



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**

**VITÓRIA KARLA DE OLIVEIRA SILVA**

**POTENCIAL DA PUTRESCINA NA INDUÇÃO DE CLUSTERS NODULARES DE  
ABACAXIZEIRO ‘TURIAÇU’: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA**

**SÃO LUÍS – MA**

**2023**

**VITÓRIA KARLA DE OLIVEIRA SILVA**

**POTENCIAL DA PUTRESCINA NA INDUÇÃO DE CLUSTERS NODULARES DE  
ABACAXIZEIRO ‘TURIAÇU’: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis  
**Co-orientadora:** Prof. Dra. Thais Roseli Corrêa

**SÃO LUÍS – MA**

**2023**

**VITÓRIA KARLA DE OLIVEIRA SILVA**

**POTENCIAL DA PUTRESCINA NA INDUÇÃO DE CLUSTERS NODULARES DE  
ABACAXIZEIRO 'TURIAÇU': CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Aprovada em: 03/03/2023

**BANCA EXAMINADORA**



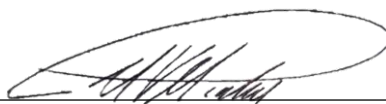
---

Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis (Orientador)  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA



---

Prof. Dr. Diego Silva Batista  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB



---

Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Silva, Vitória Karla de Oliveira .

Potencial da putrescina na indução de clusters nodulares de abacaxizeiro “Turiaçú”: caracterização anatômica / Vitória Karla de Oliveira Silva. – São Luís, 2023.

54 f

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis.

1.*Ananas comosus*. 2.Morfogêneses *in vitro*. 3.Putrescina. I.Título.

CDU: 634.774-29

### **Dedico**

Aos meus pais, Elenilson Sousa e Silva e Núbia Morais de Oliveira Silva por todo amor, cuidado e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amor, Reiton Neves Moraes por todo carinho, amor, paciência, amizade e apoio ao longo de todos os anos que estamos juntos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu infinito amor, por conservar a minha vida com saúde e pela garra que me dá para alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, Elenilson Sousa e Silva e Núbia Morais de Oliveira Silva por serem minha base, por sempre acreditarem, incentivarem e me ajudarem em tudo.

Ao meu avô, José Rodrigues pelo carinho, afeto e alegria demonstrado a mim (*in memoriam*).

Aos meus irmãos, Ramon Gabriel de Oliveira Silva, Samuel Victor de Oliveira Silva e Daniel Bruno de Oliveira Silva pelo apoio, alegria e descontração de sempre.

Aos meus sobrinhos Arthur Estevam Pinheiro Silva e Elisa Carvalho Silva, por momentos felizes, de afago e muito amor.

Ao meu esposo, Reiton Neves Moraes por todo amor, carinho, paciência e apoio ao longo de todos os anos que estamos juntos.

À família Moraes por me proporcionar momentos alegres, descontraídos e por toda ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Reis pela confiança em mim, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo apoio, suporte e incentivo para realização deste trabalho.

À minha querida co-orientadora, Prof. Dra. Thais Roseli Corrêa pelo acolhimento, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança depositada em mim, pelas palavras de incentivo, além disso, pelo apoio em momentos difíceis, pelo carinho, pelas risadas regadas a muito café e por ser um ser humano incrível.

Ao pesquisador Sênior, Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro pelo apoio na definição, implementação e análises anatômicas do trabalho, pelas sugestões e contribuições valiosas ao documento e por sempre se mostrar disposto a contribuir em todas as etapas do meu mestrado, muito obrigada!

Ao Dr. Givago Lopes Alves por desenvolver todo o protocolo de micropropagação do abacaxizeiro 'Turiaçu' que possibilitou a realização do meu trabalho, pelo apoio com orientações, sugestões, dicas na execução do meu trabalho de mestrado e pela disponibilidade de sempre.

Ao Dr. Sérgio Heitor Sousa Felipe pela ajuda na anatomia, pelas correções no documento, pelas orientações, sugestões, por me ensinar os gráficos e pela solicitude de sempre.

Ao Prof. Dr. José Roberto de Sousa pelo empréstimo do microscópio trinocular para realização das fotos da anatomia.

Às amigas, Dra. Tácia Marinho e Irislene Albuquerque por toda ajuda desde a minha entrada no laboratório, por me ajudarem na implementação, instalação e avaliação do meu trabalho, pelas conversas, risos, apoio em momentos complicados e pelas alegrias celebradas.

Aos meus amigos da “salinha”, Givago Alves, Tácia Marinho, Irislene Albuquerque, Sérgio Felipe, Assistone de Jesus e Karina Soeiro pelo convívio diário, pelas risadas, pelas boas conversas, pelos sonhos compartilhados e pelo café delicioso de sempre.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Jordanya Pinheiro, Maria Cristina Rocha, Mariana Lima, Marion Braga, Lukas Allayn Corrêa, Darlyara Silva, Ildeane Silva, Lucas Rodrigues, Kira Alves, Eros Alves (o mascote do grupo) e aos outros componentes citados acima pelo apoio, ajuda incansável, pelos momentos de descontração no laboratório e celebrações de aniversário todos os meses.

À Prof Dra. Ester Azevedo do Amaral pelo incentivo, pelo carinho, sorriso contagiante, abraço caloroso, pelas palavras de esperança, por ter se tornado uma grande amiga e conselheira, além de eterna orientadora.

Aos meus amigos do Laboratório de Acarologia, Taynara Cruz, Dayane Froz, Rayanne Soeiro, Ana Carolina Souza e Matheus Barata pela caminhada desde a graduação, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo carinho, pelas reuniões com muita comida e pelas risadas, enfim, vocês são especiais.

Aos meus colegas de turma do mestrado, Marcos Teixeira, Florine Pinheiro, Layla Monteiro, Gabrielly Gonçalves e Suzane Matos pelo companheirismo.

Às amigas, Izadora Izídio e Ana Karoline Sodré pelo café de senhorinha, pelas inúmeras conversas, desabafos, sorrisos e lágrimas em todos os encontros.

À Universidade Estadual do Maranhão em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia pela oportunidade de realizar o mestrado.

