiredo pela amizade, pelo apoio moral e pelas orientações nas práticas de anatomia vegetal e ensinamentos em fisiologia vegetal.

Às colegas mestradas, Maria Raquel, Lilian Amaro, Thaina Lima pela amizade, boa convivência, pelos momentos de diversão e vida social, pelo apoio.

Ao colega mestrando Olegário, pela amizade, pelas orientações, pelos bons conselhos e pelo apoio.

Aos amigos de graduação da Universidade Federal de Goiás, Caroline, Climbiê, Wigney, que mesmo distante me apoiaram incondicionalmente, pelos auxílios prestados e amizade constante.

Às minhas amigas conterrâneas, Ingrid e Keila, pela amizade, preocupação e colaboração.

À todos aqueles que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização desse trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um estudo morfológico e anatômico sobre os processos regenerativos em explantes de bainha foliar e caule de abacaxizeiro cultivar Pérola cultivados *in vitro*. Para a indução de embriogênese somática, os explantes foram cultivados em meio básico composto de sais minerais MS, vitaminas de Gamborg e 3% de sacarose. A esse meio foi adicionado 20 μM de picloram. As culturas foram mantidas no escuro por 60 dias. Em seguida os explantes foram transferidos para meio básico com 10 μM de picloram onde permaneceram por mais 30 dias. Nos explantes de bainha foliar, a formação de calos primários tornou-se visível na região da nervura após 15 dias de cultivo. Após 30 dias, calos primários foram formados nos explantes. Depois 60 dias de cultivo, os calos começaram a apresentar uma textura friável em sua superfície. Com a redução da concentração de picloram, estruturas semelhantes aos embriões somáticos formaram-se após 30 dias de cultura. A formação de calos ocorreu da mesma forma nos explantes de discos caulinares, diferindo dos explantes provenientes da bainha foliar apenas na morfologia. As análises histológicas revelaram que a origem do calo se iniciou nas células parenquimáticas dos feixes vasculares. Células parenquimáticas próximas e externas à endoderme no caule também apresentaram divisão celular. Entretanto, as células parenquimáticas internas à endoderme permaneceram intactas. O processo de divisão e diferenciação celular levaram a formação de nódulos. O crescimento e desenvolvimento dos nódulos na direção centrífuga provocaram lise da epiderme abaxial e adaxial. Para indução de organogênese os explantes da bainha foliar e do caule foram mantidos em meio básico suplementado com 27 μM de ANA e 1 μM de BAP. As raízes adventícias foram formadas após um período de 45 dias de cultivo. Pela análise dos resultados, a origem dos nódulos ocorreu a partir de três fontes: as células da bainha do feixe vascular, o parênquima clorofiliano e em menor quantidade no parênquima aquíífero nos explantes da bainha foliar. Nos explantes de secções do caule, as células parenquimáticas externas à endoderme e à bainha dos feixes vasculares corticais iniciaram a formação dos nódulos. Com 15 dias de cultivo foram observados nódulos distribuídos no mesofilo e no córtex. Os nódulos originados de explantes de secções de caule apresentaram a formação de uma região medular e outra cortical, separadas por células com paredes espessadas e em processo de diferenciação. Aos 45 dias de cultivo observou-se, nos nódulos oriundos do caule, protoxilema e profloema, parênquima medular, periciclo, endoderme, parênquima cortical, exoderme e epiderme. Raízes adventícias formaram-se a partir dos nódulos.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a morphological and anatomical study of the regenerative processes in leaf base and stem sections explants of pineapple cultivar Perola cultivated *in vitro*. For somatic embryogenesis induction the explants were cultured in basal medium consisting of MS mineral salts, Gamborg's vitamins and 3% sucrose. This medium was supplemented with 20 μ M of pichloran. The cultures were kept in the dark for 60 days. After that period of time the explants were transferred to the basal medium with 10 μ M of pichloran where they remained for an additional 30 days. In basal leaves explants the formation of primary calli become visible in the vein region after 15 days in culture. After 30 days of culture, the primary callus were formed in the explants. After 60 days of culture, calli began to show a friable texture at their surface. With the reduction of the pichloran concentration somatic embryos like structures formed after 30 days. Callus formation occurred in the same manner in stem sections explants, differing from those of leaf base only in its morphology. The histological analysis disclosed that the callus initiated from parenchymatic cells of vascular bundles. Parenchymatic cells close to endodermis in stem section also showed cell division. However, parenchymatic cells in the inner endodermis stayed intact. The processes of cell division and differentiation led to nodule formation. The growth and development of nodules centripetally caused the lysis of both abaxial and adaxial epidermis. For organogenesis induction the leaf base and stem section explants were maintained in basal medium supplemented with 27 μ M of NAA and 1 μ M of BAP. Adventive roots were formed after 45 days of cultivation. The results analysis showed that in leaf base explants the nodules arose from three sources: parenchyma cells surrounding the vascular bundles, chlorophyllous parenchyma cells, and in minor quantity from aqueous parenchyma cells. In stem section explantes, the nodules arose from parenchymatic cells in the outer the endodermis and the parenchymatous cells around vascular bundles. Within 15 days of cultivation, nodules were observed in mesophyl and in the cortex. The nodules that arose from the stem section showed the medular and cortical regions separated by cells with thick walls in a process of differentiation. At 45 days of cultivation these nodules showed differentiation of protoxylem, protophloem, medular parenchyma, pericycle, endodermis, cortical parenchyma, exoderm and epiderm. Adventive roots were formed from the nodules.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Distribuição geográfica e Botânica	3
Morfologia e anatomia do abacaxizeiro	4
Problemas da abacaxicultura	5
Sistemas de propagação	6
<i>Convencional.....</i>	<i>6</i>
<i>Propagação in vitro</i>	<i>7</i>
<i>Propagação via gemas axilares</i>	<i>7</i>
<i>Propagação via organogênese</i>	<i>7</i>
<i>Propagação via embriogênese somática</i>	<i>8</i>
Estudos histológicos	9
Estudos histológicos	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Cultura de tecidos	10
Método histológico	11
RESULTADOS	12
Regeneração de tecidos embriogênicos	12
Anatomia da bainha foliar da planta controle.....	14
Análise anatômica do caule da planta controle.....	17
Alterações anatômicas na bainha foliar sob o efeito de 20 µM de Picloram.....	21
Alterações anatômicas na bainha foliar sob o efeito de 27 µM de ANA e 1 µM de BAP.....	25
Alterações anatômicas do caule sob o efeito de 20 µM de picloram.....	29
Alterações anatômicas no caule sob o efeito de 27 µM de ANA e 1 µM de BAP ..	33
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fonte de explante utilizado na indução de calos. A - Brotos com 8,0cm de altura regenerados de gemas axilares de abacaxi, cv Pérola, estabelecidas em meio B2.5N.6 gelificado com 90 dias de cultivo; B - Cortes transversais com cerca de 1,0mm de largura utilizados na indução de calos embriogênicos. Barra = 7,5 mm. 11

Figura 2. Calos primários formados em meio MS gelificado com 20 μM de picloram aos 30 dias de cultivo. A – calos primários provenientes de secções transversais do bainha foliar com 3-5mm de comprimento; B – Calos primários provenientes de discos caulinares com aproximadamente 1,0 mm de espessura. 13

Figura 3. Calo friável formado em meio básico com 20,7 μM de picloram aos 60 dias de cultivo (A) e estruturas similares aos embriões somáticos cultivados em meio básico com 10,35 μM de picloram, mantido no escuro por 90 dias (B-C). A – Calos friáveis formados em condições de escuro; B - Agrupamento de embriões apresentando orifício, vista frontal; B - Embrião se formando sob os calos embriogênicos, vista lateral. Barra = 500 μm ... 13

Figura 4. Explantes em meio de cultura aos 15 dias de cultivo (A), formação das protuberâncias (B) e broto regenerado aos 30 dias de cultivo (C). A – Explante sob influência de picloram apresentando alongamento do tecido; B – Explante apresentando a formação de protuberâncias na extremidade distal; C – Regeneração de brotos via organogênese direta. Barra = 3,0 mm. 14

Figura 5. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola evidenciando epiderme e estruturas do aparelho estomático. A – Epiderme uniestratificada (\rightarrow) das faces abaxial e adaxial; B – Epiderme uniestratificada (\rightarrow) apresentando estômatos nivelados (Et) e câmara subestomática (Cs). Barra = 50 μm 15

Figura 6. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola evidenciando tricoma glandular e parte do mesofilo. A – Tricoma glandular e o ponto de inserção do tricoma na epiderme; B – Tricoma peltado e o ponto de inserção do tricoma na epiderme; C – Mesofilo da região central apresentando hipoderme (**h**) nas faces abaxial e adaxial, parênquima clorofiliano (**pc**), parênquima aquífero (**pa**), feixes vasculares (**fv**) e cordões de fibras (**cf**). Barra = 50 μm 16

Figura 7. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola. A – Bainha foliares jovens apresentando ráfides (\rightarrow) nas células do parênquima aquífero; B – Feixe vascular colateral apresentando a bainha do feixe (**Bf**), tecido xilemático (**Tx**), tecido floemático (**Tf**) e esclerenquimático (**Te**). Barra = 50 μm 17

- Figura 8.** Corte transversal do caule de abacaxi Pérola, região basal. Periciclo formando vários feixes vasculares e migração dos traços foliares para região cortical (seta). Delimitação do cilindro vascular e lacunas nos locais de saída dos traços foliares. Endoderme (Ed) Barra = 100 μm 18
- Figura 9.** Corte transversal do caule de abacaxi Pérola, região apical. Presença de amiloplastos nas células parenquimáticas no cilindro vascular quanto no córtex. Delimitação da endoderme (Ed) e do periciclo (Pe). Bainha de feixe parenquimática circundando os feixes vasculares (pontas de seta). Barra = 100 μm 19
- Figura 10.** Corte transversal do caule de abacaxi Pérola, terço médio. Presença de ráfides nas células parenquimáticas (ponta de seta) e traços foliares na região cortical (seta). Barra = 100 μm 20
- Figura 11.** Cortes transversais da base do caule de abacaxi Pérola apresentando a formação das raízes adventícias. A – Vista geral do caule com quatro raízes adventícias (seta), uma gema lateral (ponta de seta) se formando e a base de um broto formado (**br**); B – Formação da raiz adventícia a partir do periciclo; C – Diferenciação das células para a formação da exoderme e epiderme da raiz; D – Raiz adventícia com exoderme e epiderme formada. Barra = 100 μm 21
- Figura 12.** Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola apresentando a formação de nódulos. A – Início de divisão celular na bainha do feixe, nas células parenquimáticas do mesofilo (ponta de seta) e nas células parenquimáticas associadas ao xilema e floema com núcleo proeminente (seta) e xilema (**x**) intacto aos 03 dias de cultivo; B – Desenvolvimento do nódulo e lise das demais células do mesofilo aos 06 dias de cultivo; C – Início das divisões celulares na região dos cordões de fibras (seta larga) e expansão gradual do nódulo aos 09 dias (seta). Barra = 50 μm 22
- Figura 13.** Cortes transversal (A) e longitudinal (B) da bainha foliar de abacaxi Pérola apresentando formação de nódulos entre os 12 e 15 dias de cultivo. A – Evidenciando a proliferação dos nódulos; B – Apresentando a proliferação dos nódulos (seta) e meristemóides (ponta de seta) em torno do feixe vascular. Barra = 50 μm 23
- Figura 14.** Cortes transversais dos nódulos formados a partir do décimo oitavo dia de cultivo. A – Evidenciando a expansão do nódulo; B – Crescimento dos nódulos em direção à epiderme abaxial. Barra = 50 μm 24
- Figura 15.** Cortes transversais do nódulo aos 30 e 60 dias de cultivo. A – Regiões concêntricas na porção central (seta e em detalhe) aos 30 dias de cultivo; B – Pequenos grupos de células poligonais aos 60 dias de cultivo. Barra = 50 μm 25

Figura 16. Corte transversal (A-C) e longitudinal (D) da bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP. A – Feixe vascular apresentando divisões periclinais e anticlinais na bainha do feixe, formando dois estratos de células; B – Células parenquimáticas adjacentes aos feixes vasculares em divisão (seta); C – Detalhe em feixe vascular evidenciando a bainha em divisão; D – Feixe vascular mostrando que a divisão se inicia na bainha e expandem para as demais células adjacentes. Barra =50 μm 26

Figura 17. Cortes transversais da bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP após 12 dias de cultivo. A – Mesofilo apresentando divisões em diversos planos e feixe vascular envolvido por uma segunda bainha de células com espessamento da parede (seta); B – Mesofilo com vários nódulos (ponta de seta). Barra =50 μm 27

Figura 18. Corte transversal (A) e longitudinal (B) da bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP após 30 dias de cultivo. A – Mesofilo apresentando estruturas similares a uma raiz, presença de tecidos vasculares (seta) e células parenquimáticas envolvendo o feixe vascular (ponta de seta); B – corte longitudinal da estrutura semelhante à raiz constituída de meristema apical (Ma), meristema fundamental (Mf), procâmbio (Pc), protoderme (*) e uma futura exoderme Ex). Barra =50 μm 28

Figura 19. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μM de picloram aos 3 e 6 dias de cultivo. A – Região mediana do caule apresentando as primeiras divisões em torno do feixe vascular e próximas à endoderme, região mais susceptível ao efeito da auxina; B – Região basal do caule apresentando a proliferação radial das células em divisão, próximo à endoderme (End). Barra =50 μm 29

Figura 20. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μM de picloram aos 9 dias de cultivo apresentando células com núcleo grande e citoplasma denso. A – Região mediana do caule apresentando o avanço das divisões em direção à epiderme; B – Feixe vascular da região cortical envolvido por uma intensa proliferação celular. Barra =50 μm 30

Figura 21. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μM de picloram aos 12 dias de cultivo. A – Região mediana do caule evidenciando as células em processo de diferenciação e espessamento da parede; B – Feixes vasculares do cilindro vascular em processo de divisão mitótica. Barra =50 μm 31

Figura 22. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μM de picloram aos 15 e 21 dias de cultivo. A – Formação de nódulos na região dos feixes vasculares corticais; B – Diferenciação e crescimento acelerado dos nódulos. Barra =50 μm 32

Figura 23. Cortes transversais do caule e calos sob o efeito de 20 μM de picloram após 30 dias de cultivo. A – Nódulos da região próxima à endoderme ainda dependentes do tecido

parental; B – Grupos de nódulo isolados do explante inicial; C – Detalhe do nódulo formado apresentando a região central com células meristemáticas maiores e a região periférica com células em processo de divisão mitótica. Barra =50 μm 33

Figura 24. Secções transversais caulinares sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP aos 03 dias de cultivo. A – Região do terço-médio apresentando a região cortical e o cilindro vascular com alterações estruturais; B – Detalhe do feixe vascular cortical mostrando as divisões periclinais e anticlinais das células parenquimáticas ao redor (ponta de seta). Pr - periciclo, Ed – endoderme; porções de divisão celular intensa (dci). Barra = 50 μm 34

Figura 25. Secções transversais caulinares sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP após 06 dias (A) e 09 dias (B) de cultivo. A – Detalhe de um feixe vascular apresentando intensa divisão celular, células com núcleo grande e xilema intacto (tx); B – Fileiras de células com deposição de celulose contornando a endoderme; C – Detalhe da região cortical, com as células de citoplasma denso e núcleo grande, resquícios de xilema (seta). Barra = 50 μm 35

Figura 26. Secções transversais caulinares sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP a partir de 15 (A) e 21 dias (B) dias de cultivo. A – Região do feixe vascular apresentando intensa divisão celular, células com núcleo grande, citoplasma denso e tecidos xilemáticos em processo de diferenciação (tx); B – Região cortical caulinar com meristemóides (ponta de seta) em formação e início de formação de uma gema lateral (seta larga). Barra = 50 μm 36

Figura 27. Cortes transversais das raízes formadas aos 30 dias (A - C) e 45 dias (D) de cultivo no tratamento com 27 μM BAP e 1,0 μM ANA. A – Início da diferenciação da raiz, com estabelecimento da zona medular (Zm), pólos de protoxilema (Ptx), células em processo de divisão (ponta de seta), endoderme (Ed), zona do parênquima cortical (Zc); B – Raiz adventícia em diferenciação apresentando pólos de protoxilema na zona medular (Ptx), periciclo (Pr), endoderme (Ed); C – Diferenciação do tecido de revestimento (Tr); D – Raiz adventícia evidenciando a diferenciação do parênquima cortical (PC), exoderme (Ex) e epiderme (Ep). Barra =50 μm 38

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr) é uma planta de clima tropical, monocotiledônea pertencente a família Bromeliaceae, cujo fruto é muito apreciado nos mercados interno e externo (Cunha *et al.*, 1999). A produção mundial dessa fruteira é em torno de 18,8 milhões de toneladas, em uma área estimada de 955,6 mil hectares (FAOSTAT, 2008). Dentre os países produtores de abacaxi o Brasil ocupa o primeiro lugar com uma produção de 1,6 milhões de toneladas em uma área plantada de 62 mil hectares. O perfil das regiões produtoras no país coloca a região Nordeste em primeiro lugar, com 43% da produção nacional, seguida pela região Sudeste com uma participação de 26% e da região Norte 21% (IBGE, 2008). No Nordeste a cultura assume grande importância social por ser fonte de emprego.

As principais variedades plantadas no Brasil são Smooth Cayenne e Pérola. A produção da variedade Smooth Cayenne é voltada principalmente para a comercialização de produtos industrializados e atender as exigências do mercado para exportação, enquanto que a produção da variedade Pérola se restringe ao mercado interno de frutas frescas, graças a sua polpa suculenta e saborosa (Giacomelli & Py, 1981; Giacomelli, 1982; Reinhardt *et al.*, 2000).

Apesar da sua expressão econômica, o agronegócio de abacaxizeiro enfrenta várias dificuldades. Um dos principais entraves à produção econômica, competitiva e auto-sustentável é a falta de genótipos resistentes à doenças, principalmente a fusariose. A suscetibilidade ao fungo da cultivar Pérola impede que o agricultor produza o seu próprio estoque de mudas. Se isso fosse possível, no caso de uma cultivar com resistência a essa doença, ainda que os preços das mudas fossem altos, os produtores poderiam, após adquirir as mudas, plantá-las e, na colheita, reservar um lote que seria utilizado como mudas para os plantios futuros visando a expansão da área ou comercialização de material propagativo.