À secretária do PPGA em Agroecologia, Rayanne Ferreira por desempenhar sua função com competência, responsabilidade, zelo e por fazer muito além do que lhe é solicitado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

## Sumário

Lista de figuras .....	9
Lista de tabelas .....	10
Lista de siglas e abreviações .....	11
Resumo .....	12
Abstract .....	13
Capítulo I.....	14
1. Introdução geral.....	15
2. Referencial teórico.....	17
2.1 Abacaxizeiro [ <i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill].....	17
2.2 Propagação <i>in vitro</i> de abacaxizeiro a partir de clusters nodulares.....	20
Referências .....	25
Capítulo II.....	31
Resumo .....	32
Abstract .....	33
1. Introdução.....	34
2. Material e Métodos.....	35
2.1 Caracterização morfoanatômica de segmentos foliares de plantas de abacaxizeiro Turiaçu <i>in vitro</i> .....	37
2.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	38
3. Resultados.....	38
4. Discussão.....	46
5. Conclusão .....	49
Referências .....	50
Considerações finais.....	54



## Lista de figuras

- Figura 1.** Segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ aos 7, 21, 35 e 42 dias após a inoculação (DAI), submetidos a concentrações de BAP (0 e 8  $\mu$ M) e de PUT (0, 100 e 1000  $\mu$ M) para indução de clusters nodulares aos 7 DAI, (A, E, I, M, Q e U); 21 DAI (B, F, J, N, R e V); 35 DAI (C, G, K, O, T e W), e 45 DAI (D, H, L, P, U e X). Int= Intumescimento; Ro= Raízes; Ms= microbrotos. Barras = 1 mm. .... 40
- Figura 2.** Indução de clusters nodulares (A), oxidação de clusters nodulares (B), microbrotos via clusters nodulares (C) e número de microbrotos/explante (D) de segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’, aos 45 dias do cultivo *in vitro*, nos meios B0P0, B0P100, B0P1000, B8P0, B8P100 e B8P1000. \*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8). .... 42
- Figura 3.** Comprimento de microbroto/explante (mm) (A), número de folhas/explante (B), massa seca de clusters nodulares (C) de segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’, aos 45 dias do cultivo *in vitro*, nos meios B0P0, B0P100, B0P1000, B8P0, B8P100 e B8P1000 \*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8). .... 43
- Figura 4.** Caracterização anatômica de clusters nodulares oriundas de segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ aos 7 dias do escuro, 7 dias do claro e 45 dias após a inoculação (DAI), submetidos a concentrações de BAP (0 e 8  $\mu$ M) e concentrações de PUT (0, 100 e 1000  $\mu$ M); Secção transversal de segmento foliar aos 7 DAI no escuro (a, e, i, m, q e u); 7 DAI no claro (b, f, j, n, r e v) e aos 45 DAI (c, d, g, h, k, l, o, p, s, w e x). Sg= grânulo de amido; Cd= divisão celular; Me= meristemóide; Icd= intensa divisão celular; Nc= núcleo; Barras = 100  $\mu$ m. .... 45

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Meios de cultura utilizados para indução de clusters nodulares em segmentos foliares de plantas de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ .....	36
--	----

## **Lista de siglas e abreviações**

ANA - Ácido 1-naftalenoacético

BAP - 6-benzilaminopurina

CNs - Clusters Nodulares

Cv. - Cultivar

FAO - Organização da Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LCT - Laboratório de Cultura de Tecidos

LED - Diodos Emissores de Luz

MS - Murashige e Skoog

PAs - Poliaminas

PUT - Putrescina

## Resumo

Clusters nodulares (CNs) é uma via morfogênica bastante empregada na propagação *in vitro* e têm demonstrado sucesso na regeneração de brotos de Bromeliaceae. Essa via tem sido responsiva em diversos tipos de explantes cultivados em meio com auxinas e citocininas. Além desses reguladores de crescimento, outro grupo hormonal que pode exercer papel nos CNs, são as poliaminas, dentre essas a putrescina, porém não está claro o seu papel na indução de clusters. Nosso objetivo foi estudar combinações 6-benzilaminopurina (BAP) e putrescina (PUT) na indução e caracterização morfoanatômica de clusters nodulares em abacaxizeiro cv. 'Turiaçu'. Para isso, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com duas concentrações de BAP (0 e 8  $\mu\text{M}$ ) e três concentrações de putrescina (0, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ ), totalizando seis tratamentos e oito repetições, além da adição de 4  $\mu\text{M}$  de ANA em todos os tratamentos. Aos 45 dias após a inoculação (DAI), foram avaliadas: indução e oxidação de CNs (%), microbroto via CNs (%), número de microbroto/explante, comprimento de microbroto/explante (mm), número de folhas/microbroto e massa seca de CNs (g). A caracterização morfológica foi realizada aos 7, 21, 35 e 45 dias do cultivo *in vitro*, e a caracterização anatômica aos 7 dias do escuro, 7 dias do claro e 45 dias do cultivo *in vitro*. Nesse estudo, foi possível observar que o meio B8P100 promoveu 56% de indução de CNs, formação de microbrotos via CNs, maior comprimento e número de folhas/microbroto. Os estudos morfoanatômicos aos 45 DAI revelaram que os CNs em meio B8P100 apresentaram nódulos com tamanho volumoso, microbrotos com folhas, e desenvolvimento de novas folhas ao longo da base do explante, e nesse mesmo meio, as secções anatômicas revelaram a formação de meristemoides com células pequenas dispostas em espiral, e no meio B8P1000 observamos secções dos segmentos foliares com intensa divisão celular assimétrica em ângulo longitudinal e transversal, e células com núcleo e nucléolo grandes, assemelhando-se a via morfogênica embriogênese somática. Assim, os segmentos foliares de abacaxizeiro 'Turiaçu' mantidos em meio com 4  $\mu\text{M}$  de ANA, 8  $\mu\text{M}$  de BAP e 100  $\mu\text{M}$  de PUT (B8P100) foi mais eficiente tanto para indução de CNs quanto para formação de microbrotos, e os estudos morfoanatômicos foram essenciais para caracterizar os eventos desta rota morfogênica pela combinação de reguladores de crescimento.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, morfogênese *in vitro*, putrescina.

## Abstract

Nodular clusters (NCs) is a morphogenetic pathway widely used in *in vitro* propagation and has demonstrated success in *in vitro* shoot regeneration in Bromeliaceae in general. This pathway has been responsive in several types of explants grown in medium with auxins and cytokinins. In addition to these growth regulators, another hormonal group that may play a role in NCs are polyamines, among them putrescine, however, its role in inducing clusters is not clear. In order to investigate the role of exogenous polyamines combined with other regulars in the induction of NCs in pineapple 'Turiaçu', our objective was to study the influence of putrescine application on the induction, growth and structure of NCs by the combination of 6-benzylaminopurine (BAP) and putrescine (PUT). For this, the experiment was conducted in a completely randomized design, with two concentrations of BAP (0 and 8  $\mu\text{M}$ ) and three concentrations of putrescine (0, 100 and 1000  $\mu\text{M}$ ), totaling six treatments and eight replications, in addition to the addition of 4  $\mu\text{M}$  of ANA in all treatments. At 45 days after inoculation (DAI), the following were evaluated: induction and oxidation of NCs (%), microshoot via NCs (%), number of microshoot/explant, length of microshoot/explant (mm), number of leaves/microshoot and dry mass of NCs (g). The morphological characterization was performed at 7, 21, 35 and 45 days of *in vitro* culture, and the anatomical characterization at 7 days of dark, 7 days of light and 45 days of *in vitro* culture. In this study, it was possible to observe that the B8P100 medium promoted 56% induction of NCs, formation of microshoots via NCs, greater length and number of leaves/microshoot. The morphoanatomical studies at 45 DAI revealed that the NCs in the B8P100 medium presented voluminous nodules, microshoots with leaves, and the development of new leaves along the base of the explant, and in that same medium, the anatomical sections revealed the formation of meristemoids with cells small arranged in a spiral, and in the B8P1000 medium we observed sections of leaf segments with intense asymmetric cell division in longitudinal and transverse angles, and cells with large nucleus and nucleolus, resembling the morphogenetic pathway of somatic embryogenesis. Thus, the leaf segments of pineapple 'Turiaçu' in the medium with 4  $\mu\text{M}$  of NAA, 8  $\mu\text{M}$  of BAP and 100  $\mu\text{M}$  of PUT (B8P100) was more efficient both for the induction of NCs and for the formation of microshoots, and the morphoanatomical studies were essential to characterize the events of this morphogenetic pathway by combining growth regulators.

**Keywords:** *Ananas comosus*, putrescine, morphogenesis *in vitro*

## **Capítulo I**

---

### **Introdução geral e referencial teórico**

## 1. Introdução geral

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma monocotiledônea de clima tropical e subtropical pertencente à família Bromeliaceae com aproximadamente 2700 espécies, distribuídas em 56 gêneros. O fruto desta espécie é apreciado em todo o mundo, e pode ser consumido *in natura* ou de forma industrializada (CRESTANI et al., 2010).

O Brasil é considerado o centro de origem de *Ananas comosus* e ocupa a primeira posição na produção mundial de frutos, com cerca de 2,2 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2021) e tem como principais cultivares a ‘Smooth Cayenne’ e a ‘Pérola’, com 95% de plantios comerciais, e a cultivar ‘Pérola’ com 85% da produção total de abacaxi (REINHARDT et al., 2018). No entanto, outras cultivares possuem boas características organolépticas, e tem apelo comercial, como por exemplo, o abacaxizeiro cultivar ‘Turiaçu’ no estado do Maranhão (REIS et al., 2019).

O abacaxizeiro cultivar ‘Turiaçu’ é oriundo da Microrregião do Gurupi, estado do Maranhão, que surgiu por seleção local, na qual os índios domesticaram e, após isso, houve a propagação por pequenos agricultores (ARAÚJO et al., 2007). Ressalta-se que essa cultivar ainda passa por inovações no processo produtivo, e necessita de tecnologias que viabilizem a produção em larga escala, visto que possui sabor adocicado, com brix 16° e polpa amarela com elevado valor nutritivo, quando comparada a outras cultivares (REIS et al., 2019).

A propagação desta cultivar ocorre por via assexuada, e têm como principal material o filhote, brotação do pedúnculo, que se origina de gemas axilares existentes nas bainhas das brácteas, com reduzida produção de mudas. Nesse sentido, dentre as alternativas que podem contribuir diretamente na produção de mudas, têm-se a propagação *in vitro* de plantas, que favorece a produção de mudas em larga escala, livres de pragas e doenças em tempo e espaço reduzidos (SHAMIN et al., 2016). Protocolos de propagação *in vitro* já foram desenvolvidos para o abacaxi ‘Pérola’, no entanto, necessitava-se de um estudo para a cultivar ‘Turiaçu’. Com isso, recentemente, o grupo do Laboratório de Cultura de Tecidos-UEMA realizou um estudo *in vitro* sobre esta cultivar, que compreendeu desde a desinfestação até aclimatização, e demonstrou o sucesso em todas estas etapas (ALVES, 2022). No entanto, estudos com clusters nodulares, uma outra via morfogenética ainda não foram desenvolvidas para o abacaxizeiro ‘Turiaçu’

Como alternativas inovadoras para a propagação *in vitro*, diversos pesquisadores têm focado nos últimos anos em indução de clusters nodulares em espécies da família

Bromeliaceae (RECH et al., 2009; GUERRA; DAL VESCO, 2010; CORREDOR-PRADO et al., 2015; CORREDOR-PRADO et al., 2020), dentre essas, o abacaxizeiro (SCHERER et al., 2013; SCHERER et al., 2015). Essa via têm sido definida como aglomerado de nódulos, amarelo esverdeados, friáveis ou levemente compactos, que possuem alta eficiência na regeneração em brotos (DAL VESCO; GUERRA, 2010). Alguns pesquisadores acreditam que se trata de uma via morfogênética via intermediária entre a embriogênese somática e organogênese (DAL VESCO; GUERRA, 2010).

Nas últimas décadas, diversos trabalhos citam a eficiência de clusters nodulares, pela alta capacidade regenerativa e multiplicação de brotos *in vitro*, com uso de auxinas e citocininas adicionadas ao meio de cultivo em sementes de *Vriesea friburgensis* var. paludosa (CORREDOR-PRADO et al., 2015) e *Vriesea reitzii* (DAL VESCO et al., 2014a; CORREDOR-PRADO et al., 2020), em segmentos nodais de *Billbergia zebrina* (DAL VESCO et al., 2011) e *Billbergia alfonso-joannis* (DE SOUZA et al., 2016) e folhas de *Vriesea reitzii* (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006; DAL VESCO; GUERRA, 2010; DAL VESCO et al., 2014b; CORREDOR-PRADO et al., 2015) e em *Ananas comosus* (SCHERER et al., 2013; SCHERER et al., 2015). Aliado a esses estudos, a anatomia de clusters nodulares tornam-se importante para compreender os eventos morfogênicos, visto que os clusters nodulares apresentam zonas meristemáticas, policentros e formação de eixos unipolares característicos desta via (SCHERER et al., 2013; CORREDOR-PRADO et al., 2015; DE SOUZA et al., 2016; CORREDOR-PRADO et al., 2020).

Tanto a indução quanto a regeneração de brotos estão associadas a combinação de auxinas e citocininas, estes por sua vez são responsáveis pela entrada nessa via morfogênética (MERCIER et al., 2003). Outros reguladores de crescimento que podem exercer papel na indução de clusters nodulares são as poliaminas, que englobam os grupos putrescina, espermidina e espermina. Scherer et al. (2013), ao quantificar o conteúdo endógeno de poliaminas na indução de clusters nodulares em abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus* Young), observaram decréscimo na indução CNs na ausência de putrescina endógena.

Como o intuito de compensar os níveis de putrescina endógena, adicioná-las de forma exógena ao meio de cultura é promissor, para investigar qual o papel da putrescina na fase de indução de clusters nodulares, visto que na literatura não há trabalhos sobre o uso de putrescina exógena na indução de clusters nodulares, no entanto, na organogênese a adição



das putrescinas melhoram a indução e alongamento de brotos na organogênese (ARAGÃO et al., 2017).

Diante disto, a hipótese do trabalho é que putrescina exógena induz a formação de clusters nodulares, desse modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar combinações 6-benzilaminopurina (BAP) e putrescina (PUT) na indução e caracterização morfoanatômica de clusters nodulares em abacaxizeiro cv. ‘Turiaçu’, bem como (i) analisar qual a combinação de regulares de crescimento que melhor beneficiem o processo de indução de clusters; (ii) avaliar o efeito da putrescina na indução da clusters nodulares; (iii) induzir a formação de microbrotos a partir de clusters nodulares; (iv) caracterizar morfoanatomia da formação de clusters.