Há demanda do setor produtivo de abacaxizeiro por tecnologia que visem maximizar a produção com menor custo de produção. Dentre as tecnologias a serem consideradas pela cadeia produtiva de abacaxizeiro destacam-se a produção de mudas micropropagadas livres de doenças como a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (Reinhardt & Cunha, 1982).

Trabalhos referentes a propagação *in vitro* de abacaxizeiro foram descritos por Aghion & Beauchesne (1960); Teo (1974); Pannetier & Lanaud (1976); Zepeda & Sagawa (1981) e DeWald *et al.* (1988). Com a demanda do setor por mudas com alta qualidade

fitossanitária a ênfase dos trabalhos visaram à produção de propágulos *in vitro* em grande escala (Be & Debergh, 2006; Mongollón *et al.*, 2004; Cruz, 2000; Albuquerque *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 1999; Barboza, 1999).

Na literatura consultada sobre a micropropagação do abacaxizeiro são incipientes os conhecimentos em relação à caracterização anatômica dos processos regenerativos. Esses estudos devem preceder as pesquisas da embriogênese e organogênese *in vitro*, em virtude de fornecer informações precisas sobre a origem do embrião ou órgão formado.

Os trabalhos relacionados com a descrição histológica em cultura de tecidos, geralmente, retratam embriogênese somática ou organogênese de dicotiledôneas, como café, eucalipto e batata-doce (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006; Trevizam, 2005, Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 1998). Outros descrevem estes mesmos processos em monocotiledôneas, representados pelas culturas: cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz (Jones & Rost, 1989; Guiderdoni & Demarly, 1988; McCain & Hodges, 1986; Magnusson & Bornman, 1984). Os estudos voltados para fruticultura estão concentrados principalmente para as culturas de *Citrus*, maracujá e banana (Moraes, 2003; Jayasankar *et al.*, 2003; Almeida, 2002; Mendes-da-Glória *et al.*, 2001; Filippi *et al.*, 2001; Apezato-da-Glória *et al.*, 1999).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de descrever a caracterização anatômica dos processos embriogênicos e/ou organogênicos *in vitro* em abacaxizeiro cv. Pérola.

REVISÃO DE LITERATURA

Distribuição geográfica e Botânica

Diferentes hipóteses têm sido sugeridas para a origem geográfica do gênero *Ananas*. Alguns autores acreditam que esse gênero é proveniente do continente Sul Americano na área entre os paralelos 15° a 30° de latitude Sul e 40° a 60° de longitude Oeste. Essa faixa compreende as regiões Central e Sul do Brasil, a Norte da Argentina e o Paraguai (Baker & Collins, 1939). Outros autores consideram o centro de origem dessa espécie a região compreendida entre 10° de latitude Norte a 10° de latitude Sul e 55° de longitude Leste a 75° longitude Oeste. (Leal & Antoni (1980 a,b). Simão (1971) considera o Brasil como o centro de origem do abacaxizeiro, sendo que a sua dispersão no continente americano ocorreu após a segunda viagem de Colombo em 1493. Assim, essa espécie é encontrada desde a América Central até o norte da Argentina, mostrando sua diversidade genética em termos de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (Giacomelli & Py, 1981).

O abacaxizeiro é uma monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à família Bromeliaceae, gênero *Ananas*. A maioria das espécies de Bromeliaceae é encontrada, em condições naturais, nas regiões tropicais e subtropicais da América, e poucas em zonas temperadas (Cunha *et al.*, 1999 e Reinhardt *et al.*, 2000). O *Ananas comosus* var. *comosus* é uma espécie da qual abrange todas as cultivares plantadas comercialmente no mundo, apresentando ampla variabilidade genética, com muitas formas cultivadas (Coppens & Leal 2003).

Os cultivares de maior interesse comercial no mundo são: Smooth Cayenne, Pérola, Singapore Spanish, Perolela, Red Spanish, Queen (Reinhardt *et al.*, 2000) e recentemente a variedade Gold (Cabral, 2004). Entretanto, a cultivar Smooth Cayenne do grupo Cayenne e Pérola do grupo Pernambuco são aquelas que se destacam nos plantios comerciais brasileiros devido ao sabor adocicado e facilidades no cultivo das mesmas.

A variedade Pérola representa aproximadamente 80% da produção nacional (Reinhardt *et al.*, 2000; Cabral, 2004), sendo o seu consumo preferencial in natura. Seu fruto tem o formato cônico, com casca amarela no amadurecimento, de polpa branca, com massa fresca de 1 Kg a 2 Kg, com elevado teor de açúcares e apresenta reduzida acidez, o que a torna agradável ao paladar brasileiro (Giacomelli & Py, 1981; Cunha *et al.*, 1999;

Cabral, 2004). Possui porte médio e crescimento ereto. As folhas tem cerca de 65 cm de comprimento e espinhos nos bordos. A coroa é grande. O pedúnculo é longo. Produz muitas mudas tipo filhote presas ao pedúnculo. A variedade Pérola mostrou-se mais tolerante à murcha associada à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* do que a Smooth Cayenne (Cabral, 2004), porém, também é susceptível à fusariose (Reinhardt *et al.*, 2000).

Morfologia e anatomia do abacaxizeiro

O sistema radicular das plantas propagadas comercialmente é constituído por raízes adventícias, apresentando uma distribuição superficial. Algumas raízes emergem da região internodal do caule na axila das folhas, e apresentam morfologia achatada, enrolando-se no caule (Collins, 1960). As raízes adventícias aparecem na região do cilindro vascular, que divide o córtex e a região central, e segue obliquamente para baixo em direção à epiderme (Krauss, 1949).

A porção aérea do caule é completamente coberta pelo arranjo de folhas em espiral enquanto que a porção abaixo do solo é coberta por um arranjo de raízes fibrosas (Krauss, 1948). A remoção das folhas e das raízes apresenta um caule clavado com tamanho entre 20 a 25 cm (Krauss, 1948; Collins, 1960; Reinhardt *et al.*, 2000), dividido em nós e entrenós, com gemas localizadas no ponto de inserção das folhas.

Internamente, o caule é dividido por um cilindro vascular que consiste de uma zona meristemática nas regiões jovens e tecidos vasculares nas regiões maduras (Krauss, 1948). Sendo assim, o caule é dividido em cilindro central e córtex. Na base do caule, o cilindro vascular é espesso e apresenta uma suberização dos elementos constituintes. Em outras regiões do caule, o cilindro vascular é interrompido para a passagem dos traços foliares. Krauss (1948) considera essas aberturas como espaços foliares. Os feixes vasculares estão distribuídos por todo o eixo caulinar, entretanto, os feixes são mais numerosos na região central do que no córtex. Os feixes vasculares são maiores, aparentemente ramificados e amplamente espaçados na porção central do caule enquanto que no córtex, os feixes são menores e agregados.

As folhas são estreitas e rígidas, dispostas em forma de calha, revestidas por cutículas e tricomas, além de possuir estômatos distribuídos regularmente na face inferior (Collins, 1960; Simão 1971). Estas folhas formam uma roseta densa em torno do caule e atuam como coletores de água, partículas de solo e materiais orgânicos como fragmentos de folha e insetos mortos (Krauss, 1948).

As folhas originam-se como projeções laterais na região de crescimento apical do caule (Krauss, 1949). A epiderme da folha é contínua com a epiderme caulinar. Imediatamente abaixo da epiderme encontram-se uma camada de células denominada hipoderme em ambas as faces da folha. Em seguida está o parênquima clorofiliano, o parênquima aquífero, feixes vasculares colaterais e cordões de fibras regularmente distribuídos pelo mesofilo.

O pedúnculo é a parte da planta que sustenta a inflorescência e o fruto, fazendo a conexão desses órgãos com caule (Collins, 1960).

A inflorescência é classificada como estiga e se inicia após a fase juvenil, sendo formada por flores sésses, distribuídas ao longo da haste. As flores são hermafroditas e localizadas na axila de uma bráctea (Py, 1969; Manica, 2000).

O fruto apresenta um formato cônico, sendo classificado como múltiplo devido a junção de 100 a 200 frutíolos individuais, sendo os frutos maiores na base e menores no ápice. O fruto geralmente atinge 15 cm de comprimento, tem polpa abundante, sucosa e de sabor agradável, quando atinge a maturação. Uma característica marcante da espécie é a ausência ou escassez de sementes (Cunha *et al.*, 1999). As mudas desenvolvem-se a partir de gemas axilares localizadas no caule (rebentões) e no pedúnculo (filhotes) (Reinhardt *et al.*, 2000).

Problemas da abacaxicultura

A baixa produtividade da abacaxicultura nacional é explicada pelos fatores ambientais adversos, problema fitossanitários, práticas culturais inadequadas e organização incipiente dos produtores (Reinhardt *et al.*, 2000).

Na abacaxicultura, sobretudo no caso da produção brasileira, o problema de pragas e doenças se agrava pelo simples fato do abacaxizeiro ser originário do Brasil, as pragas e doenças que o atacam encontram-se perfeitamente adaptadas às condições ecológicas das regiões produtoras e podem expressar todo seu potencial destrutivo (Cunha *et al.*, 1994c).

As doenças que mais afetam a abacaxicultura são: a fusariose, a podridão-negra, a podridão-da-base-da-muda, a podridão-das-raízes, a podridão-do-olho (Giacomelli & Py, 1981; Giacomelli, 1982; Cunha *et al.*, 1994a; Sanches, 2004). As pragas mais importantes para a abacaxicultura são a broca-do-fruto e a cochonilha. A incidência de pragas e doenças é maior em períodos chuvosos. A ocorrência de doenças fúngicas e bacterianas é favorecida pela alta umidade relativa do ar (Cunha & Souza, 2004).

A doença considerada de maior importância para os produtores de abacaxi é a fusariose, cujo agente causal é o fungo *Fusarium moniliforme* var *subglutinans*, encontrado nas principais regiões produtoras de abacaxi no país, caracterizado por provocar elevadas perdas (Reinhardt, 1980; Cunha *et al.*, 1995; Reinhardt *et al.*, 2000). O fungo pode infectar 40% das mudas e 30% dos frutos (Espinal Aguilar, 1981). O principal sintoma da fusariose é a exsudação de goma a partir da região infectada (Cunha *et al.*, 1995). Esta doença ataca todas as partes da planta, principalmente as mudas que se constituem no fator principal de sua disseminação (Reinhardt & Cunha, 1982; Cunha *et al.*, 1994c). A imersão das mudas em solução de defensivos antes do plantio mostram pouca eficácia em relação aos problemas existentes (Cunha *et al.*, 1994a).

Outro obstáculo encontrado na cultura de abacaxi é quanto ao número de mudas necessário para iniciar novos plantios, que também é dificultado pelo ataque dessas pragas e doenças, uma vez que para um ha é preciso obter mais de 20.000 mudas saudáveis (González-Olmedo *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 1994c).

Segundo Reinhardt *et al.*, (2000), dependendo da variedade e da metodologia empregada *in vitro* é possível obter 50.000 mudas em 18 meses, enquanto seriam necessários mais de sete anos para obter 32.000 mudas via método convencional.

Sistemas de propagação

➤ Convencional

A propagação do abacaxizeiro é feito por meio de mudas, destacando-se os tipos: coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão (Giacomelli, 1982; Cunha *et al.* 1994a; Reinhardt, 2004). A coroa é uma brotação que ocorre na região apical do fruto, o tipo filhote é oriundo do pedúnculo do fruto e os rebentões são originados a partir do caule da planta (Cunha & Reinhardt, 1994). A emissão de rebentões pode ser induzida mediante a eliminação do meristema apical. O filhote-rebentão é uma brotação na região de inserção do pedúnculo no caule. De acordo com Giacomelli (1982), a multiplicação do abacaxizeiro pode ser feita por meio de enviveiramento de secções do talo da planta.

➤ *Propagação in vitro*

A propagação *in vitro* pode ser conceituada como as técnicas de cultivo de células, tecidos ou órgãos de plantas, em meio nutritivo, em condições assépticas, com controle de luminosidade e temperatura. Esse método tem sido empregado para recuperação de plantas livres de doenças, conservação de germoplasma, propagação rápida de genótipos elite, produção de haplóides, transformação genética de plantas, dentre outras (Torres *et al.*, 2000; Be & Debergh, 2006; George *et al.*, 2008). Em adição, a produção de mudas pode ser contínua durante todo o ano independente das condições climáticas e pode ser feita em pequena área de laboratório. Também utiliza-se o termo micropropagação é usado para descrever os métodos *in vitro* de multiplicação de plantas (Be & Debergh, 2006).

❖ *Propagação via gemas axilares*

Trabalhos iniciais referentes a propagação *in vitro* de *Ananas comosus* var. *comosus* foram descritos por Aghion & Beauchesne (1960). Esses autores empregaram explantes de gemas axilares para início das culturas em meio constituído de sais minerais de Knop's, suplementado com 15% de água de coco. Posteriormente, outros pesquisadores empregando esse explante e distintas formulações de meio, também obtiveram sucesso na micropropagação dessa espécie (Teo, 1974; Pannetier & Lanaud, 1976; Zepeda & Sagawa, 1981; DeWald *et al.*, 1988).

Com a expansão do mercado de frutas tropicais houve uma demanda de tecnologias para aumentar tanto a qualidade quanto a produtividade das plantações de abacaxizeiro, principalmente com a multiplicação de variedades competitivas. Assim, vários trabalhos foram feitos sobre micropropagação *in vitro* dessa espécie (Barboza, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2000; Cruz, 2000; Mongollón *et al.*, 2004; Be & Debergh, 2006) visando a produção de mudas com alta qualidade fitossanitária e em grande escala.

❖ *Propagação via organogênese*

A organogênese é o processo de neoformação de partes aéreas ou raízes em cultura de calo ou outro explante (George *et al.*, 2008). Amin *et al.* (2005) conseguiram regenerar uma média de 90% de propágulos de abacaxizeiro via organogênese a partir de calos formados na base foliar. Essa estratégia possibilitou a micropropagação em larga escala de

abacaxizeiro cv. Giant Kew. Alternativamente, Teng (1997) desenvolveu um método de propagação alternativa de *Ananas* através da cultura de nódulos, regenerando brotos via organogênese.

Na organogênese direta, os explantes respondem ao estímulo dos reguladores de crescimento formando brotos ou raízes no tecido do explante, sem a necessidade de formação de calo para desencadear o processo (Carneiro *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 2003; Sripaoraya *et al.* 2003; Firoozabady & Moy, 2004). Quando há a formação de calos nos explantes antes da formação de brotos ou raízes, obtém-se a organogênese indireta (Teng, 1997; Firoozabady & Moy, 2004 e Hamasaki *et al.*, 2005).

Em abacaxizeiro, alguns autores utilizaram a organogênese como método de regeneração de brotos (Teng, 1997; Daquinta *et al.*, 1997; Sripaoraya *et al.* 2003; Firoozabady & Moy, 2004).

❖ ***Propagação via embriogênese somática***

A embriogênese somática é o processo no qual as células somáticas, sob condições indutivas, geram células embriogênicas, que através de uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, resultam na formação de embriões somáticos (Ammirato, 1983; Zimmerman, 1993; Guerra *et al.*, 1999). Este processo se assemelha à embriogênese zigótica, diferenciando-se apenas pelo fato de que, uma célula isolada ou um pequeno grupo de células somáticas são os precursores de embriões (Ammirato, 1983).

Os processos de regeneração via embriogênese somática e organogênese têm sido direcionados, principalmente, para transformação genética de plantas (Birch, 1997; Sripaoraya *et al.*, 2001a; Sripaoraya *et al.*, 2001b; Gómez-Lim & Litz, 2004; Yabor *et al.*, 2006). Daquinta *et al.* (1997) produziram embriões somáticos a partir de folhas jovens de brotos. Firoozabady *et al.*, (2006) utilizaram tecidos embriogênicos e grupos de células embriogênicas friáveis para regenerar plantas de abacaxizeiro transformadas via *Agrobacterium*. Espinosa *et al.* (2002) obtiveram a regeneração de plantas transgênicas usando calos. Já Sripaoraya *et al.* (2001b) produziram plantas transgênicas via bombardeamento de folhas. Geralmente, para a regeneração de plantas transgênicas são utilizados calos embriogênicos como tecido alvo.

Estudos histológicos

Na literatura consultada, nas últimas três décadas, constatou-se que alguns trabalhos objetivaram monitorar e descrever as características anatômicas das principais fases da regeneração. McDaniel *et al.*, (1982) estudaram a embriogênese e a organogênese de *Dactylis glomerata* L.; Vasil & Vasil (1982) descreveram os eventos morfológicos e histológicos na formação de embriões somáticos de *Pennisetum americanum*; Em milho, Vasil *et al.* (1984) acompanharam a formação de embriões somáticos e McCain & Hodges (1986) compararam a estrutura anatômica desses embriões somáticos com os zigóticos; Lee *et al.* (1997) observaram o efeito de diferentes composições de meio durante a iniciação da cultura embriogênica e a formação de embriões somáticos de banana (*Musa* spp.) mediante análises histológicas; Loiseau *et al.* (1998) examinaram a origem celular e a ontogenia de embriões somáticos de *Pisum sativum* L.; Apezato-da-Glória *et al.* (1999) estudaram a organogênese de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener observando a sequência de eventos que levaram à formação *de novo* de órgãos. Filippi *et al.* (2001a) avaliaram as mudanças histológicas que ocorreram durante a indução de embriogênese somática em explantes de banana cv. Nanicão sob diferentes auxinas. Filippi *et al.*, (2001b) descreveram variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de cultivares de bananeiras brasileiras, Nanicão Jangada e Grand Nain. Almeida (2002a) estabeleceu as condições *in vitro* para organogênese e transformação genética de laranja ‘Hamlin’, laranja ‘Pera’, laranja ‘Valência’, laranja ‘Natal’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) realizando a caracterização anatômica do processo. Lombardi (2003) realizando estudos histológicos e fisiológicos caracterizando a regeneração de *Passiflora cincinnata* MAST via organogênese direta e indireta. Nikam *et al.*, (2003) descreveram a histologia da embriogênese somática e o potencial de regeneração de *Agave sisalana* Perr. ex. Engelm. Moraes (2003) comparou o processo de embriogênese somática entre *Citrus sinensis*, var. Valência e *Citrus limonia*, var. Limão cravo via análises histológicas, histoquímica e expressão gênica.