## **2. Referencial teórico**

### **2.1 Abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill]**

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma planta originária da América Tropical e Subtropical, compreendendo as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil, Norte da Argentina e do Paraguai (COLLINS, 1960). A dispersão desta espécie ocorreu por intercâmbio entre tribos na América, após isso chegou aos continentes europeu, asiático, africano e, posteriormente, por todo mundo (CTENAS; QUAST, 2000).

Além da região central do Brasil ser tida como o centro de origem do abacaxi, e ser considerada um dos maiores centros de diversidade genética do mundo, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de produção com 2,3 milhões de toneladas, ficando para trás da Costa Rica com 2,9 milhões de toneladas, em segundo lugar a Indonésia com 2,886 milhões de toneladas, e em terceiro lugar as Filipinas com 2,860 milhões de toneladas de produção (FAOSTAT, 2021).

No Brasil, o abacaxizeiro possui área plantada de 63.870 ha, produção de 1.545.036 frutos que correspondem a aproximadamente R\$ 2.610.025,00 milhões de reais. Neste cenário, destacam-se as regiões Norte (34,6%) e Nordeste (32,3%) com maior participação da produção e nos estados brasileiros, o Pará (23,4%) e a Paraíba (17%) possuem maior participação da produção (IBGE, 2021a). No estado do Maranhão, a área plantada de abacaxizeiro compreende 1.081 ha com produção de R\$ 22. 975,00 mil reais, distribuídos majoritariamente nos municípios de São Domingos do Maranhão (580 ha), Turiaçu (200 ha),

Graça Aranha (125 ha), Tuntun (62 ha) e Lago dos Rodrigues (42 ha), possibilitando produção estimada em 22.836 toneladas somente no ano de 2020 (IBGE, 2021b).

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, herbácea pertencente à família Bromeliaceae, com 1 m de altura e diâmetro de 0,8 m a 1,5 m. O caule é curto, grosso, em forma de bastão. As folhas são estreitas e rígidas em forma de calha, inseridas no caule em forma de roseta. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso, com 15 a 30 cm de profundidade (REINHARDT et al., 2000). O fruto é carnoso, tipo baga e infrutescência, no qual um aglomerado de gomos se funde num eixo central, e a partir de cada escama da casca se forma um fruto a partir de uma flor, no qual se fundem e formam um grande corpo (CUNHA; CABRAL, 1999; SILVA; TASSARA, 2001).

Comercialmente, as cultivares ‘Smooth Cayenne’ e ‘Pérola’ destacam-se no mercado nacional e internacional, apesar da existência de cerca de 30 cultivares de abacaxi produzidas como, por exemplo, Singapore Spanish, Queen, Española Roja, Pérola e Perolera (CUNHA, 2007; REIS et al. 2019).

Dentre as cultivares comercializadas no Maranhão, destaca-se o ‘Turiaçu’, que é originária da Microrregião do Gurupi, e ocorre no município de Turiaçu. A origem do abacaxi ‘Turiaçu’ ocorreu por seleção local, a qual os índios domesticaram, e logo após houve a propagação em larga escala por pequenos agricultores (ARAÚJO et al, 2007).

O fruto é altamente apreciado pelo mercado consumidor regional, devido a características de sabor e aroma, elevado teor de açúcares, peso médio e polpa amarela, além do elevado valor nutritiva e baixo teor calórico, possuindo característica que atraem o mercado consumidor (ARAÚJO et al, 2007; ARAÚJO et al., 2012; REIS et al., 2019). Com isso, o abacaxizeiro ‘Turiaçu’ foi considerado um bem cultural do Maranhão e imaterial do Brasil o Projeto de Lei nº 240/2014 (Assembléia Legislativa do Estado do Maranhão)

O abacaxizeiro ‘Turiaçu’ é uma planta com altura média de 62 cm, com fruto sincarpo de formato cilíndrico/cônico, com peso médio (sem coroa) de 1,558 g, comprimento do fruto (sem coroa) de 20,8 cm, diâmetro mediano e do eixo central do fruto de 10,4 cm e 2,5 cm, comprimento e peso da coroa de 14,4 cm e 61,1 g (ARAÚJO et al, 2012).

A coloração da casca e da polpa do fruto maduro do abacaxi ‘Turiaçu’ é amarela, o teor de sólidos solúveis totais (TSS) é de 16,1°brix, a acidez é de 0,38 % e o teor de açúcares/acidez possui elevada relação (42,3), o qual apresenta frutos com características físicas e físico-químicas adequadas para consumo *in natura* (ARAÚJO et al, 2012). Estas características organolépticas descritas foram reafirmadas por Reis et al. (2019), que ao

comparar as características biométricas e químicas do abacaxi das cultivares ‘Pérola’ e ‘Turiaçu’, observaram que o abacaxi ‘Turiaçu’ possui tamanho maior, formato mais cilíndrico e sabor mais doce com TSS 2,7°brix superior a cultivar ‘Pérola’.

A propagação do abacaxizeiro ‘Turiaçu’ ocorre por via assexuada, e tem como estruturas vegetativas: coroa, filhote, filhote-rebentão e rebentão. A produção de mudas do ‘Turiaçu’ é prioritariamente realizada com o tipo filhote, produzindo em média 11,3 mudas por plantas. A seleção de material de propagação é realizada de forma rigorosa, com finalidade de obter material livre de doenças e pragas (ARAÚJO et al, 2007; ARAÚJO et al., 2012).

Outra forma de obtenção do material para propagação de forma rápida, segura e em grande quantidade é por meio da propagação *in vitro*, no entanto, na literatura há um único relato recente do desenvolvimento de protocolo de micropropagação para a cultivar. O grupo do laboratório de Cultura de Tecidos localizado na UEMA (LCT/UEMA), tem desenvolvido trabalhos com o ‘Turiaçu’, por meio do explante de ápice caulinar em meio de cultura MS combinado com 2  $\mu\text{M}$  de ANA e 8  $\mu\text{M}$  BAP no estabelecimento (ALVES, 2022). Na etapa de multiplicação deste mesmo protocolo relatado, o autor apresentou melhores taxas em meio de cultura MS com 2  $\mu\text{M}$  ANA e 12  $\mu\text{M}$  BAP em biorreator de imersão temporária do tipo Plantform, e nas etapas de alongamento e enraizamento *in vitro*, foi demonstrado que a referida cultivar possui potencial fotoautotrófico, pelo desenvolvimento das plantas na ausência de sacarose em biorreator tipo Ralm (ALVES, 2022).

Apesar do relato recente do potencial da propagação *in vitro* para a cultivar ‘Turiaçu’, as técnicas de produção ainda são realizadas por propagação convencional, que por sua vez, são rudimentares e com baixa tecnologia, com espaçamento inadequado, pouca densidade de planta, o que leva a colheitas tardias e elevado estágio de maturação do fruto (ARAÚJO et al., 2012).

Vale salientar que o crescimento vegetativo de abacaxizeiro da cultivar ‘Turiaçu’ é favorecido pelas condições climáticas do local de origem (município de Turiaçu-MA), independente da fonte de adubação. Consequentemente, observa-se que o local de origem favorece o desenvolvimento das plantas devido a disponibilidade hídrica, que muitas vezes pode ser um fator limitante para a expressão do potencial genético da cultivar (RAMOS et al, 2020).

Pesquisas sobre aspectos botânicos, morfológicos e fitotécnicos da cultivar ‘Turiaçu’ iniciaram apenas em 2006, portanto, a cultivar ainda está em processo de domesticação e

desenvolvimento de tecnologias no processo produtivo, para obtenção de frutos com alta produtividade e padrão de qualidade.

Estudos básicos sobre ecologia, fisiologia, genética e biotecnologia de abacaxi ‘Turiaçu’ são incipientes e pouco publicados à comunidade científica. As informações sobre os estudos básicos serão importantes para uniformização da produção e oferta de produto, e por fim, alcance de novos mercados para expansão e estabelecimento da cadeia produtiva no estado.

## **2.2 Propagação *in vitro* de abacaxizeiro a partir de clusters nodulares**

A produção em larga escala de abacaxi depende de ferramentas biotecnológicas que viabilizem a produção de mudas, levando em consideração aspectos como: tempo reduzido de produção e qualidade fitossanitária (REINHARDT et al., 2018).

Como ferramentas biotecnológicas possíveis para superar os desafios da propagação convencional, destaca-se a propagação *in vitro* de plantas, que compreende o cultivo de fragmentos de tecidos vegetais em meio de cultivo nutritivo com reguladores de crescimento em condições assépticas, e em ambiente controlado (CARDOSO, 2014). Os métodos de micropropagação envolvem as etapas que podem ser caracterizadas pelo: (i) estabelecimento de plantas *in vitro* que engloba a seleção, (ii) desinfestação e cultivo em condições assépticas, (iii) cultivos sucessivos de propágulos e (iv) transferência de material produzido *in vitro* para enraizamento e transplante de mudas (MURASHIGE, 1974; GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Estudos sobre a propagação *in vitro* do abacaxizeiro iniciaram-se na década de 60 (AGHION; BEAUCHESNE, 1960), a partir desse momento, as pesquisas passaram a dar ênfase principalmente no desenvolvimento de protocolos eficientes de propagação *in vitro* dessa frutífera. Na literatura são encontrados relatos promissores sobre esta técnica para essa espécie, por meio de diferentes vias morfogênicas, como por exemplo, a embriogênese somática, que têm por finalidade estabelecer um sistema de propagação clonal mais eficiente baseado em balanços de reguladores com auxinas e citocininas no meio de cultivo, propiciando excelentes taxas de conversão de embriões somáticos por explante (KESSEL-DOMINI et al., 2022), além de diversos outros estudos com embriogênese somática e regeneração *in vitro* de abacaxi (FIROOZABADY; MOY, 2004; BENNICI et al., 2007; ZHAND et al, 2008; YAPO et al., 2011).

Outra via morfogênica aplicada em cultivos não somente de abacaxizeiro, mas de diversas espécies de bromeliáceas é a organogênese. Essa técnica tem por finalidade a formação de partes aéreas, raízes e regeneração *in vitro* de brotos via direta ou indireta. A organogênese indireta ocorre a partir da indução de calos nos explantes e posterior regeneração de gemas, enquanto a organogênese direta refere-se ao surgimento direto de brotos ou raízes a partir do tecido dos explantes (PHILLIPS; GARDA, 2019).

Diversos trabalhos com organogênese foram feitos com intuito de estabelecer protocolos de regeneração de brotos, com destaque ao uso de meio semi-sólido com concentrações de 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,05mg L<sup>-1</sup> ANA na regeneração *in vitro* enquanto que 5,0 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA para multiplicação de abacaxizeiro, e a melhor indução radicular foi obtida em 2,0 mg L<sup>-1</sup> AIB (ADEOYE et al., 2020). Outros trabalhos foram realizados para investigar essa via morfogênica (ALMEIDA et al., 2001; MERCIER et al., 2003; PASQUAL et al., 2008; ZURAIDA et al., 2011; LIMA et al., 2012)

Além das duas vias morfogênicas citadas, uma nova via foi descrita baseada em clusters nodulares (CNs) (TENG, 1997; RECH FILHO et al., 2005, ALVES et al., 2006, RECH FILHO et al., 2009; DAL VESCO et al., 2011; SCHERER et al., 2013; DAL VESCO et al., 2014 a, b; CORREDOR-PRADO et al., 2015; CORREDOR-PRADO et al., 2020). Essa via é definida como aglomerado de nódulos, amarelo esverdeados, friáveis ou levemente compactos que possuem regeneração em brotos (DAL VESCO; GUERRA, 2010).

A indução de clusters nodulares é amplamente estudada em Bromeliaceae com diferentes tipos de explantes, e combinações de reguladores de crescimento que propiciam diferente resposta nesta via morfogênica, além dos estudos anatômicos que servem para comprovar que os clusters nodulares diferem de outros processos de propagação *in vitro* (GAHAN; GEORGE, 2008).

Em sementes de *Vriesea reitzii*, o uso de auxina suplementado em meio de cultura promove inicialmente a germinação do embrião primário, e após isso, ocorre a indução de clusters nodulares, já as sementes estabelecidas em meio de cultura desprovido de reguladores propiciam a formação direta de plantas, além disso, ao caracterizarem os aspectos anatômicos da indução e formação de CNs em sementes, observaram que os meristemas estavam relacionados a raiz e parte aérea, a maior divisão celular e proliferação de células com características meristemáticas (CORREDOR-PRADO et al., 2015; CORREDOR-PRADO et al., 2020). Em contrapartida, bromeliáceas do mesmo gênero,

porém de espécies diferentes, apresentam respostas distintas. Em outros casos há inibição da germinação e indução de CNs em sementes inoculadas em meio com auxina, no entanto, com baixa conversão de brotos (DAL VESCO et al., 2014a).

Por outro lado, segmentos nodais cultivados em meios suplementados, tanto com auxina (thidiazuron, TDZ) quanto com a combinação de ANA e BAP, propiciam elevada taxa de indução de CNs (75%) e elevada conversão de brotos, demonstrando boa responsividade desse explante sendo comprovado com zonas meristemáticas com células pequenas e isodiamétricas com muita divisão celular (DAL VESCO et al., 2011).

Em segmentos foliares a combinação de auxinas e citocininas é bastante utilizada para promover a regeneração de brotos, além de ser o explante mais utilizado na indução de CNs (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006; DAL VESCO; GUERRA, 2010; DAL VESCO et al., 2014b). Scherer et al. (2013), ao estudarem a indução de CNs, multiplicação em biorreatores, e caracterização anatômica de segmentos foliares de abacaxizeiro obtiveram 65% da indução com uso de MS+2  $\mu\text{M}$  de ANA+8  $\mu\text{M}$  de BAP e observaram presença de zonas meristemáticas densas, constituídas de células pequenas e isodiamétricas, em fileiras, com citoplasma denso e pequenos vacúolos, ao fazer cortes em microbrotos desenvolvidos em biorreator de imersão permanente (RITA), observaram células com grandes vacúolos e primórdios foliares com tricomas e estômatos.