Alguns trabalhos apresentaram a descrição da embriogênese somática de *Ananas* (Firoozabady *et al.*, 2006; Daquinta *et al.*, 1997) e até mesmo a formação de calos, outros relataram a formação e o desenvolvimento de brotações *in vitro* (Teng, 1997; Firoozabady & Gutterson, 2003; Mercier *et al.*, 2003; Hamasaki *et al.*, 2005;) ou compararam a estrutura foliar de abacaxizeiro micropropagado e cultivado em casa de vegetação, verificando apenas plasticidade fenotípica (Barboza *et al.*, 2006; Batagin *et al.*, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de tecidos

Os experimentos envolvendo cultura de tecidos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen). O material vegetal utilizado foi proveniente de coroas de abacaxi obtidas em ponto comercial local e no banco de espécies cultivadas da Embrapa Cenargen. Para a desinfestação das coroas, as folhas foram removidas delicadamente e as coroas com as gemas axilares intactas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,4% acrescido de 3 gotas de Tween por 15 minutos e, em seguida, lavadas por três vezes com água destilada estéril, sendo que na última lavagem o material ficou em descanso por aproximadamente 05 minutos (Teixeira, 2006).

Com o auxílio de uma lupa, cortes tetraédricos foram realizados para remoção das gemas axilares em uma capela de fluxo laminar. Cerca de 20 gemas axilares foram extraídas de cada coroa, medindo aproximadamente 3,0 mm.

As gemas foram colocadas em meio básico composto de sais minerais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitamina B5 (Gamborg *et al*, 1968), 3,0% de sacarose. A esse meio foram adicionados 2,5 μM de 6-benzylaminopurina (BAP) e 0,5 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA), de acordo com metodologia proposta por Teixeira (2006). O pH foi ajustado para 5,7-5,8. O meio foi gelificado com 0,24% de Phytigel[®]. Para o alongamento das brotações foi utilizado somente o meio básico sem adição de reguladores de crescimento. Os propágulos (brotos) foram individualizados e inoculados em tubos de ensaio contendo 20mL de meio, os quais foram selados com filme de PVC. O cultivo foi contínuo sob temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$; $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância e fotoperíodo de 14 horas até os brotos alcançarem 5,0 a 8,0cm de comprimento.

Segmentos da bainha foliar e secções transversais do caule com cerca de 1,0mm de largura (Fig. 1A) foram excisados de propágulos com aproximadamente 5,0 cm de altura (Fig. 1B) e inoculados, respectivamente, em meio de indução de embriogênese somática e organogênese.

Para a embriogênese somática, o meio de indução consistia em meio básico suplementado com 20,7 μM de picloram. Após 30 dias de cultivo, avaliou-se a formação de calos primários e as culturas foram transferidas para meio de idêntica composição por

um período adicional de 30 dias, no final do qual os calos foram repicados para novo meio com 10,35 μM de picloram e as culturas mantidas no escuro por 30 dias.

Para a organogênese, o meio de indução foi o meio básico suplementado com 27 μM de ANA e 1 μM de BAP por um período de 45 dias de acordo com metodologia descrita por Firoozabady & Moy (2004).

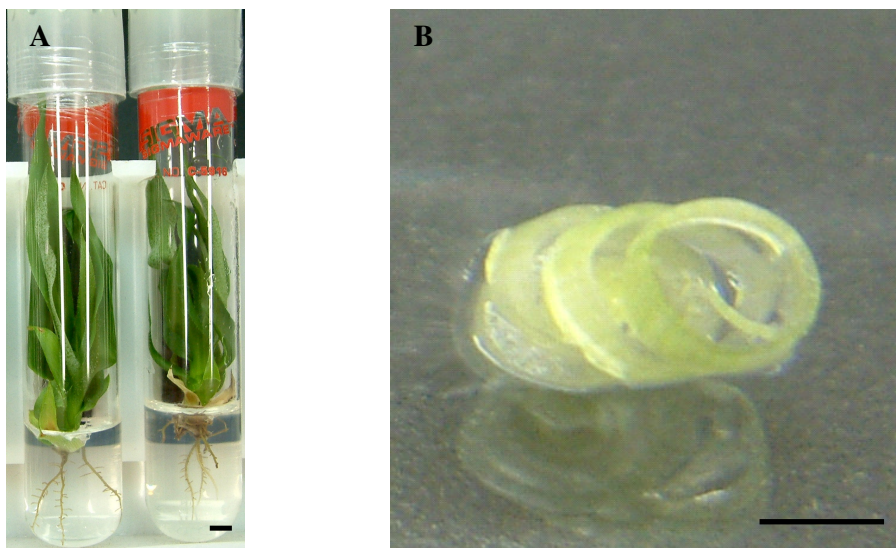


Figura 1. Fonte de explante utilizado na indução de calos. A - Brotos com 8,0cm de altura regenerados de gemas axilares de abacaxi, cv Pérola, estabelecidas em meio B2.5N.6 gelificado com 90 dias de cultivo; B - Cortes transversais com cerca de 1,0mm de largura utilizados na indução de calos embriogênicos. Barra = 7,5 mm.

Método histológico

Para a análise anatômica, oito a dez segmentos da bainha foliar e discos caulinares foram retirados de plantas desenvolvidas *in vitro* (controle) e fixados. Para o material desenvolvendo em meio com reguladores de crescimento, cinco amostras aleatórias de explantes e tecidos em proliferação foram retirados a cada 03 dias de cultivo até completar 30 dias, totalizando 10 amostragens. O material foi fixado em FPA 50 (formaldeído: ácido propiônico: etanol 50%, 2:1:17 (v/v)) por 12 horas (Berlyn & Miksche, 1976 apud Kraus & Arduin, 1997). A seguir, as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente (Johansen, 1940). Para infiltração e emblocagem das amostras utilizou-se o kit Historesin (hidroxietilmetacrilato, Leica Heidelberg). Em seguida, cortes histológicos com 10 μm de

espessura foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM 2145. Estes foram afixados em lâminas histológicas e submetidos aos corantes fucsina básica 1%, azul de toluidina 1% e safranina a 1% (Roeser, 1972 modificado apud Kraus & Arduin, 1997) e montados em resina sintética (Paiva *et al.* 2006).

Secções à mão livre do caule e da bainha foliar também foram realizadas, com auxílio de lâmina de barbear, na região basal da folha excisada de plantas desenvolvidas *in vitro*. As secções obtidas foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,25%, durante 15 minutos e, em seguida, transferidos para solução de hipoclorito de sódio a 1,25%, durante 10 minutos. Após a despigmentação, as secções foram lavadas em água destilada por 5 vezes e transferida para etanol 50% durante 60s. Em seguida, os cortes foram submetidos ao processo de dupla coloração com solução de azul de alcian/safranina, na proporção 4:1. Posteriormente, os cortes foram lavados em etanol comercial por três vezes, diafanizados em acetato de butila e montados em resina sintética (Paiva *et al.* 2006). Para documentação do material analisado, foram feitas fotos ao fotomicroscópio Axioskop Zeiss utilizando-se do programa Motic Images Plus 2.0.

RESULTADOS

Regeneração de tecidos embriogênicos

No sistema embriogênico desenvolvido foram obtidos calos proliferativos a partir dos segmentos da bainha foliar (Fig. 2A) e dos discos caulinares (Fig. 2B). Os calos primários se formaram aos 30 dias de cultivo e apresentavam elevado grau de crescimento, coloração creme e superfície lisa. Os calos provenientes da bainha foliar tinham formato alongado enquanto que os calos provenientes do caule apresentavam o formato globular.

Aos 60 dias de cultivo formaram-se calos friáveis (Fig. 3A) em ambos explantes, potencialmente regeneráveis. Estes apresentavam textura friável e coloração creme-claro. Após a redução da concentração de picloram para 10 μ M, formaram-se algumas estruturas semelhantes aos embriões somáticos (Fig. 3B-C).

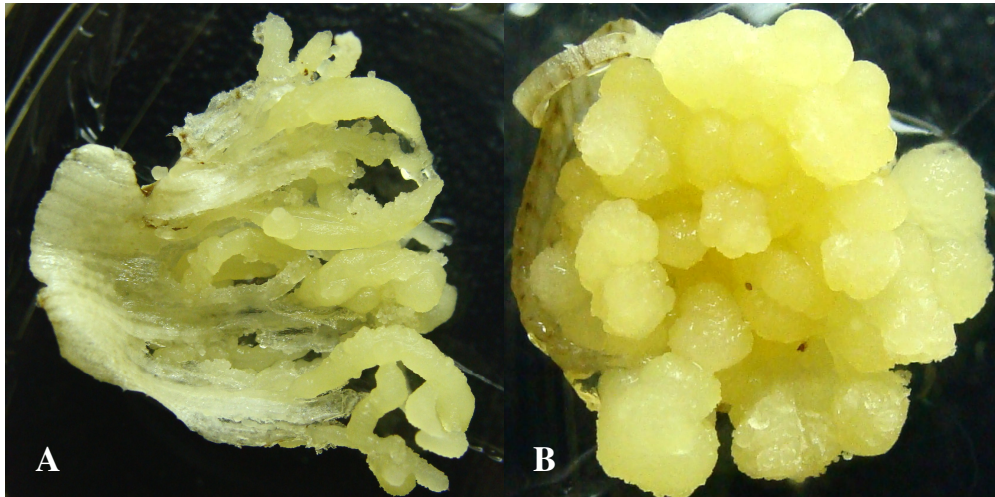


Figura 2. Calos primários formados em meio MS gelificado com 20 μM de picloram aos 30 dias de cultivo. A – calos primários provenientes de secções transversais do bainha foliar com 3-5mm de comprimento; B – Calos primários provenientes de discos caulinares com aproximadamente 1,0 mm de espessura.

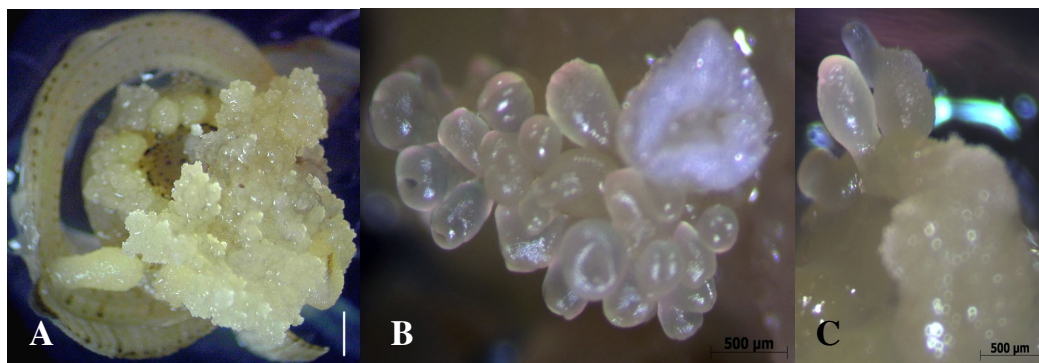


Figura 3. Calo friável formado em meio básico com 20,7 μM de picloram aos 60 dias de cultivo (A) e estruturas similares aos embriões somáticos cultivados em meio básico com 10,35 μM de picloram, mantido no escuro por 90 dias (B-C). A – Calos friáveis formados em condições de escuro; B - Agrupamento de embriões apresentando orifício, vista frontal; B - Embrião se formando sob os calos embriogênicos, vista lateral. Barra = 500 μm .

Regeneração de tecidos organogênicos

Aos 15 dias de cultivo foi possível observar o alongamento do explante proveniente da bainha foliar (Fig. 4A) e, posteriormente, a formação de protuberâncias (Fig. 4B). A regeneração indireta de raízes e brotos (Fig. 4C) foi obtida em meio MS contendo 27 μM de ANA e 1 μM de BAP de acordo com Sripaoraya *et al.* (2003) aos 30 dias de cultivo.

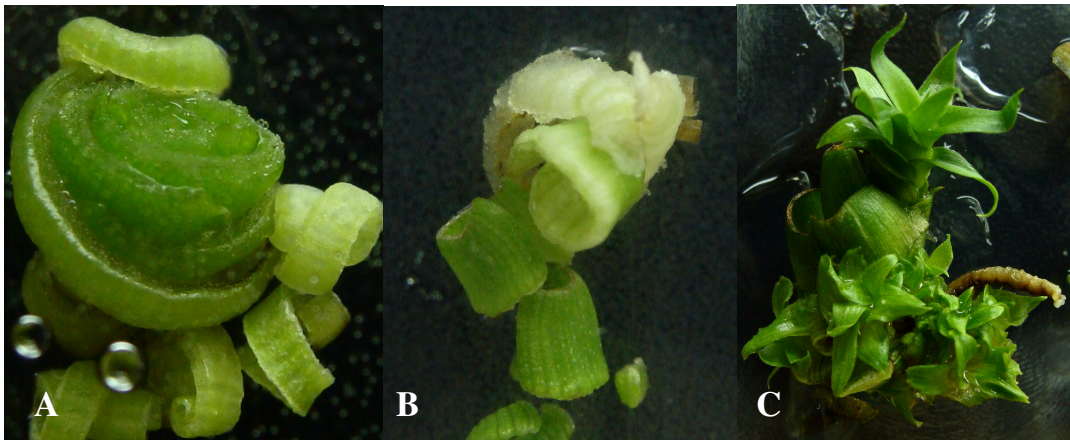


Figura 4. Explantes em meio de cultura aos 15 dias de cultivo (A), formação das protuberâncias (B) e broto regenerado aos 30 dias de cultivo (C). A – Explante sob influência de picloram apresentando alongamento do tecido; B – Explante apresentando a formação de protuberâncias na extremidade distal; C – Regeneração de brotos via organogênese direta. Barra = 3,0 mm.

Anatomia da bainha foliar da planta controle

A estrutura anatômica da bainha foliar cultivada em meio para alongamento isento de reguladores é observada na Fig. 5A. Observa-se a epiderme uniestratificada, que apresenta células epidérmicas comuns pequenas, de diferentes tamanhos e aproximadamente retangulares, tanto na face abaxial quanto na adaxial. Os estômatos estão distribuídos em sulcos paralelos por toda extensão da face abaxial da folha e são nivelados em relação às demais células epidérmicas (Fig. 5B). Os estômatos apresentam câmaras subestomáticas pequenas.

Tricomas glandulares multicelulares (Fig. 6A) e tricomas peltados (Fig. 6B) estão presentes na epiderme da face adaxial e abaxial das folhas, sendo que na face abaxial,

ocorrem em maior quantidade. Observa-se inserção relativamente profunda do tricoma, formando uma invaginação na epiderme, a sua distribuição é regular. Constata-se a hipoderme sob a epiderme de ambas as faces da folha, formada por um ou dois estratos de células aclorofiladas e isodiamétricas (Fig. 6C).

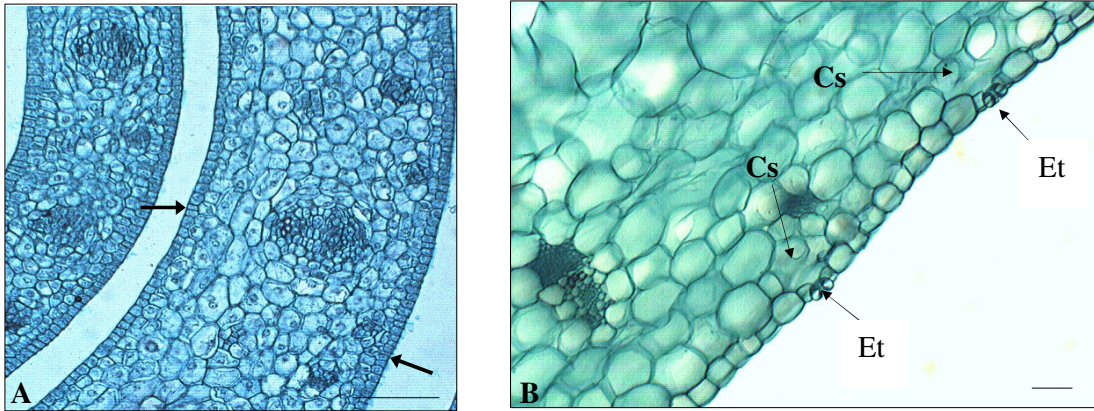


Figura 5. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola evidenciando epiderme e estruturas do aparelho estomático. A – Epiderme uniestratificada (→) das faces abaxial e adaxial; B – Epiderme uniestratificada (→) apresentando estômatos nivelados (Et) e câmara subestomática (Cs). Barra = 50 μ m.

O mesofilo apresenta células de parênquima clorofiliano na face adaxial, são arredondadas, com espaços intercelulares (Fig. 6B), seguido por parênquima aquífero com células de formato arredondado, porém, bem maiores com dois ou três estratos de células (Fig. 6B) próximo à face abaxial. Entretanto, é homogêneo na região do bordo foliar. Constatam-se ráfides nas células do parênquima aquífero (Fig. 7A).

Os feixes vasculares são colaterais (Fig. 7B) de tamanho variado e apresentam grande quantidade de fibras junto ao floema e ao xilema. Os feixes vasculares estão distribuídos regularmente na região do eixo central da folha e são encontrados em maior intensidade na região do bordo foliar (Fig. 6B). A bainha do feixe vascular é simples formada por apenas um estrato de células parenquimáticas (Fig. 6B; Fig. 6B). Observam-se também cordões de fibras distribuídos por todo o parênquima clorofiliano (Fig. 6B).

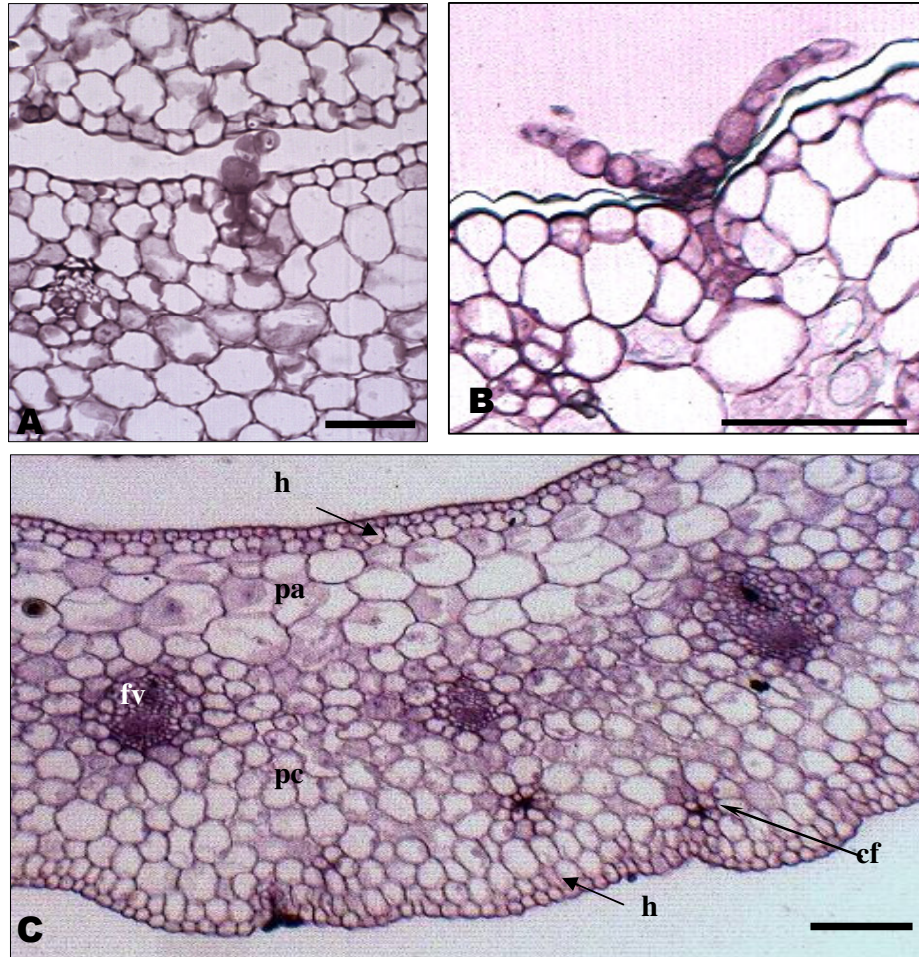


Figura 6. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola evidenciando tricoma glandular e parte do mesofilo. A – Tricoma glandular e o ponto de inserção do tricoma na epiderme; B – Tricoma peltado e o ponto de inserção do tricoma na epiderme; C – Mesofilo da região central apresentando hipoderme (**h**) nas faces abaxial e adaxial, parênquima clorofiliano (**pc**), parênquima aquífero (**pa**), feixes vasculares (**fv**) e cordões de fibras (**cf**). Barra = 50 μ m.

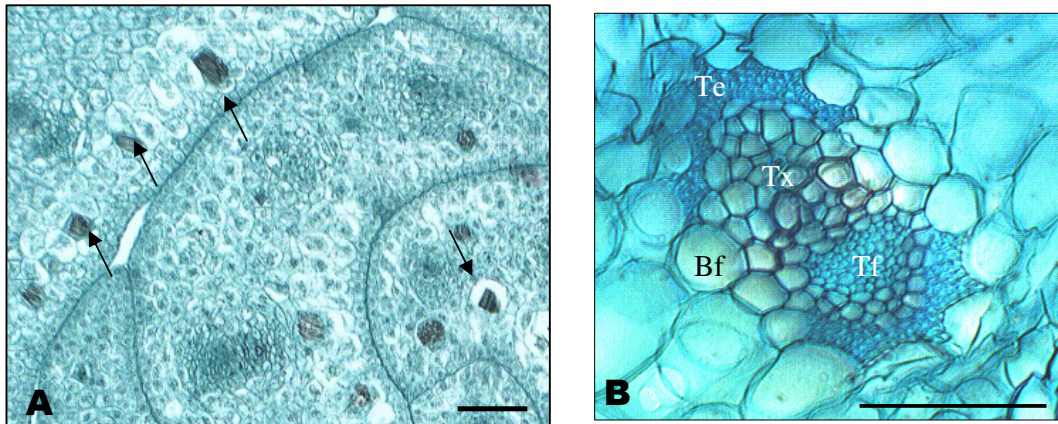


Figura 7. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola. A – Bainha foliares jovens apresentando ráfides (→) nas células do parênquima aquífero; B – Feixe vascular colateral apresentando a bainha do feixe (**Bf**), tecido xilemático (**Tx**), tecido floemático (**Tf**) e esclerenquimático (**Te**). Barra = 50 µm.

Análise anatômica do caule da planta controle

A estrutura anatômica do terço-médio caulinar de plantas cultivadas *in vitro*, em meio isento de reguladores pode ser examinada na Fig. 8. Em toda sua extensão, a epiderme é uniestratificada e as células epidérmicas comuns são pequenas. As células do parênquima cortical são grandes e isodiamétricas, algumas apresentam amido (Fig. 9) e outras contêm ráfides (Fig. 10). Nesta região, há muitos espaços intercelulares e os traços foliares migrando à periferia do córtex (Fig. 8). O cilindro vascular é delimitado por células endodérmicas que apresentam espessamento da parede bastante evidente (Fig. 8; 9 e 10 - Ed). Internamente à endoderme, encontra-se o periciclo, apresentando dois ou três estratos de células, indicando o processo de divisão, que originará novos feixes vasculares. Quando ocorre o processo de migração dos traços foliares, ocorre a formação de uma lacuna no cilindro vascular para a passagem dos mesmos seguidos pela restauração do cilindro vascular. A parte interna do cilindro vascular apresenta feixes vasculares colaterias de origem procambial, estes são delimitados pela bainha do feixe (Fig. 8; 9 e 10). As células parenquimáticas que preenchem a região do cilindro vascular são menores que as corticais,

contudo, não apresentam padrão isodiamétrico e os espaços intercelulares geralmente são maiores.

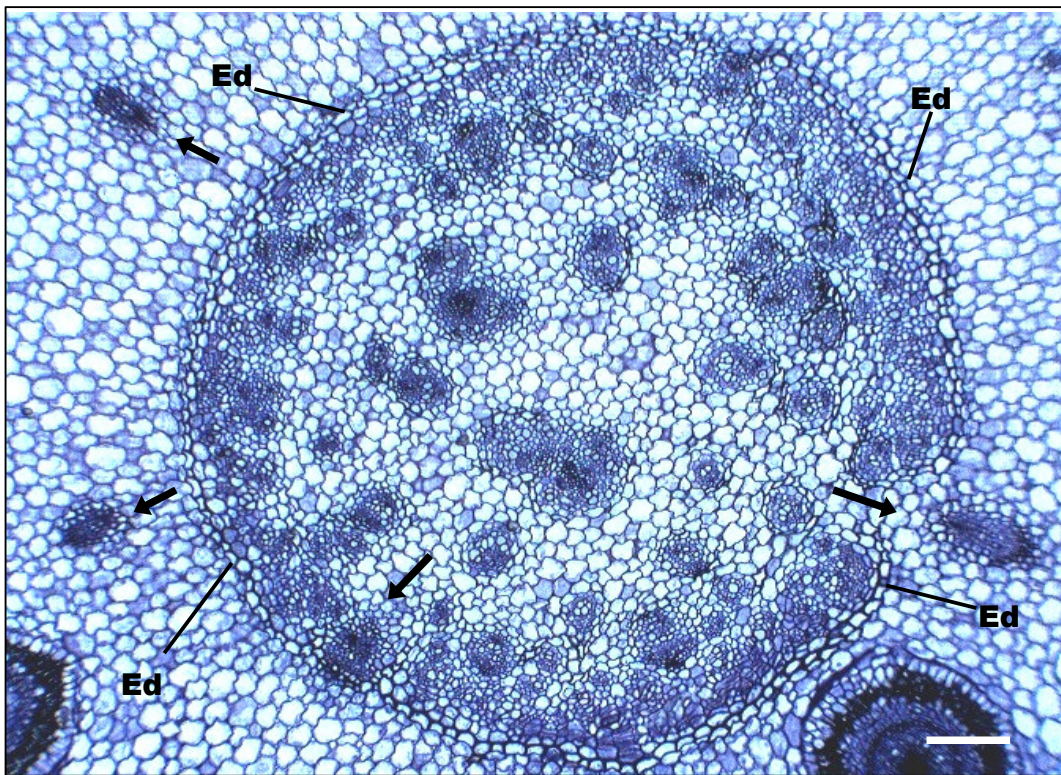


Figura 8. Corte transversal do caule de abacaxi Pérola, região basal. Periciclo formando vários feixes vasculares e migração dos traços foliares para região cortical (seta). Delimitação do cilindro vascular e lacunas nos locais de saída dos traços foliares. Endoderme (Ed) Barra = 100 μ m.

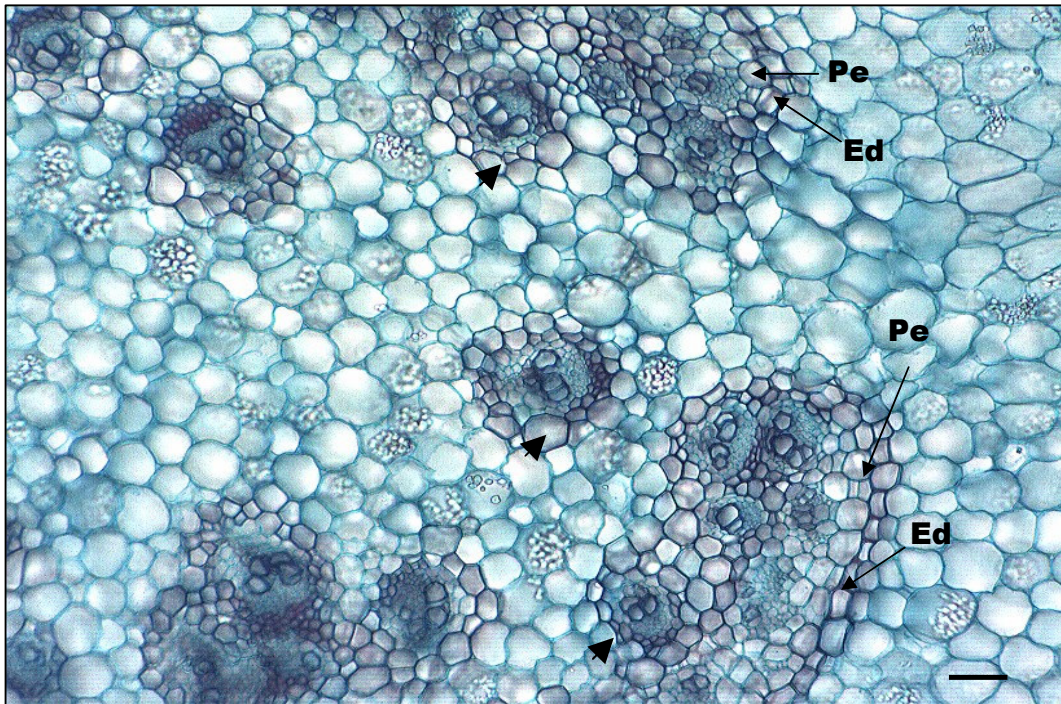


Figura 9. Corte transversal do caule de abacaxi Pérola, região apical. Presença de amiloplastos nas células parenquimáticas no cilindro vascular quanto no córtex. Delimitação da endoderme (Ed) e do periciclo (Pe). Bainha de feixe parenquimática circundando os feixes vasculares (pontas de seta). Barra = 100 μ m.

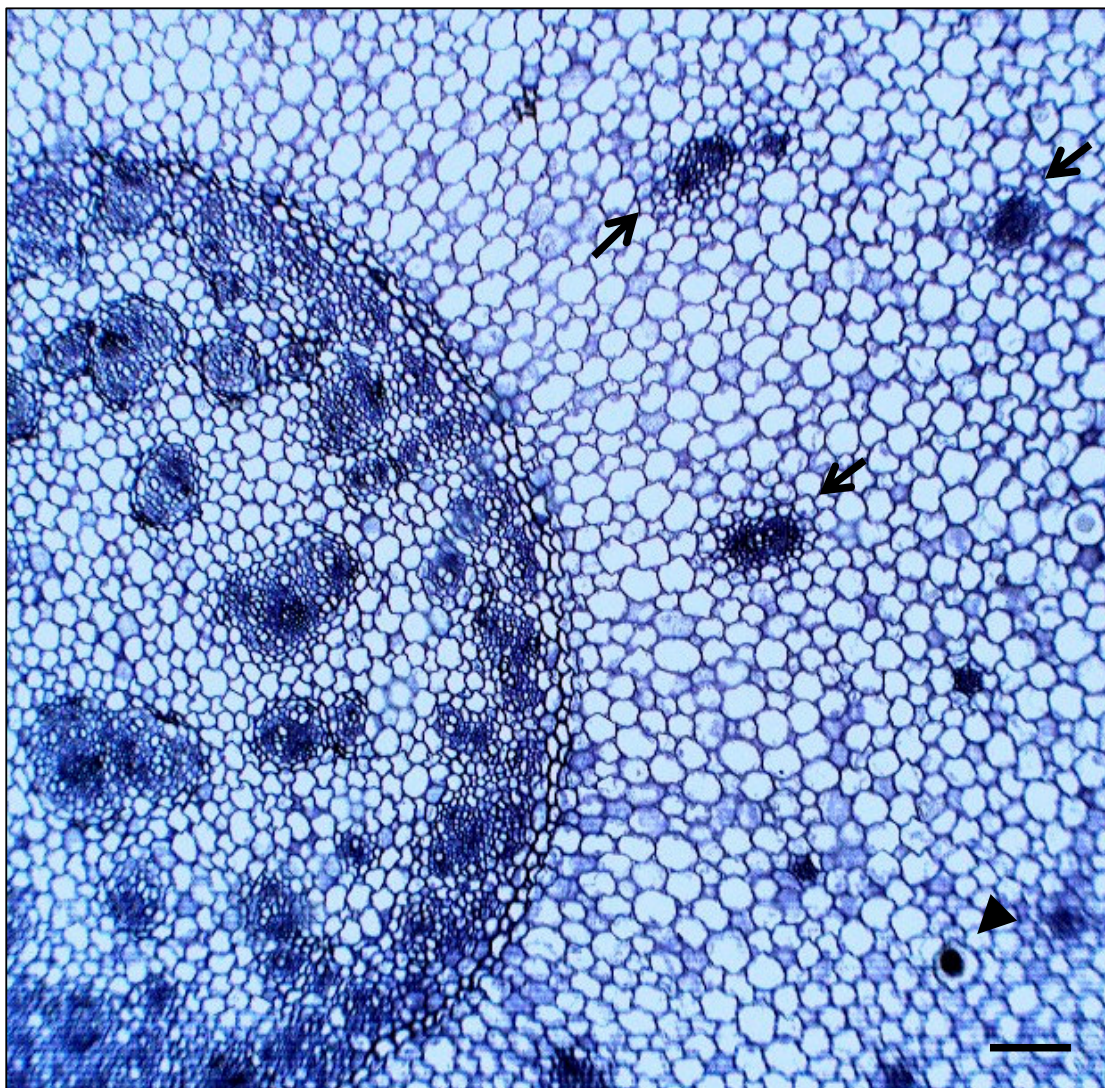


Figura 10. Corte transversal do caule de abacaxi Pérola, terço médio. Presença de râfides nas células parenquimáticas (ponta de seta) e traços foliares na região cortical (seta). Barra = 100 μm .

A região basal do caule apresenta raízes adventícias distribuídas pela região cortical (Fig. 8, 11A). O cilindro central é delimitado pela endoderme. Agora, além da formação de novos feixes vasculares, o periciclo se divide para originar raízes adventícias. As células em divisão do periciclo “empurram” as células endodérmicas em direção às células

parenquimáticas (Fig. 11B), parte das quais, forma a epiderme da raiz, enquanto outras se dividem para formar a região cortical da raiz (Fig. 11C). Ainda há aquelas que sofrem espessamento da parede originando a exoderme. A diferenciação celular culmina na formação de uma raiz adventícia estruturada por uma epiderme, exoderme, parênquima cortical, endoderme, pólos de protoxilema e medula (Fig. 11D).

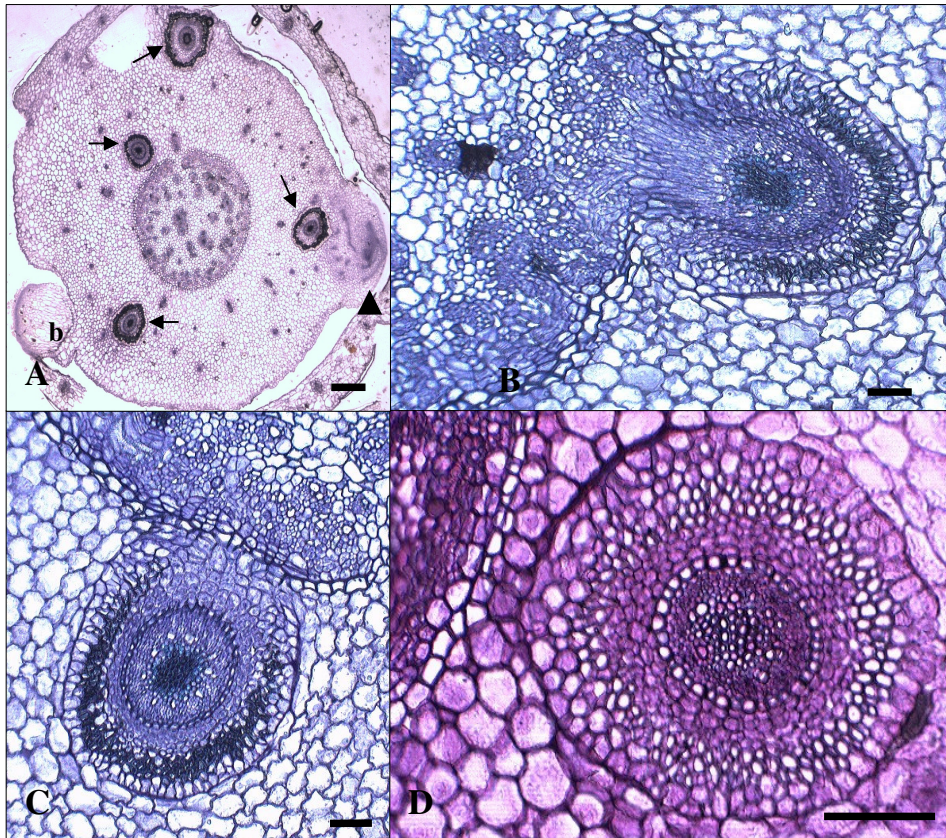


Figura 11. Cortes transversais da base do caule de abacaxi Pérola apresentando a formação das raízes adventícias. A – Vista geral do caule com quatro raízes adventícias (seta), uma gema lateral (ponta de seta) se formando e a base de um broto formado (**br**); B – Formação da raiz adventícia a partir do periciclo; C – Diferenciação das células para a formação da exoderme e epiderme da raiz; D – Raiz adventícia com exoderme e epiderme formada. Barra = 100 μ m.