Dal Vesco et al., (2010) ao estudarem protocolo regenerativo baseado na indução e desenvolvimento de CNs em folhas de *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae), fizeram análises estruturais das CNs, e observaram proliferação de multi células meristemáticas e formação de eixo unipolar, com isso os autores afirmaram que a CNs são classificadas como um sistema intermediário entre a embriogênese somática e organogênese. Na ES encontra-se protoderme, células nucleadas, vacúolos aparentes e eixos bipolares, já na organogênese, há a presença de meristemoides, zonas meristemáticas e eixo unipolares. Em clusters nodulares, há a combinação dos padrões anatômicos das duas vias, com presença de zonas meristemáticas, policentros, células nucleadas com vacúolos aparentes e formação de eixos unipolares (Dal Vesco and Guerra 2010; Scherer et al. 2013; de Souza et al. 2017; Corredor-Prado et al. 2020).

As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento responsáveis tanto pela indução de CNs quanto a regeneração de brotos em diferentes explantes, a combinação desses dois hormônios é responsável pela entrada nessa via morfogenética (MERCIER et al., 2003; LIAO et al., 2004). A auxina é responsável pela divisão e alongamento celular,

que propicia o surgimento de raízes laterais e adventícias, e as citocininas estão relacionadas a indução de brotações axilares e superação da dominância apical (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Outros reguladores de crescimento que também têm um papel em processos morfogênicos e fisiológicos nas plantas são as poliaminas (PAs). Essas pequenas moléculas são definidas como compostos alifáticos policatiônicos do grupo amina que engloba putrescina, espermidina e espermina, sendo relatadas como as mais comuns em plantas (MINOCHA; MAJUMDAR; MINOCHA, 2014; TIBURCO et al., 2014).

Por estar envolvida em diversos processos e funções na planta, o conteúdo celular de poliamina está relacionado às diferentes formas de estresses e fases de crescimento na planta, além de ser considerada importante para tolerância do estresse, no entanto, essa molécula pode provocar danos por estresse, devido ao catabolismo de seus produtos (MINOCHA; MAJUMDAR; MINOCHA, 2014). Adicionalmente, a poliamina está envolvida nos processos de divisão celular, ES, organogênese, clusters nodulares, enraizamento, crescimento do tubo polínico, florescimento, senescência e redução da escaldadura em frutas (SCHERER et al., 2013; TIBURCIO et al., 2014; XIANG et al., 2022).

No geral, estudos reportam a putrescina como importante regulador na ES, desempenhando função chave na divisão celular por meio de estímulos do crescimento celular (DOUÉTTS-PERES et al., 2019), além de serem responsáveis pela regulação de ES (SILVEIRA et al., 2004), e substituírem as citocininas na germinação de embriões somáticos (CORRÊA et al., 2016).

A literatura cita o aumento da putrescina endógena em segmentos nodais inoculados em meios MS suplementados com BAP, e maior conversão de broto na organogênese quando comparado aos cultivos sem BAP, tal ação pode ser justificada pela modulação que este hormônio pode causar no metabolismo endógeno de poliaminas, além do que o aumento dos níveis das PAs ao fim dos cultivos, relaciona-se a intensa divisão celular na fase de crescimento e desenvolvimento de brotações (ARAGÃO et al., 2016).

Estudos investigaram a influência das PAs exógenas na indução de brotos e nos níveis de PAs endógenas, e constataram melhora na indução e alongamento de brotos, além do aumento do comprimento da parte aérea, que está relacionado aos níveis de espermidina e espermina (ARAGÃO et al., 2017). Em contrapartida, o menor teor de PAs também pode regenerar maior quantidade de brotos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2022). Outros trabalhos enfatizam o papel das poliaminas na organogênese, como formação de raízes, crescimento e

alongamento de brotos (DAVIS, 1997; TASSONI et al., 2000; FRANCISCO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2020; PESSANHA et al., 2022).

Em estudo com clusters nodulares, a ausência de poliaminas, principalmente a putrescina endógena em segmentos foliares de abacaxizeiro causa decréscimo na indução de CNs, demonstrando a necessidade do acúmulo de poliaminas endógenas no início do processo (SCHERER et al., 2013). Assim, a adição de poliaminas ao meio de cultivo poderá beneficiar o aumento de putrescina endógena para aumentar a produção de CNs.



## Referências

- ADEOYE, B. A.; LAWYER, E. F.; HASSAN, K. O.; ILESANMI, A. O.; RICHARD-OLEBE, T. C.; OYEDEJI, T. T.; ADEREMI, T. A.; AJONGBOLO, F. B.; ADEDEJI, A. A. Optimization of Plant Growth Regulator (PGR) on *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) var. Smooth Cayenne). **International Journal of Recent Research in Life Sciences**, v. 7, p. 13-20, 2020.
- AGHION, D.; BEAUCHESNE, G. Utilization de la technique de culture sterile d'organes pour des clones d'Ananas. **Fruits**, v.15, p.444-446, 1960.
- ALMEIDA, W. A. B. de; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. de C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 296-300, 2002.
- ALVES, G. L. Estabelecimento *in vitro* de abacaxizeiro cv. 'Turiagu' e potencial fotoautotrófico em diferentes sistemas de cultivo. 2022. 118p. **Tese** (Doutorado em Agroecologia) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, 2022.
- 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.
- ARAGÃO, V. P. M.; DE SOUZA RIBEIRO, Y. R.; Reis, R. S.; MACEDO, A. F.; FLOH, E. L. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 124, p. 611–620, 2015.
- ARAGÃO, V. P. M.; REIS, R. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Putrescine promotes changes in the endogenous polyamine levels and proteomic profiles to regulate organogenesis in *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 495-505, 2017.
- ARAÚJO, J. R. G.; MARTINS, M. R.; SANTOS, F. N. Fruteiras nativas - ocorrência e potencial de utilização na agricultura familiar do Maranhão. 2ed. In: MOURA, E.G. **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. São Luís: UEMA/IICA, p.257-312, 2007.
- ARAÚJO, J. R. G.; AGUIAR J. R, R.A.; CHAVES, A. M. S.; REIS, F. O.; MARTINS, M. R. Turiagu: a pineapple cultivar traditional and native from Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, p. 1270–1276, 2012.
- BENNICI, A.; MORI, B.; TANI, C.; BUSSI, B. Calogênese e organogênese em abacaxi: Um estudo histológico e ultraestrutural do desenvolvimento de calos e processos morfogênicos. **Avanços na Ciência da Horticultura**, v. 21 p. 19-27, 2007.
- CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, 2014.