Alterações anatômicas na bainha foliar sob o efeito de 20 μ M de Picloram

Nos três primeiros dias de cultivo, não se observa alterações na epiderme ou no mesofilo. Entretanto, as células parenquimáticas do xilema e do floema iniciam um processo de divisão mitótica verificado pelo núcleo proeminente dessas células. As células da bainha parenquimática do feixe estão se dividindo periclinal e/ou anticlinalmente. Também é possível observar o núcleo grande de algumas células adjacentes à bainha seguida pela divisão das mesmas (Fig. 12A).

No sexto dia, as células parenquimáticas que compõem o feixe vascular apresentam intensas divisões formando duas regiões com células de citoplasma denso e núcleo proeminente (Fig. 12B). As células parenquimáticas do mesofilo ao redor começam a sofrer lise à medida que o nódulo vai se formando (Fig. 12B). Somente o xilema permanece intacto, sendo possível observar que os demais tecidos do feixe vascular começam a se desdiferenciar.

Aos nove dias de cultivo, as células parenquimáticas que envolveram os cordões de fibras distribuídos regularmente pelo mesofilo começaram a apresentar divisões (Fig. 12C). As células do parênquima clorofiliano sofrem lise enquanto que a epiderme juntamente com a hipoderme continuam íntegras.

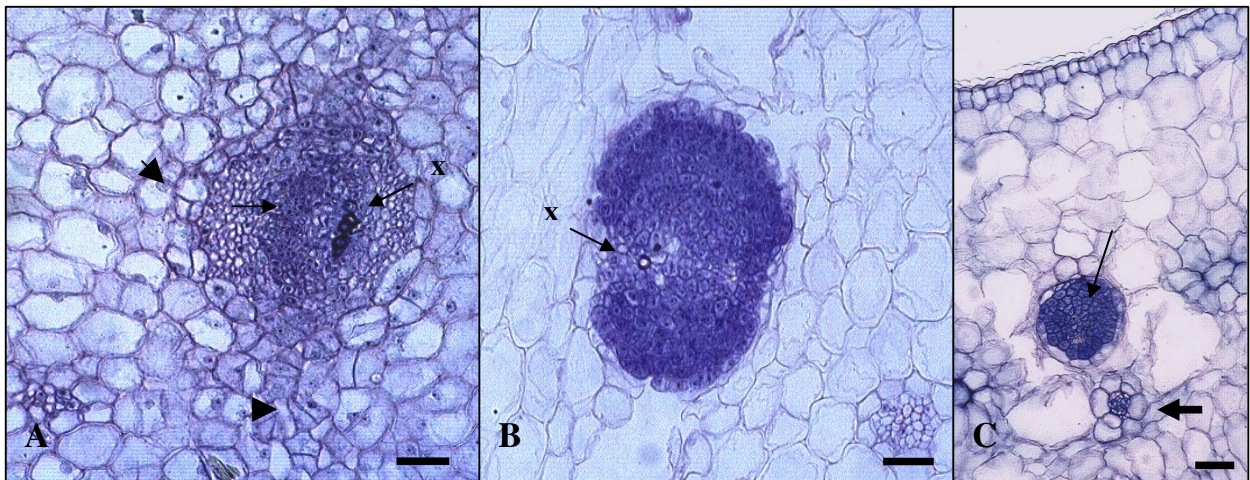


Figura 12. Cortes transversais da bainha foliar de abacaxi Pérola apresentando a formação de nódulos. A – Início de divisão celular na bainha do feixe, nas células parenquimáticas do mesofilo (ponta de seta) e nas células parenquimáticas associadas ao xilema e floema com núcleo proeminente (seta) e xilema (x) intacto aos 03 dias de cultivo; B – Desenvolvimento do nódulo e lise das demais células do mesofilo aos 06 dias de cultivo; C – Início das divisões celulares na região dos cordões de fibras (seta larga) e expansão gradual do nódulo aos 09 dias (seta). Barra = 50 μ m.

Entre doze e quinze dias de cultivo, verifica-se o crescimento acelerado desses nódulos (Fig. 13A) e a lise gradativa das células do mesofilo e da epiderme.

Observa-se também que as células que delimitaram os nódulos apresentaram espessamento de parede. Não se observou células xilemáticas e esclerenquimáticas no interior dos nódulos. No entanto, no corte longitudinal, foi possível verificar a presença de meristemóides e expansão dos nódulos em torno dos feixes vasculares, praticamente todas as células encontraram-se em processo de diferenciação (Fig. 13B).

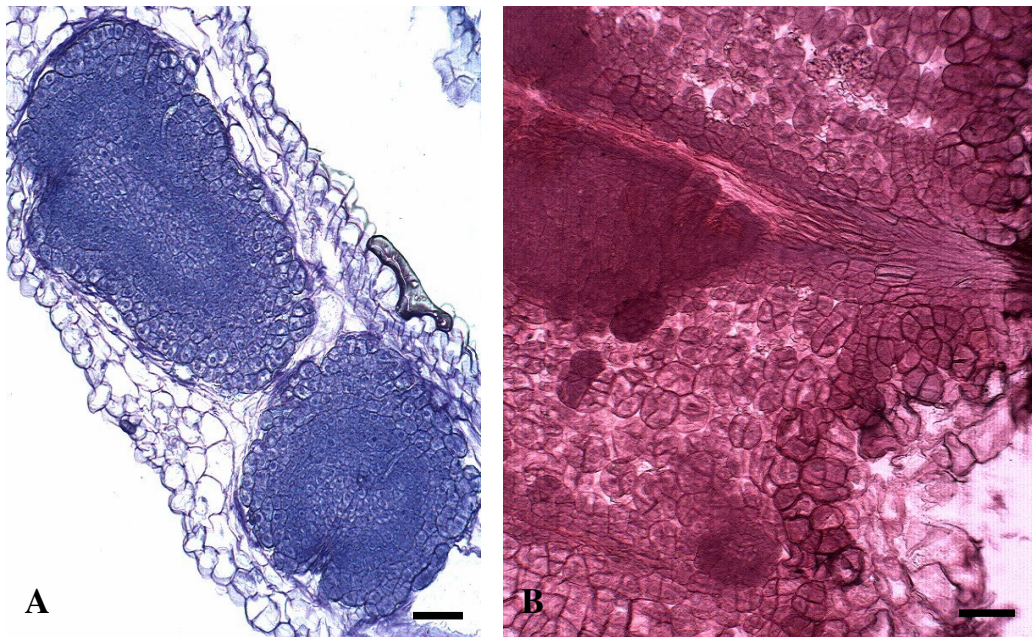


Figura 13. Cortes transversal (A) e longitudinal (B) da bainha foliar de abacaxi Pérola apresentando formação de nódulos entre os 12 e 15 dias de cultivo. A – Evidenciando a proliferação dos nódulos; B – Apresentando a proliferação dos nódulos (seta) e meristemóides (ponta de seta) em torno do feixe vascular. Barra = 50 μ m.

A partir dessa fase, em torno do décimo oitavo dia, os nódulos se expandem de forma centrífuga, ou seja, seu crescimento ocorre a partir da divisão das células da periferia, enquanto que as células internas sofrem diferenciação (Fig. 14A). As células periféricas do nódulo, são menores e com núcleo proeminente, estão em processo intenso de divisão. Os nódulos apresentam células alongadas na porção central e na região periférica, as células pequenas, com o citoplasma denso e o núcleo proeminente, indicando intensa divisão mitótica. Estes nódulos originam os calos observados macroscopicamente.

Nesta fase, a epiderme abaxial se rompe, permitindo o crescimento e expansão dos meristemóides (Fig. 14B). Em alguns explantes, a epiderme adaxial permanece, em outros, o tecido epidérmico cede espaço para a expansão dos nódulos.

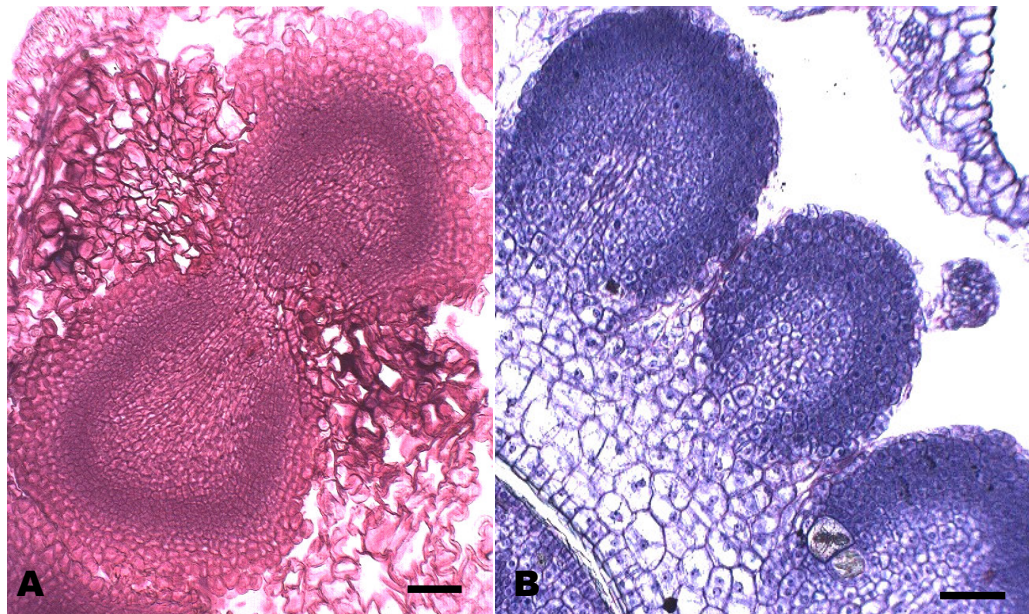


Figura 14. Cortes transversais dos nódulos formados a partir do décimo oitavo dia de cultivo. A – Evidenciando a expansão do nódulo; B – Crescimento dos nódulos em direção à epiderme abaxial. Barra = 50 μ m.

Aos 30 dias, o nódulo começa a formação de regiões concêntricas no seu interior apresentando pontos de tecido vascular (Fig. 15A – ponta de seta).

Algumas células das camadas externas se desprendem do calo, dando a textura friável observada macroscopicamente. Após esta fase, o tecido do explante inicial está totalmente desestruturado.

Com 60 dias de cultivo, os calos denominados friáveis apresentam grupos poligonais de células com núcleo evidente (Fig. 15B).

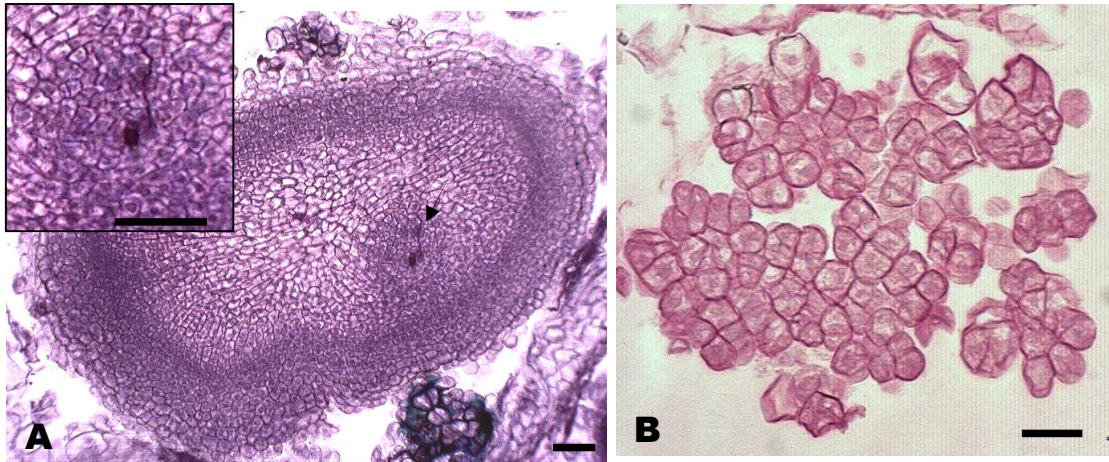


Figura 15. Cortes transversais do nódulo aos 30 e 60 dias de cultivo. A – Regiões concêntricas na porção central (seta e em detalhe) aos 30 dias de cultivo; B – Pequenos grupos de células poligonais aos 60 dias de cultivo. Barra = 50 μm .

Alterações anatômicas na bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP

Nos três primeiros dias de cultivo, a epiderme e as células do mesofilo permanecem intactas enquanto que as células da bainha parenquimática do feixe vascular sofrem divisões anticlinais e periclinais formando dois a três estratos de células (Fig. 16A).

Aos 06 dias de cultivo, as divisões na bainha do feixe se intensificam e as células parênquimáticas situadas entre os feixes vasculares também começam a dividir, principalmente aquelas situadas na região mediana do mesofilo (Fig. 16B). Assim como o parênquima clorofiliano próximo aos cordões de fibras. Visto em detalhe, a bainha do feixe vascular apresenta mais de três estratos de células (Fig. 16C). Nos cortes longitudinais, confirma-se que as divisões se iniciam na bainha do feixe e se expande para as células adjacentes (Fig. 16D).

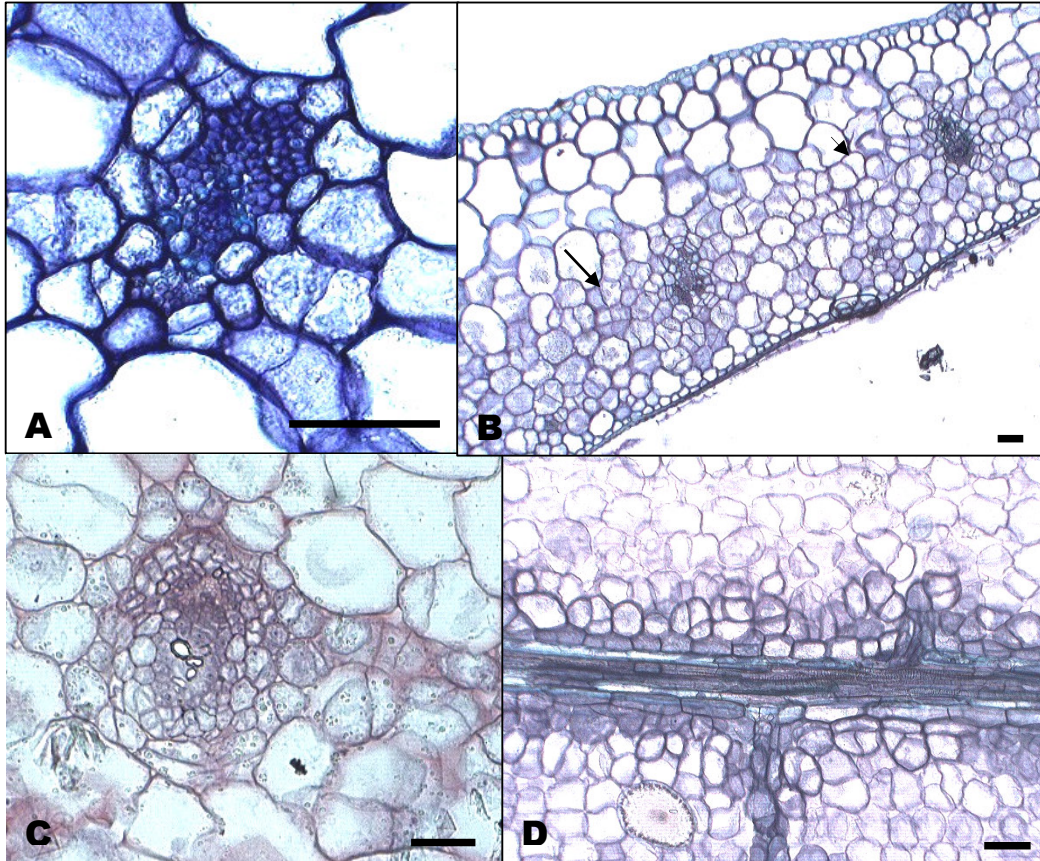


Figura 16. Corte transversal (A-C) e longitudinal (D) da bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP. A – Feixe vascular apresentando divisões periclinais e anticlinais na bainha do feixe, formando dois estratos de células; B – Células parenquimáticas adjacentes aos feixes vasculares em divisão (seta); C – Detalhe em feixe vascular evidenciando a bainha em divisão; D – Feixe vascular mostrando que a divisão se inicia na bainha e expandem para as demais células adjacentes. Barra =50 μm .

Entre 09 e 12 dias de cultivo, os núcleos das células-mãe são evidentes e as divisões ocorrem em diversos planos, promovendo a formação de pequenos grupos de 3 a 4 células. As células do parênquima aquífero e da hipoderme também começam a sofrer divisões, principalmente divisões anticlinais. As divisões das células da bainha do feixe levam à formação de uma segunda bainha em torno do feixe vascular. Esta possui células com paredes espessadas, diferentemente das células comumente observadas na bainha do feixe

vascular da planta controle. As células da bainha do feixe apresentam 3 ou 4 divisões, sendo difícil distinguir as células originais (Fig. 17A).

Com 15 dias de cultivo, verificam-se nódulos distribuídos pelo mesofilo (Fig.17B – ponta de seta). Tal processo pôde ser acompanhado após o nono dia de cultivo, no qual foram observadas as divisões iniciais seguido pela intensificação dessas divisões no decorrer do tempo. Outro ponto observado é a delimitação desses agrupamentos. As paredes periclinais externas das células destes grupos apresentam paredes mais espessas, isolando estes grupos de células das demais que se formaram. Algumas células ainda se encontram nos estágios iniciais do processo de divisão. Os conglomerados de células ganharam maiores proporções formando os nódulos.

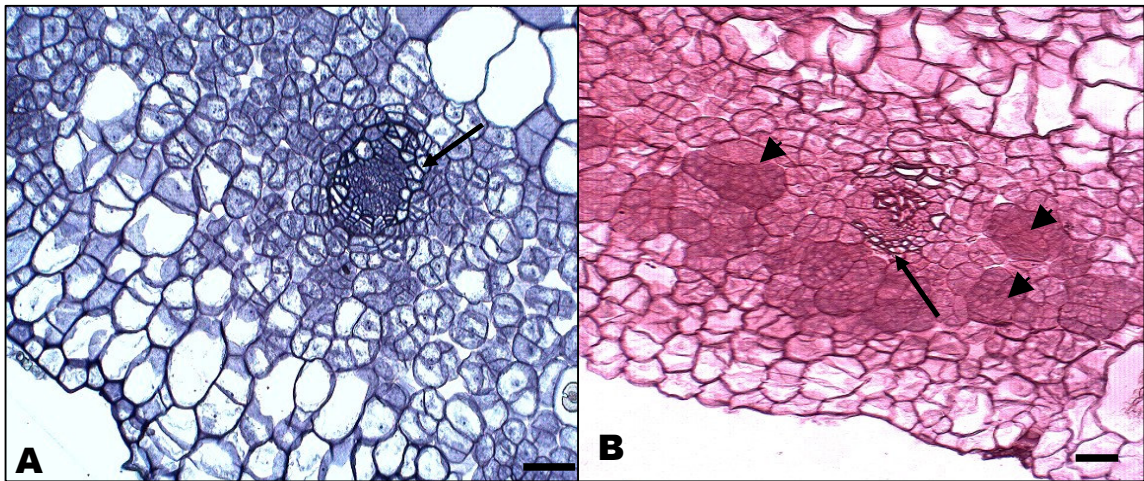


Figura 17. Cortes transversais da bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP após 12 dias de cultivo. A – Mesofilo apresentando divisões em diversos planos e feixe vascular envolvido por uma segunda bainha de células com espessamento da parede (seta); B – Mesofilo com vários nódulos (ponta de seta). Barra =50 μm .