COLLINS, J. L. The pineapple, botany, cultivation and utilization. New York: **Interscience Publishers**, p. 244, 1960.

CORRÊA, T. R.; MOTOIKE, S. Y. ; ANDRADE, A. P. S.; COSER, S. M.; QUEIROZ, V.; GRANJA, M. M. C.; CAETANO, D. D. N.; PENA, C.N.M.; PICOLI, E. A. T. Accelerated in vitro propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) By substituting cytokinin with putrescine. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 2767-2775, 2016.

CORREDOR-PRADO, J. P.; SCHMIDT, E. C.; GUERRA, M. P.; BOUZON, Z. L.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. Paludosa (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure** v. 3, p. 200-209, 2015.

CORREDOR-PRADO, J. P.; DE CONTI, D.; GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R. Dynamics of proteins, carbohydrates and global DNA methylation patterns during induction of nodular cluster cultures from seeds of *Vriesea reitzii*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 42, e42448, 2020.

CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, F. I. F. D.; OLIVEIRA, A. C. D. Das Américas para o mundo: origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1473–1483, 2010.

CTENAS, M. L. B.; QUAST, D. Abacaxi. In: (Ed.). **Frutas das terras brasileiras**. São Paulo: C2, p. 41-45, 2000.

CUNHA, G. A. P. da; CABRAL, J. R. S. Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: CUNHA, G. A. P. da; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. (Org.). O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília, DF: **Embrapa** Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 389-402, 1999.

CUNHA, G. A. P.. Equipe técnica de abacaxi comemorar 30 anos de atividades e realizações. Cruz das Almas: **Embrapa** mandioca e Fruticultura Tropical. (Documentos,170), 2007.

DALVESCO, L. L., GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 748–755, 2010.

DAL VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.128, p. 515-522, 2011.

DAL VESCO, L. L., PESCADOR, R., CORREDOR PRADO, J. P. WELTER, L. J.; GUERRA, M. P. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 3, p. 271-278, 2014a.

DAL VESCO, L. L.; VIEIRA, P. M.; CORREDOR PRADO, J. P.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P.; ELTER, L. J. Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, p. 542-548, 2014b.

DAVIS, D. G. Polyamines, auxins and organogenesis in leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 151, p. 603–609, 1997.

DOUÉTTIS-PERES, J. C.; ARAGÃO, V. P. M.; CRUZ, M. A. L.; REIS, R. S.; ELBL, P.; SANTOS, A. L. W. dos; FLOH, E. L. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Mps1 protein inhibition regulates the protein profile, nitric oxide, carbohydrate and polyamine contents in embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 138, p. 273–286, 2019.

FAOSTAT. (2021). Food and agriculture organization of the United Nations Production of pineapples: top 10 producers. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 10 jun. 2022.

FIROZABADY, E.; MOY, Y.; Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. **In vitro Cellular & Developmental biology**. v. 40, p. 67–74, 2004.

FRANCISCO, A. A.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; RAMOS, P. R. R.; LIMA, G. P. P. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1251-1257, 2008.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Micropropagation: uses and methods. In: **Plant Propagation by Tissue Culture**, Springer, Dordrecht, p. 29-64, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: Jain, S. M., Ochatt, S. J. (Eds.), **Protocols for in vitro Propagation of Ornamental Plants: Methods in Molecular Biology**. Humana Press-Springer, New York, p. 47–66, 2010.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Agrícola - Lavoura Temporária, 2021a. Acessado em 04/05/2022.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Produção Agrícola municipal, 202b. Acessado em 04/05/2022.

KESSEL-DOMINI, A.; PÉREZ-BRITO, D.; GUZMÁN-ANTONIO, A.; BARREDO-POOL, F. A; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; CORTÉS-VELÁZQUEZ, A.; CANTO-FLICK, A.; AVILÉS-VIÑAS, S. A.; RODRÍGUEZ-LLANES, Y.; SANTANA-BUZZY, N. Indirect somatic embryogenesis: an efficient and genetically reliable clonal propagation system for *Ananas comosus* L. Merr. Hybrid ‘MD2’. **Agriculture**, v. 12, p. 713, 2022.

LIAO Z.; CHEN, M.; TAN, F.; SUN, X.; TANG, K. Micropropagation of endangered Chinese aloe. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 76, p. 83-86, 2004.

LIMA, C. O. de C.; MARCHI, M. N. G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C. E.; BELLINTAN, M. C.; SANTANA, J. R. F. de. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, v. 42, p. 249-254, 2012.

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

MINOCHA, R.; MAJUMDAR, R.; E MINOCHA, S. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. **Plant Science**. v. 5, p. 175, 2014.

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

OLIVEIRA, T. dos R. de; ARAGÃO, V. P. M.; MOHARANA, K. C.; FEDOSEJEVS, E.; DO AMARAL, F. P.; DE SOUSA, K. R.; SANTA-CATARINA, C. Light spectra affect the *in vitro* shoot development of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) by changing the protein profile and polyamine contents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 2020.

PESSANHA, L. D. S.; ARAGÃO, V. P. M.; DE OLIVEIRA, T. D. R.; OLIVEIRA, T. dos R. de; DE SOUSA, K. R. de; SILVEIRA, V.; SANTA-CARTARINA, C. Benzyladenine affects polyamine contents and proteomic profiles during *in vitro* shoot development and *ex vitro* rooting in *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 151, p. 75–92, 2022.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Meios e práticas de cultura de tecidos vegetais: uma visão geral. **In vitro Cellular & Developmental Biolology-Plant**, v. 55, p. 242–257, 2019.

RAMOS, L. M.; REIS, F. O.; ARAUJO, J. R. G.; REIS, I. dos SANTOS; GONÇALVES, R. S.; JUNIOR, A. C. V. N. Vegetative development of Turiaçu pineapple under two ecological conditions in Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, e-625, 2020.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799–1808, 2005.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P.; Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic Forest. **Ciência Rural**, v.39, p. 909–912, 2009.

REINHARDT, D. H. R.; BARTHOLOMEW, D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; PÁDUA, T. R. P. de; JUNGHANS, D. T.; MATOS, A. P. de. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, p.1-22, 2018.

REIS, F. O.; ARAUJO, J. R. G.; BRAUN, H.; JUNIOR, A. C. V. N.; PEREIRA, A. P. A. Fruit quality of a traditional pineapple cultivar (Turiaçu) compared to the most popular cultivar (Pérola) in Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, p. 546–551, 2019.

SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H. P. de F.; VESCO, L. L. D.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *Comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHERER, R. F.; DE FREITAS, F.; HUGO, P.; KLABUNDE, G. F.; DA SILVA, D. A.; GUERRA, M. P. Global DNA methylation levels during the development of nodule cluster cultures and assessment of genetic fidelity of in vitro-regenerated pineapple plants (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 677–683, 2015.

SILVA, S.; TASSARA, H. Abacaxi. In: SILVA, S.; TASSARA, H. Frutas no Brasil. São Paulo: **Nobel**, p.25-27, 2001.