A partir do décimo oitavo dia até o vigésimo primeiro, a maioria das células apresentaram células com espessamento de parede e somente algumas ainda continuaram se dividindo para aumentar a proporção dos nódulos. Estes se expandiram pelo mesofilo, ocorrendo lise em todos os tecidos residuais, como epiderme e algumas células parenquimáticas que não sofreram desdiferenciação.

Aos 30 dias, os nódulos em processo de diferenciação começaram a redefinir o novo órgão que estava sendo formado (Fig. 18A). O tecido vascular original da bainha foliar,

que permaneceu 'protegido' pela bainha de células com espessamento na parede, sofreu uma pequena alteração quanto a sua posição. O xilema inicialmente ficou agrupado na porção central do meristemóide, enquanto que algumas células floemáticas formaram um arco unilateral em torno deste tecido. Células parenquimáticas menores circundaram o referido tecido vascular, que por sua vez, foi contornado por várias camadas de células parenquimáticas maiores.

Em um estágio seguinte, formou-se parênquima entre os vasos xilemáticos individualizando-os. O tecido floemático formou um arco bilateral envolvendo o xilema. As células parenquimáticas próximas aos tecidos vasculares possuem núcleo proeminente, enquanto que as demais são maiores e poligonais. Uma camada de células, semelhante a uma epiderme, se diferencia ao redor dessas estruturas, separando-as.

Cortes longitudinais destas estruturas evidenciaram a presença de meristema apical, meristema fundamental, procâmbio, protoderme e uma futura exoderme (Fig. 18B), sugerindo que o órgão em formação se tratava de uma raiz.

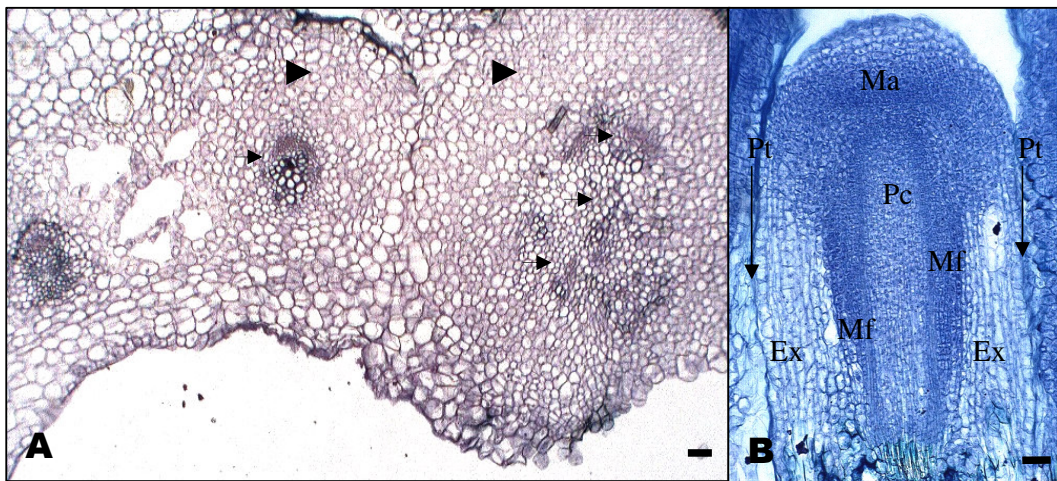


Figura 18. Corte transversal (A) e longitudinal (B) da bainha foliar sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP após 30 dias de cultivo. A – Mesofilo apresentando estruturas similares a uma raiz, presença de tecidos vasculares (seta) e células parenquimáticas envolvendo o feixe vascular (ponta de seta); B – corte longitudinal da estrutura semelhante à raiz constituída de meristema apical (Ma), meristema fundamental (Mf), procâmbio (Pc), protoderme (*) e uma futura exoderme Ex). Barra =50 μm .

Alterações anatômicas do caule sob o efeito de 20 μ M de picloram

Nos segmentos do caule, tanto em regiões próximas à base quanto na porção distal, as células parenquimáticas externas aos feixes vasculares do córtex sofreram intensas divisões mitóticas aos três dias de cultivo. As células pericíclicas também se encontraram em processo de divisão periclinal (Fig. 19A). Os traços foliares e os feixes vasculares no início de sua formação foram mais suscetíveis a este tratamento do que os demais tecidos.

Um ponto relevante ocorreu durante a migração do feixe vascular. Células com núcleo grande, citoplasma denso e divisões mitóticas foram observadas no ponto de abertura da endoderme. A divisão celular avançou para as células internas ao cilindro vascular.

No sexto dia de cultivo, as divisões se expandiram pelas camadas de células parenquimáticas externas à endoderme, apresentando uma proliferação radial (Fig. 19B). O mesmo ocorreu com as células parenquimáticas que envolviam os feixes vasculares na região cortical. Entretanto, na porção apical do caule, as células parenquimáticas, tanto da região cortical, quanto às internas ao cilindro vascular encontrava-se em processo de divisão. Uma observação importante a ser considerada foi a endoderme íntegra nas porções mediana e basal, enquanto que a mesma se encontrava em pequenos fragmentos a medida que se aproximava da gema apical. Inicialmente, a endoderme parecia proteger as células internas a ela do efeito da concentração de picloram.

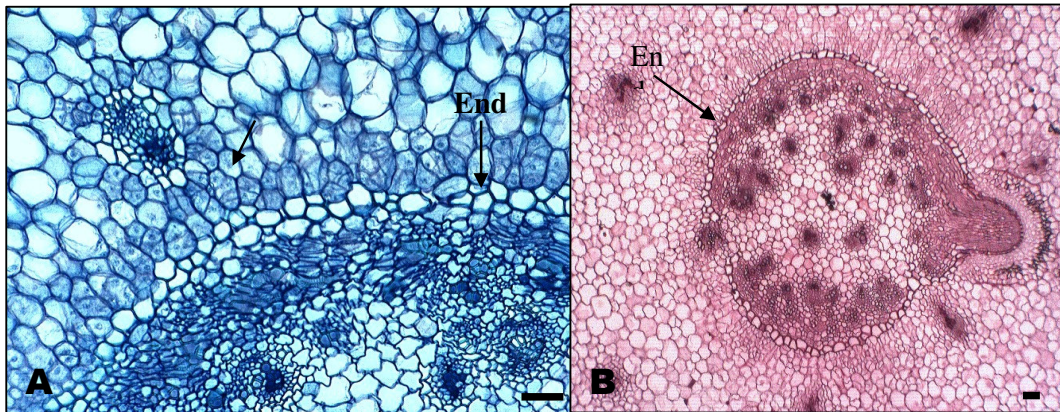


Figura 19. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μ M de picloram aos 3 e 6 dias de cultivo. A – Região mediana do caule apresentando as primeiras divisões em torno do feixe vascular e próximas à endoderme, região mais susceptível ao efeito da auxina; B – Região basal do caule apresentando a proliferação radial das células em divisão, próximo à endoderme (End). Barra =50 μ m.

Aos nove dias de cultivo, a divisão celular avançou em direção à epiderme, as células internas à endoderme permaneceram intactas em algumas porções do caule, com exceção das células pericíclicas que também se encontrava em divisão no tratamento isento de reguladores de crescimento (Fig. 20A). No entanto, os feixes vasculares presentes na região cortical sofreram diversas alterações (Fig. 20B). A divisão mitótica do parênquima ao redor foi intensa e o núcleo das células envolvidas nesse processo estava conspicuo.

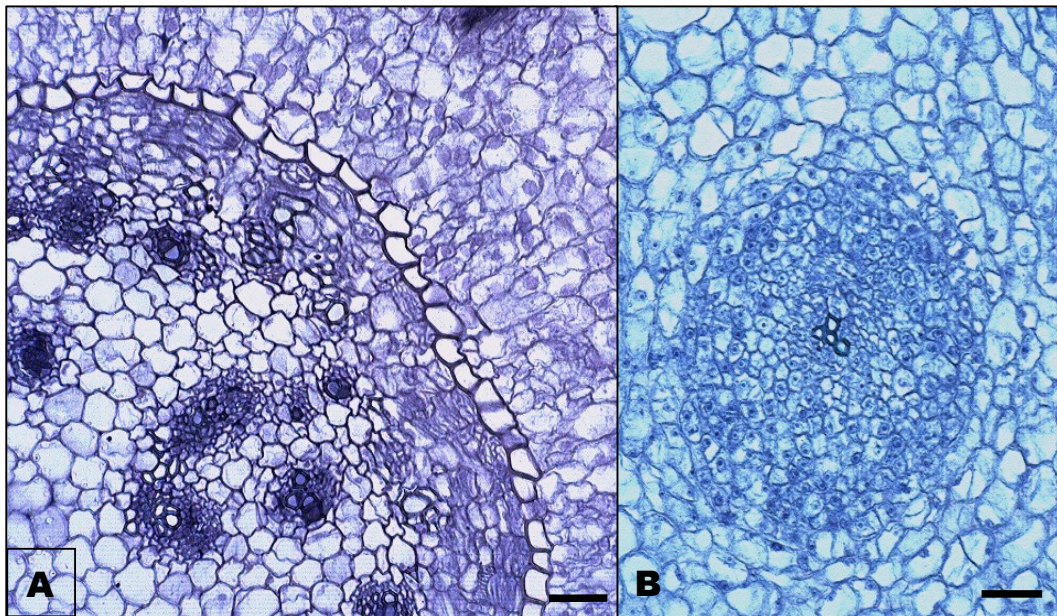


Figura 20. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μ M de picloram aos 9 dias de cultivo apresentando células com núcleo grande e citoplasma denso. A – Região mediana do caule apresentando o avanço das divisões em direção à epiderme; B – Feixe vascular da região cortical envolvido por uma intensa proliferação celular. Barra =50 μ m.

A partir do décimo segundo dia, as células parenquimáticas em divisão, localizadas externamente à endoderme, começaram a se diferenciar, algumas apresentaram espessamento da parede formando pequenos conglomerados (Fig. 21A). O mesmo processo ocorreu com as células em divisão provenientes dos feixes vasculares corticais. Enquanto isso, o processo de divisão celular se inicia nas células parenquimáticas ao redor dos feixes vasculares do cilindro vascular (Fig. 21B). Verifica-se que na bainha dos feixes vasculares há dois ou três estratos de células provenientes da divisão. As células parenquimáticas adjacentes aos feixes vasculares apresentaram pelo menos uma divisão e

essas divisões ocorreram em diferentes planos. As células periciclícas, xilemáticas, floemáticas e endodérmicas permaneceram indiferentes a concentração de picloram.

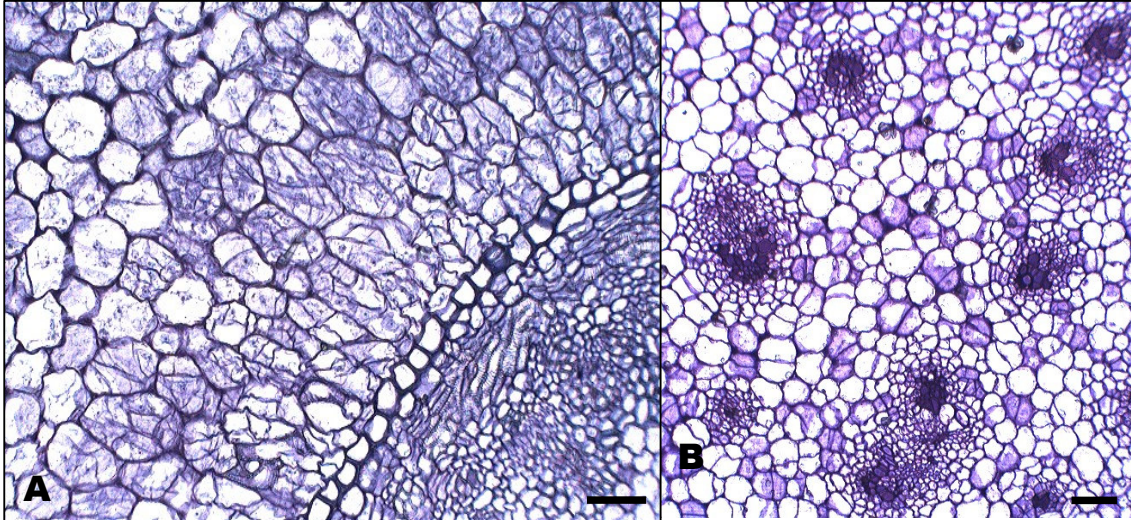


Figura 21. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μM de picloram aos 12 dias de cultivo. A – Região mediana do caule evidenciando as células em processo de diferenciação e espessamento da parede; B – Feixes vasculares do cilindro vascular em processo de divisão mitótica. Barra =50 μm .

Com 15 dias de cultivo, observa-se a formação de nódulos provenientes dos feixes vasculares da região cortical (Fig. 22A). Essas estruturas são circulares e preservam o tecido vascular original. A maior parte das células parenquimáticas próximas à epiderme caulinar permaneceu intacta, entretanto, estas foram empurradas para fora com o aumento gradativo dos nódulos.

Aos 21 dias de cultivo, os nódulos próximos à endoderme intensificaram o processo de diferenciação (Fig. 22B). O espessamento da parede, agora identificado pela deposição de celulose, individualizou pequenos grupos de células dentro dos nódulos. Os nódulos provenientes dos feixes vasculares avançaram em direção à epiderme, provocando lise nos demais tecidos. O tecido xilemático continuou inalterado durante esse processo. Os feixes vasculares presentes no cilindro vascular se dividiram lentamente, enquanto que os nódulos da região cortical avançaram de forma acelerada e descontínua.

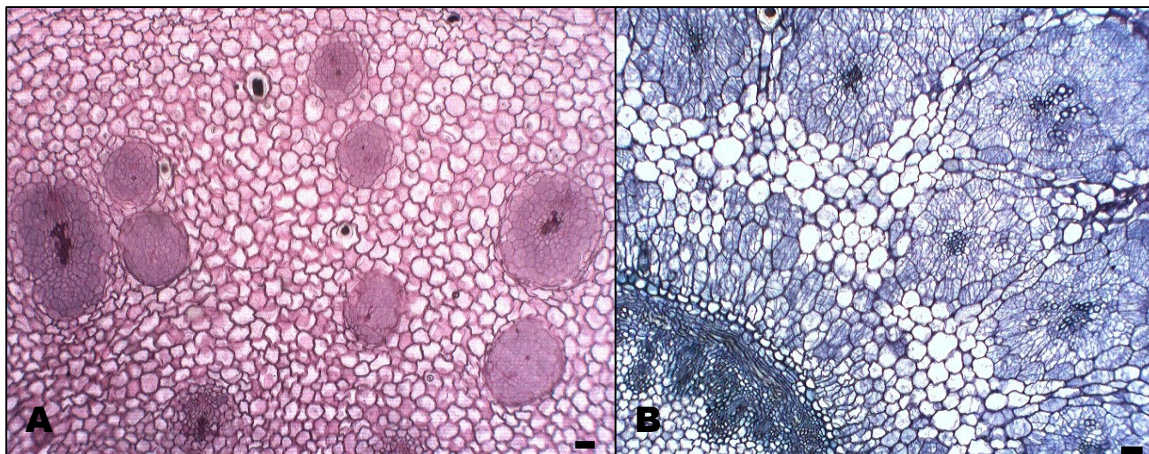


Figura 22. Cortes transversais do caule sob o efeito de 20 μM de picloram aos 15 e 21 dias de cultivo. A – Formação de nódulos na região dos feixes vasculares corticais; B – Diferenciação e crescimento acelerado dos nódulos. Barra =50 μm .

Ao final dos 30 dias, os nódulos formados próximos à endoderme ainda estavam presos ao tecido parental (Fig. 23A). Estas foram formadas por grande quantidade de células meristemáticas ainda indiferenciadas, mas com núcleo proeminente. A endoderme permaneceu inalterada.

Os nódulos que se originaram a partir dos feixes vasculares corticais acabaram se fundindo uns aos outros, porém se isolaram do tecido parental (Fig. 23B). O crescimento destes nódulos é independente dos tecidos do explante inicial e ocorre de forma centrífuga. Constata-se células meristemáticas maiores com núcleo discreto na região central do nódulo e células menores com o núcleo evidente na região periférica (Fig. 23C).

Após a formação do nódulo, as fases que se seguem ocorrem da mesma forma que a observada para os nódulos originados a partir da bainha foliar. Sendo que algumas células da camada mais externa se desprendem do nódulo, dando a textura friável observado macroscopicamente. E com 60 dias de cultivo, os nódulos denominados friáveis apresentam grupos de células poligonais com núcleo evidente.

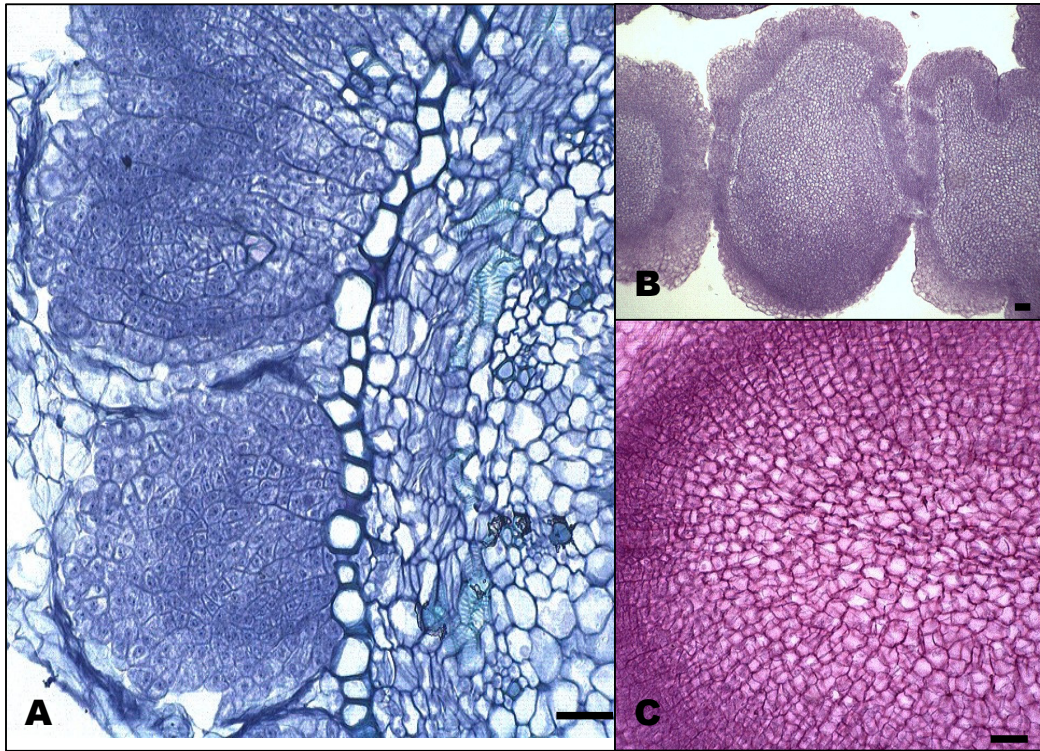


Figura 23. Cortes transversais do caule e calos sob o efeito de 20 μM de picloram após 30 dias de cultivo. A – Nódulos da região próxima à endoderme ainda dependentes do tecido parental; B – Grupos de nódulo isolados do explante inicial; C – Detalhe do nódulo formado apresentando a região central com células meristemáticas maiores e a região periférica com células em processo de divisão mitótica. Barra =50 μm .

Alterações anatômicas no caule sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP

Nos segmentos de caule próximos à base, algumas células parenquimáticas do córtex que envolve os feixes vasculares e as externas à endoderme sofreram divisões periclinais e anticlinais aos três dias de cultivo, as demais células que constituem o caule permaneceram intactas (Fig. 24B).

No segmento que corresponde ao terço-médio aconteceu o mesmo processo, células que envolvem os feixes vasculares, a bainha do feixe e algumas células parênquimáticas próximas à endoderme sofreram divisão (Fig. 24A). A porção apical do caule apresentou maior quantidade de divisões nas células parenquimáticas e estas possuíam o núcleo proeminente.

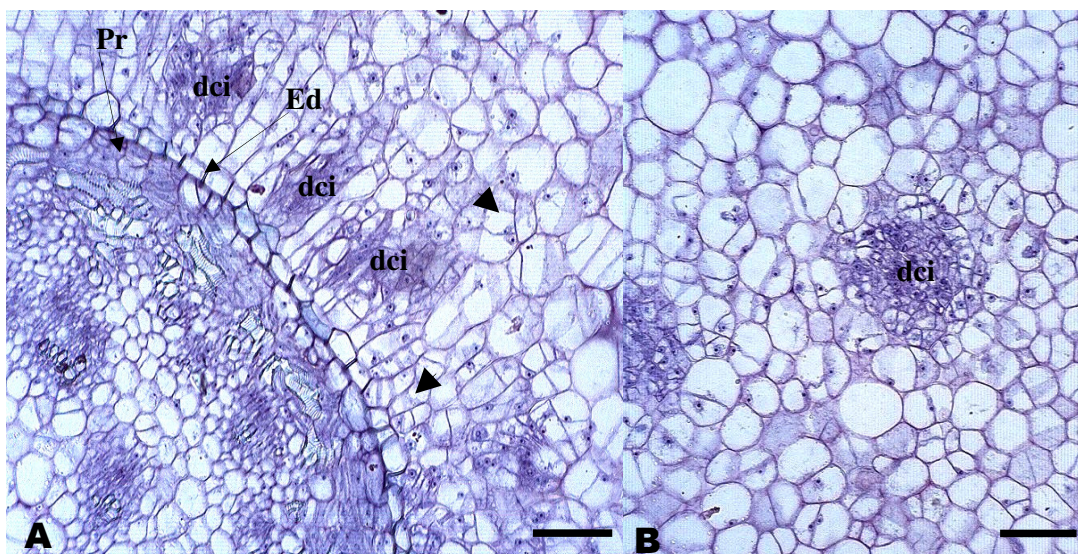


Figura 24. Secções transversais caulinares sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP aos 03 dias de cultivo. A – Região do terço-médio apresentando a região cortical e o cilindro vascular com alterações estruturais; B – Detalhe do feixe vascular cortical mostrando as divisões periclinais e anticlinais das células parenquimáticas ao redor (ponta de seta). Pr - periciclo, Ed – endoderme; porções de divisão celular intensa (dci). Barra = 50 μm .

Aos 06 dias de cultivo, as divisões celulares próximas aos feixes vasculares e da endoderme se intensificaram (Fig. 25A). Agora há vários estratos de células se dividindo em torno dos feixes vasculares da região cortical e fileiras de células (Fig. 25B), também em divisão, com deposição de celulose e núcleo proeminente contornando a endoderme.

Com 09 dias de cultivo, as células em processo de desdiferenciação se expandiram pela região cortical. Essas células também apresentaram citoplasma denso e núcleo evidente, demonstrando que ainda há divisão (Fig. 25C).

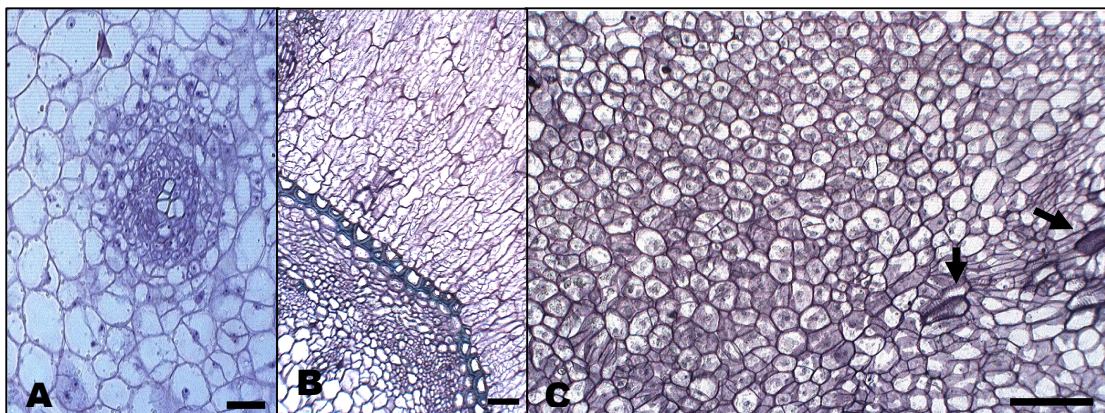


Figura 25. Secções transversais caulinares sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP após 06 dias (A) e 09 dias (B) de cultivo. A – Detalhe de um feixe vascular apresentando intensa divisão celular, células com núcleo grande e xilema intacto (tx); B – Fileiras de células com deposição de celulose contornando a endoderme; C – Detalhe da região cortical, com as células de citoplasma denso e núcleo grande, resquícios de xilema (seta). Barra = 50 μm .

Após 12 dias de cultivo, as células em processo de dediferenciação se expandiram pela região cortical. Essas células também apresentaram citoplasma denso e núcleo evidente, demonstrando que ainda havia divisão nessas células (Fig. 26A). As células xilemáticas se reorganizaram em um ponto central enquanto que as demais células parenquimáticas se posicionaram em torno do feixe, sendo possível verificar dois estratos de células. Um estrato constituído basicamente por xilema, localizado na região central do nódulo em formação e o outro estrato formado por células parenquimáticas em processo de divisão contornando externamente as células xilemáticas.

A partir do décimo quinto dia até o vigésimo primeiro, os nódulos possuíam a mesma distribuição dos traços foliares no parênquima cortical (Fig. 10) e apresentavam somente o xilema intacto. As células parenquimáticas corticais adjacentes aos traços foliares sofreram divisões em diferentes planos. As alterações das células parenquimáticas dos traços foliares juntamente com as células parenquimáticas adjacentes a eles originaram uma estrutura com dois estratos concêntricos bem distintos (Fig. 26B), denominada de meristemóide. O primeiro estrato de células localizado na região central do nódulo apresentava células vasculares e células parenquimáticas em processo intenso de divisão mitótica, enquanto

que o segundo estrato, situado na região periférica do nódulo, apresentava células em processo de divisão, porém em um estágio avançado.

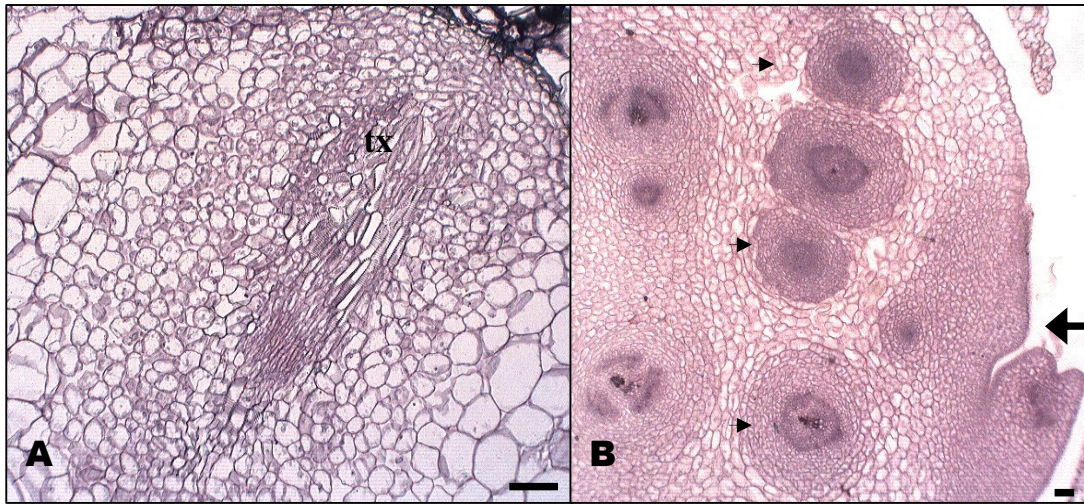


Figura 26. Secções transversais caulinares sob o efeito de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP a partir de 15 (A) e 21 dias (B) dias de cultivo. A – Região do feixe vascular apresentando intensa divisão celular, células com núcleo grande, citoplasma denso e tecidos xilemáticos em processo de diferenciação (tx); B – Região cortical caulinar com meristemóides (ponta de seta) em formação e início de formação de uma gema lateral (seta larga). Barra = 50 μm .

As células em processo de diferenciação nos meristemóides deram origem a estruturas diferenciadas. Do centro para a periferia, notaram-se algumas células parenquimáticas poligonais de diferentes tamanhos, células pentagonais com espessamento da parede próximos (Fig. 27A – setas) ao estrato de células em divisão. As células em processo de divisão formaram um arco aberto envolvendo as células parenquimáticas e o feixe vascular (Fig. 27A). Externamente ao arco de células em divisão, observaram-se um estrato de células com paredes espessadas, que, provavelmente, formará a endoderme (Fig 27A – Ed). O último estrato formado por várias camadas de células em diferenciação constituirá o parênquima cortical (Fig 27A – Zc).

Após 30 dias de cultivo, verificou-se nitidamente a estrutura que estava sendo formada. Na região delimitada pelas células em processo de divisão, observaram-se vários pontos de protoxilema em formação entre as células parenquimáticas (Fig. 27B). Uma camada de células com paredes espessadas em “U” delimitam internamente as células em processo de

divisão, evidenciando uma endoderme, enquanto que externamente, as células parenquimáticas corticais continuaram em processo de divisão mitótica.

De um modo geral, se formou uma raiz adventícia a partir de cada feixe vascular da região cortical do caule. A figura 27C evidenciou a formação dessas raízes e o início da delimitação das mesmas com a formação do tecido de revestimento.

Com 45 dias de cultivo, a raiz estava totalmente formada, apresentando a zona medular formada pelo tecido parenquimático de paredes espessadas e os pólos de protoxilema, seguido pelo periciclo e endoderme, a região do parênquima cortical com formação da exoderme e delimitação da epiderme (Fig. 27D).

DISCUSSÃO

As bainhas foliares do abacaxizeiro, utilizadas na indução do sistema embriogênico, foram obtidas a partir de plantas desenvolvidas *in vitro*. O emprego deste explante está em consonância com os utilizados em trabalhos com *Ananas* (Wakasa *et al.*, 1989; Firoozabady & Moy, 2004; Sripaoraya *et al.* 2003). Assim sendo, Firoozabady & Moy (2004) observaram que explantes da bainha foliar são responsivos ao processo de indução de embriogênese indireta em abacaxizeiro Smooth Cayenne, em meio com elevados níveis de picloram (41,4 μ M). Os tecidos embriogênicos apresentavam estruturas agrupadas não-organizadas de textura friável, semelhantes ao calo embriogênico. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho onde estruturas semelhantes aos embriões somáticos originaram na superfície dos calos embriogênicos.

Diferentes auxinas têm influência na indução de calo em explantes foliares de abacaxizeiro. Por exemplo, calos embriogênicos foram relatados por Daquinta *et al.* (1997) em 41% dos explantes empregando meio suplementado com 2,4-D. Percentagens de até 58% de explantes responsivos a calogênese foi descrita por Sripaoraya *et al.* (2003) em meio com 3.0 mg/L de picloram. Trabalhos mais recentes com abacaxizeiro (Firoozabady & Moy, 2004; Sripaoraya *et al.* 2003) destacaram a importância do uso de picloram como auxina indutora da embriogênese.

Em alguns explantes de abacaxi cv. Pérola foram observadas a formação de protuberâncias. Essas protuberâncias também foram observadas por Wakasa *et al.*, (1989) quando cultivaram explantes provenientes da base foliar de abacaxizeiro em meio suplementado com 1.0 mg/L de ANA e 2.0 mg/L de BAP. Mercier *et al.*, (2003) também observaram protuberâncias formadas na porção basal das folhas de abacaxi cultivadas in

vitro, formadas por um grupo de células. Porém neste trabalho, posteriormente a formação das protuberâncias, houve oxidação dos explantes acarretando na morte do mesmo.

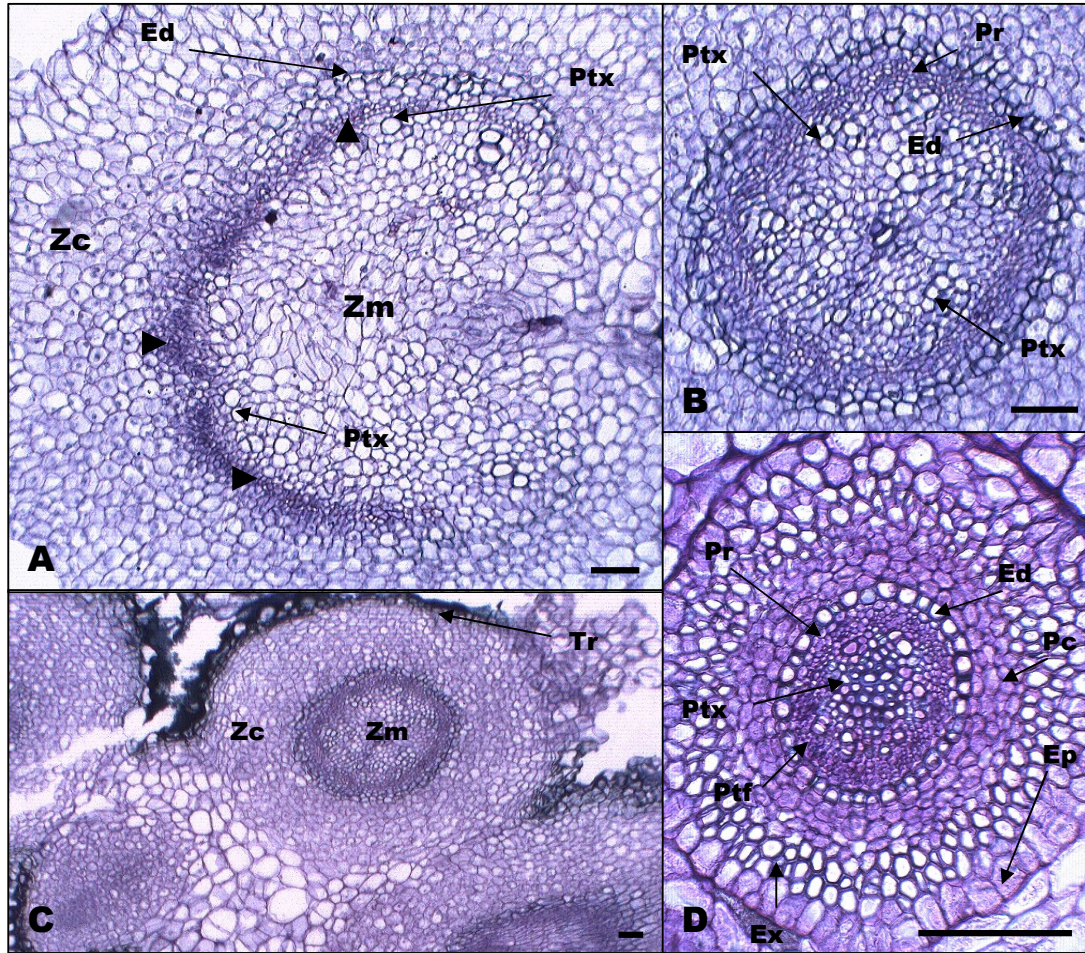


Figura 27. Cortes transversais das raízes formadas aos 30 dias (A - C) e 45 dias (D) de cultivo no tratamento com 27 μ M BAP e 1,0 μ M ANA. A – Início da diferenciação da raiz, com estabelecimento da zona medular (Zm), pólos de protoxilema (Ptx), células em processo de divisão (ponta de seta), endoderme (Ed), zona do parênquima cortical (Zc); B – Raiz adventícia em diferenciação apresentando pólos de protoxilema (Ptx) e protofloema (Ptf) na zona medular, periciclo (Pr), endoderme (Ed); C – Diferenciação do tecido de revestimento (Tr); D – Raiz adventícia evidenciando a diferenciação do parênquima cortical (PC), exoderme (Ex) e epiderme (Ep). Barra =50 μ m.

As análises histológicas mostraram que o tecido responsável pela formação de calos, tanto na bainha foliar quanto no disco caulinar, foi o tecido parênquimático. Considerado um tecido potencialmente regenerável, o referido tecido foi utilizado por alguns autores na indução da organogênese em diferentes culturas como maracujá, *Vrisea* e banana (Alves *et al.*, 2006; Lombardi, 2003; Appezzato-da-Glória *et al.*, 1999).

As atividades mitóticas de um determinado tecido são identificadas pela presença de células com citoplasma denso e núcleo conspícuo. Tal característica foi observada nos explantes de abacaxi, tanto nas células parenquimáticas do mesofilo quanto nas células parenquimáticas corticais. Assim como no mesofilo do abacaxi, Appezzato-da-glória *et al.*, (1999) identificaram pequenas células no mesofilo dos explantes de maracujá com o citoplasma denso e núcleo conspícuo e observaram que as primeiras divisões ocorreram no parênquima fundamental. A diferença verificada entre as duas culturas estava no plano de divisão, enquanto no maracujá as divisões foram preferencialmente periclinais, no abacaxi elas ocorreram em vários planos apresentando um maior volume de células em divisão.

Os calos formados sob a concentração de 20 μM de picloram em segmentos da bainha foliar e discos caulinares de abacaxi cv. Pérola eram compostos de células meristemáticas em divisão ativa com citoplasma denso e núcleo grande no centro da célula, o que também foi verificado por Firoozabady e Moy (2004), trabalhando com abacaxi cv. Smooth Cayenne.

O crescimento acelerado dos nódulos e lise gradativa das células do mesofilo e da camada epidérmica aqui relatados também foram observados por Constabel (1984). Este autor revela que à medida que o calo se prolifera, o explante foliar pode desintegrar-se.

O calo embriogênico em *Zea mays* descrito por Sinha Ray & Gosh (1990) se assemelha muito às características observadas nos primeiros calos formados em abacaxi cv. Pérola. Eles observaram que o calo embriogênico apresentava-se uma coloração ligeiramente amarelado, textura firme com minúsculos meristemóides na superfície. Estes calos apresentavam células pequenas e ovais com núcleo evidente e citoplasma denso. Godbole *et al.* (2002) também obtiveram calos compactos, nodulares e creme-claro em bambu, capazes de diferenciar em embriões somáticos. Tal descrição confere com os calos observados em abacaxi cv. Pérola.. De acordo com estes autores, os calos originaram a partir do parênquima xilemático, situado na base dos feixes vasculares. Essa observação também foi verificada nos feixes vasculares de abacaxi cv. Pérola quando submetidos à concentração de 20 μM de picloram.

As células internas ao cilindro central não sofreram nenhuma alteração. É como se os espessamentos da parede das células endodérmicas protegessem as demais células internas a esse tecido. Este fenômeno pôde ser facilmente observado quando se comparou porções distais do caule onde havia a delimitação do cilindro central pela endoderme e porções proximais na qual essa demarcação era praticamente inexistente. Este fato ocorreu tanto no tratamento com picloram quanto no tratamento com ANA e BAP.

Corroborando os resultados encontrados por Mercier *et al.* (2003), a formação de nódulos durante a organogênese ocorreram na região mediana da bainha proveniente da intensa divisão celular das células parenquimáticas sob o tratamento com 27 μM de ANA e 1 μM de BAP. De acordo com esses autores, os meristemóides são centros de células meristemáticas. Esses pesquisadores revelam que a auxina afeta a divisão, expansão e diferenciação da célula e que as citocininas são necessárias, combinadas com as auxinas, para a divisão celular na fase de G1-S e G2-M em uma variedade de cultura de células vegetal assim como na própria planta.

Considerando-se que todas as células somáticas cultivadas *in vitro* são capazes de expressar totipotência, Ziv (2000) explica que as células injuriadas na camada externa do explante, liberam etileno que induz as células das camadas mais internas a se desdiferenciar. A perda do controle coordenado permite a formação de novos gradientes de fitohormônios endógenos nas células desdiferenciadas, aumentando assim a divisão celular em resposta aos vários reguladores de crescimento adicionados ao meio. A divisão de células pode resultar na formação de calos ou obedecer a um padrão organizado como a formação de centros meristemáticos diretamente no tecido do explante. Acredita-se que este processo explica tanto a formação de calos quanto a de centros meristemáticos observadas no presente trabalho.

CONCLUSÃO

Secções transversais da bainha e do caule de aproximadamente 1,0 mm de espessura foram extremamente favoráveis à formação de calos.

As bainhas foliares e os discos caulinares do abacaxi são as regiões susceptíveis à indução dos processos regenerativos.

Tecidos jovens apresentam maior grau de diferenciação sob condições indutivas.

Os embriões foram produzidos no tratamento em que, a concentração inicial de picloram foi 20,7 μM mantida por 60 dias, seguido pela concentração de 10,35 μM da mesma auxina por um período total de 90 dias, mantidos no escuro.

A combinação de 27 μM de ANA e 1 μM de BAP regenerou brotos e raízes adventícias a partir de segmentos da bainha foliar e de discos caulinares.

O tecido parênquimático apresentou maior susceptibilidade aos tratamentos do que os demais tecidos.

O tecido xilemático não sofre alterações significativas durante ambos os processos de regeneração.

Os calos são originados a partir das células parenquimáticas relacionadas ao feixe vascular na bainha foliar de abacaxi cv. Pérola sob o tratamento embriogênico.

Nos discos caulinares, tanto as células parenquimáticas relacionadas ao feixe vascular quanto aquelas próximas à endoderme originam os calos no sistema embriogênico.

O crescimento do calo ocorre de forma centrífuga, ou seja, de fora para dentro.

O crescimento do calo provoca lise nos demais tecidos do mesofilo, nas bainhas e no córtex nos caules.

O calo friável apresenta células agrupadas ou isoladas, com citoplasma denso e núcleo conspícuo.

A bainha dos feixes vasculares é suscetível às alterações na presença de ANA e BAP formando meristemóides na bainha foliar.

A bainha dos traços foliares presentes no córtex do caule originam meristemóides no sistema organogênico.

Nos segmentos do caule, o espessamento da parede das células endodérmicas atua como barreira, impedindo que as células internas ao cilindro central sofram alterações na fase inicial.

Os meristemóides provenientes tanto da bainha foliar quanto dos segmentos caulinares formaram raízes no tratamento com 27 μM de ANA e 1 μM de BAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ALMEIDA, W.A.B. **Caracterização anatômica da organogênese in vitro e transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus sp.*** 2002. 138f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2002a.

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

ALVES, G.M.; DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 204-207, 2006.

AMIN, M.N.; RAHMAN, M.M.; RAHMAN, K.W.; AHMED, R.; HOSSAIN, M.S.; AHMED, M. B. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf derived callus cultures of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Giant Kew]. **International Journal of Botany**. v.01, p. 128-132, 2005.

AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. (Ed.) **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. p.82-123.

APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, p. 2007-2013, 1999.

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

BATAGIN, K.D.; ALMEIDA, C.V.; TANAKA, F.A.O.; ALMEIDA, M. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv. IAC “gomo-de-mel” micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasileira**. v. 23, p. 85-92, 2009.

BARBOZA, S.B.S.C.; **Comparação de protocolos para micropropagação do abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) MERRIL]**. 1999. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 1999.

BAKER, K.F & COLLINS, J.L. Notes on the distribution and ecology of *Ananas* and *Pseudoananas* in South America. **America Journal of Botany**, v. 26, p. 697-702, 1939.

BE A, L.V. & DEBERGH, P.C. Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 191 – 194, 2006.

BIRCH, R.G., Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 48, p. 297-326, 1997.

CABRAL, J.R.S. Variedades. **In:** CUNHA, G. A. P. da; SANCHES, N. F.; MEDINA, V. M. (Ed.). **Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 186 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

CARNEIRO, L.A.; ARAÚJO, R.F.G.; BRITO, G.J.M.; FONSECA, M.H.P.B.; COSTA, A.; CROCOMO, O.J.; MANSUR, E. In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 79-83, 1999.

COLLINS, J.L. **The pineapple:** botany, cultivation, and utilization. London: Leonard Hill, 1960. 294p.

CONSTABEL, F. Somatic embryogenesis. In.: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** Orlando: Academic Press, 1984. v.1.

COPPENS d'EECKENBRUGGE, G. LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. (Eds.). **The pineapple:** botany, production, and uses. New York: CAB International, 2003. 320p.

CRUZ, A.R.R. **Micropropagação de oito genótipos de abacaxizeiro (Ananas comosus (L.) Merrill).** 2000. 71f. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2000.

CUNHA, G.A.P. & SOUZA, L.F.S. Clima e solo. **In:** CUNHA, G. A. P. da; SANCHES, N. F.; MEDINA, V. M. (Ed.). **Abacaxi:** o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 186 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. **O abacaxizeiro:** cultivo, agroindústria e economia. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 480p.

CUNHA, G.A.P. da; MATOS, A.P. de; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C.; CABRAL, J.R.S.; ALMEIDA, O.A. de. **A cultura do abacaxi práticas de cultivo.** 6 ed. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1995. 30p. (Embrapa-CNPMF. Circular Técnica, 1).

CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C. **Abacaxi para exportação:** aspectos técnicos da produção, Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 41p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 11).

CUNHA, G.A.P da & REINHARDT, D.H.R.C. **A propagação do abacaxizeiro.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 67p. (EMBRAPA-SPI. Coleção Plantar, 11).

DAQUINTA, M.A.; CISNEROS, A.; RODRIGUEZ, Y.; ESCALONA, M.; PEREZ, M.C.; LUNA, I.; BORROTO, C.G. Somatic embryogenesis in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Proc. Second Int. Pineapple Symp. **Acta Horticulturae**, v. 425, p. 251–257, 1997.

DEWALD, M.G.; MOORE, G.A.; SHERMAN, W.B., EVANS, M.H. Production of pineapple plants in vitro. **Plant Cell Reports**. v. 07, p. 535-537, 1988.

ESPINAL AGUILAR, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1981. 5p. (EMBRAPA-CNPMPF. Comunicado Tecnico, 6).

ESPINOSA, P.; LORENZO, J. C.; IGLESIAS, A.; YABOR, L.; MENENDEZ, E.; BORROTO, J.; HERNANDEZ, L. & ARENCIBIA, A.D. Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. **Plant Cell Reports**. v. 21, p. 136–140, 2002.

FAOSTAT, Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistical Database. Disponível em: < <http://faostat.fao.org> > Acesso em: 08 abril 2008.

FILIPPI, S.B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A.P.M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agricola**, v. 58, p.711-716, 2001a.

FILIPPI, S.B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A.P.M. Histological changes in banana explants, cv. Nanicão (*Musa* spp., Group AAA), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis. **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, v.24, p.595-602, 2001b.

FIROOZABADY, E.; HECKERT, M.; GUTTERSON, N. Transformation and regeneration of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, n. 01, p. 1–16, 2006.

FIROOZABADY, E. & MOY, Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 67–74, 2004.

FIROOZABADY E. & GUTTERSON, N. Cost-effective in vitro propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 844–850, 2003.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cell Research**. v. 50, pp.151–158, 1968.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; De KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture** 3rd ed. Springer, 2008. 508p.

GIACOMELLI, E.J. **Expansão da abacaxicultura no brasil**. Campinas: Fundação CARGILL, 1982. 79 p.

GIACOMELLI, E.J.; PY, C. **O abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundação CARGILL, 1981. 101p.

GODBOLE, S.; SOOD, A.; THAKUR, R.; SHARMA, M.; AHUJA, P.S. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. **Current science**, v.. 83, pp. 885-889, 2002.

GÓMEZ-LIM, M. A. & LITZ, R. E. Genetic transformation of perennial tropical fruits. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 442–449, 2004.

GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L.; FUNDORA, Z.; MOLINA, L. A.; ABDULNOUR, J.; DESJARDINS, Y.; ESCALONA, M. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** , v. 47, p. 87-90, 2005.

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

GUIDERDONIL, E. & DEMARLYL, Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. **Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.14, p. 71-88, 1988.

HAMASAKI, R. M.; EDUARDO PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p. 383-389, 2005.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br> > Acesso em: 21 maio 2008.

JAYASANKAR, S.; BONDADA, B.R.; LI, Z.; GRAY, D. J. Comparative anatomy and morphology of *vitis vinifera* (vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. **American Journal of Botany** v. 90, p. 973-979, 2003.

JONES, T.J. & ROST, T.L. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. **Botanical Gazette**, v. 150, p. 41-49, 1989.

KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. 1997. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural; 1997. 198p.

KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Continued) II. The leaf. **Botanical Gazette**, v. 110, pp. 333-404, 1949.

KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. I. Introduction, organography, the stem, and the lateral branch or axillary buds. **Botanical Gazette**, v. 110, pp. 159-217, 1948.

LEAL, F.; ANTONI, M.G. Especies del género *Ananas*: origen y distribución geográfica. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v.29, p.5-12, 1980 a.

LEAL, F.; ANTONI, M.G. sobre las especies del género *Ananas* y su distribución especialmente novedosa para Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v.29, p.43-50, 1980 b.

LEAL, F.& COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. Pineapple. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. ed. **Fruit breeding** : Jonh Willey, 1996. v. 1, p.515-557. (Tree and Tropical Fruits).

LEE, K.S.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; BRUNNER, H.; AFZA, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 51, p. 1–8, 1997.

LOISEAU, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; LE DEUNFF, Y. Histology of somatic embryogenesis in pea. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 36, p. 683-687, 1998.

LOMBARDI, S.P. **Estudos Anatômicos e Fisiológicos da Organogênese *in vitro* em *Passiflora cincinnata*** MAST 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003.

MAGNUSSOM, I. & BORNMAN, C.H. Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of *Triticum sativum*. v. 63, p. 137 – 145, 1984.

MANICA, I. **Abacaxi: do plantio ao mercado**. Porto Alegre, RS: Cinco Continentes, 2000. 122 p.

McCAIN, J.W. & HODGES, T.K. Anatomy somatic embryos from maize embryo cultures. **Botanical Gazette**. v. 147, p. 453-460, 1986.

McDANIEL, J.K.; CONGER, B.V.; GRAHAM, E.T. A histological study of tissue proliferation, embryogenesis, and organogenesis from tissue cultures of *Dactylis glomerata* L. **Protoplasma**. v. 110, p. 121-128, 1982.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; FILHO, F.A.A.M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfologia de embriões nucelares de laranja 'valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Acta Botanica Brasílica**. v.15, p. 17-25, 2001.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.107-112, 2003.

MOGOLLÓN, N.; DÍAZ, J.G.; HERNÁNDEZ, N. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananas comosus* L. "Queen Australia" **Revista Facultad Agronomía (LUZ)**. v. 21, supl. 1, p. 15-21, 2004.

MORAES, J.N. **Análise comparativa da embriogênese somática em *Citrus sinensis*, var. Valência, e *Citrus limonea*, var. Limão Cravo** 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003.

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

NIKAM, T.D.; BANSUDE, G.M.; ANEESH KUMAR, K.C. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). **Plant Cell Reports**. v. 22, p.188–194, 2003.

PADMANABHAN, K.; CANTLIFFE, D.J.; HARREL, R.C.; McCONNELL, D.B.; A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using computer vision and histological analyses. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 685–692, 1998.

PAIVA, J. G.A., FANK-DE-CARVALHO, S.M., MAGALHÃES, M.P., GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500[®] : uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasílica**, v. 20, p. 257-264, 2006.

PANNERTIER, C. & LANAUD C. Divers aspects de l' utilisation possible des cultures "in vitro" par la multiplication végétative de l' *Ananas comosus* L. Merr. variété 'Cayenne Lisse'. **Fruits**, v. 31, p. 739-750, 1976.

PY, C.; TISSEAU, M. **La piña tropical**. Barcelona: Blume, 1969. 278 p.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 285-301, 2006.

REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. da; LIMA, V.P. de. Propagação. **In:** CUNHA, G.A.P. da; SANCHES, N.F.; MEDINA, V.M. (Ed.). **Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 186 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

REINHARDT, D.H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. **Abacaxi Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 77p. (Série Frutas do Brasil, 7) 2000.

REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. da. **Métodos de produção de mudas de abacaxi livres de fusariose. II. Comportamento de plântulas em campo**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1982. 14p. (EMBRAPA-CNPMF. Boletim de Pesquisa, 1).

REINHARDT, D.H.R.C. **Produção de mudas sadias através da multiplicação rápida do abacaxizeiro**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1980. 5p. (EMBRAPA-CNPMF. Comunicado Técnico, 4).

SANCHES, N.F. Doenças. **In:** CUNHA, G. A. P. da; SANCHES, N. F.; MEDINA, V. M. (Ed.). **Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 186 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

SIMÃO S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1971. 530p.

SINHA RAY, D. & GHOSH, P.D. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured leaf explants of *Zea mays*. **Annals of Botany**. v. 66, p. 497-500, 1990.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J. B.; DAVEY, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.) **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 450–454, 2003.

SRIPAORAYA, S.; BLACKHALL, N.W.; MARCHANT, R.; POWER, J.B., LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. Relationships en pineapple by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Plant Breeding**. v. 120, p. 265-267, 2001a.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, J.B.; DAVEY, R.M. Herbicide-tolerant Transgenic Pineapple (*Ananas comosus*) produced by microprojectile bombardment. **Annals of Botany**. v. 88, p. 597-603, 2001b.

TEIXEIRA, J.B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27 p. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 – 0110; 180).

TENG, W.L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**. v. 16, p. 454–457, 1997.

TEO, C.K.H. Clonal propagation of pineapple by tissue culture. **Planter (Malaya)**. v. 50, p. 58-59, 1974.

TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A; CALDAS, L.S; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Embrapa hortaliças. 2000. 128p.

VASIL, V.; VASIL, I.K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (Graminae). **American Journal of Botany**. v. 71, p. 158-161, 1984.

VASIL, V. & VASIL, I.K. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. SCHUM. I. in cultured immature embryos. **Botanical Gazette**. v. 143, p. 454-465, 1982.

YABOR, L.; ARZOLA, M.; ARAGÓN, C.; HERNÁNDEZ, M.; ARENBICIDA, A. LORENZO, J. C. Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, p. 63-67, 2006.

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

ZIMMERMAN, J. L. Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 05, p. 1411-1423, 1993.

ZIV, M. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. **Horticultural Reviews**, v. 24, p. 1-30, 2000.

WAKASA, K. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). In: Bajaj Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Springer, 1989, v. 05, pp 13-29.