SILVEIRA, V., FLOH, E., HANDRO, W., AND GUERRA, M. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.76, p. 53–60, 2004.

SHAMIN, M. D.; KUMAR, M.; RANJAN, T.; RANJAN, R.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; KUMAR, V.; KUMAR, P. Importance of micropropagation in pineapple for disease free plantlets and rapid multiplication. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, p. 359–362, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. (6nd ed.) Trad. de E. R. Santarém. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TASSONI, A.; VAN BUUREN, M.; FRANCESCHETTI, M.; FORNALÈ, S.; BAGNI, N. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 383–393, 2000.

TEIXEIRA, J; CRUZ, A. R. R; FERREIRA, F. R; CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.3, p. 42-47, 2001.

TENG, W. L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 454–457, 1996.

TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BITRIÁN, M.; ALCÁZAR, R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, p. 1-18, 2014.

YAPO, E. S.; KOUAKOU, T. H.; KONE, M.; KOUADIO, J. Y.; KOUAME, P.; MERILLON, J. M. Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, p.196–204, 2011.

XIANG, F.; GAO, R.; CHEN, Y.; PANG, J.; LIU, S.; LINGHU, T. L.; RUI, Z.; WANG, Z.; XU, L. Exogenous putrescine and 1-methylcyclopropene prevent soft scald in ‘Starkrimson’ pear. **Postharvest Biology and Technology**, v. 193, p. 112035, 2022,

ZHANG, Y.Y.; HSU, H. J.; HUANG, W. L. Estabelecimento de sistema de indução de calos e regeneração de brotos a partir de gemas axilares em abacaxis comestíveis de Taiwan; **Revista Taiwanesa de Química Agrícola e Ciência de Alimentos**, v. 46, p. 49-56, 2008.

ZURAIIDA A. R.; NURUL SHAHNADZ A. H.; HARTEENI A.; ROOWI S.; CHE RADZIAH C. M. Z.; SREERAMANAN S.: A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 3859-3866, 2011.

## Capítulo II

---

Aplicação exógena de 6-benziladenina e putrescina afeta o crescimento e a estrutura de clusters nodulares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’

### Resumo

Clusters nodulares (CNs) é uma via morfogênética bastante utilizada na propagação *in vitro* de Bromeliaceas, e o uso de auxinas e citocininas permite a indução e regeneração destes de forma eficiente. Ademais, outra classe de regulares, como as poliaminas, em destaque a putrescina, pode contribuir para a eficiência da indução de CNs. Com isso o objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da aplicação da putrescina na indução, crescimento e estrutura de CNs pela combinação de 6-benzilaminopurina (BAP) (0 e 8  $\mu\text{M}$ ) e putrescina (PUT) (0, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ ). Segmentos de foliares induzidos em meio de cultura suplementado com 4  $\mu\text{M}$  de ANA, 8  $\mu\text{M}$  BAP e 100  $\mu\text{M}$  de PUT (B8P100) resultaram em uma taxa de indução de 56%, com formação de microbrotos via CNs, maior comprimento e número de folhas/microbroto. Os estudos morfoanatômicos revelaram que em B8P100 os CNs apresentaram tamanho volumoso, microbroto com folhas, e desenvolvimento de novas folhas ao longo da base do explante, e a formação de meristemóides com células pequenas dispostas em espiral. Os resultados indicam que auxinas e citocininas combinadas com putrescina exógena são eficientes para indução de CNs, e os estudos morfoanatômicos foram essenciais para caracterizar os eventos desta rota morfogênética pela combinação destes reguladores de crescimento, demonstrando que a aplicação de putrescina exógena é eficiente na regeneração por cluster nodulares.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, morfogênese *in vitro*, putrescina.



### Abstract

Nodular clusters (CNs) is a morphogenetic pathway widely used in in vitro propagation of bromeliaceae, and the use of auxins and cytokins allows their induction and regeneration efficiently, in addition, another class of regulations, such as polyamines, highlighting putrescine can contribute to the efficiency of CNs induction. Thus the objective of the present work was to study the influence of putrescin application on induction, growth and CNs structure by combining 6-Benzilaminopurin (BAP) and putrescin (put). Segments of induced leaf -induced culture medium with 4  $\mu\text{m}$  Ana, 8  $\mu\text{m}$  BAP and 100  $\mu\text{m}$  PUT (B8P100) resulted at a 56% induction rate, with microbrotos formation via CNS, longer length and number of leaves/ Microbroto. Morphoanatomic studies revealed that in B8P100 CNs showed bulky, microbroto with leaves, and development of new leaves along the base of the explaining, and in the same medium, the transverse sections revealed the formation of small cells arranged in spiral. The results indicate that auxins and cytokines combined with exogenous putrescin are efficient for induction of CNs, and morphoanatomic studies were essential to characterize the events of this morphogenetic route by combining growth regulators. The application of exogenous putrescin is effective in cluster regeneration.

**Keywords:** *Ananas comosus*, putrescine, morphogenesis *in vitro*

## 1. Introdução

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill), planta pertencente à família Bromeliaceae, possui frutos com elevada importância comercial, e é altamente apreciado por seu alto valor nutricional, pode ser consumido *in natura* ou processado (KESSEL-DOMINI et al., 2022). Dentre as principais cultivares comercializadas no Brasil destaca-se a ‘Smooth Cayenne’ e a ‘Pérola’, no entanto, outras cultivares surgem com características organolépticas elevadas e com excelente apelo comercial, como por exemplo, o abacaxizeiro cultivar ‘Turiaçu’ no estado do Maranhão (ARAÚJO et al., 2012).

A cultivar ‘Turiaçu’ é oriunda da Microrregião do Gurupi, no estado do Maranhão, que surgiu por seleção local, a partir de domesticação indígena, e seguida propagação por pequenos agricultores (ARAÚJO et al., 2007). No entanto, essa cultivar ainda passa por inovações no processo produtivo, e necessita de tecnologias que viabilizem a produção em larga escala, visto que apresenta sabor adocicado e polpa amarela com elevado valor nutritivo, quando comparada as outras cultivares (REIS et al., 2019).

Pelo grande apelo comercial, os métodos de propagação dessa espécie são estudados com o intuito de expandir e manter a área cultivada (NELSON; ASARE; ARTHUR JÚNIOR, 2015). Para isso, a propagação *in vitro* apresenta forte vantagem em relação aos métodos convencionais, pois acelera a propagação de novos genótipos, produz grande número de plantas com alta qualidade, e em curto espaço de tempo (REINHARDT et al., 2018).

Apesar da propagação *in vitro* trazer soluções quanto a sanidade das mudas, a técnica ainda é dispendiosa. Para isso, dentre as vias morfogênicas que são empregadas na propagação *in vitro*, outra via baseada em “clusters nodulares” (CN) foi descrita, sendo distinta da embriogênese somática e da organogênese (George et al., 2008). Essa via é definida como aglomerado de nódulos, amarelo esverdeados, friáveis ou levemente compactos (DAL VESCO; GUERRA, 2010). Estudos descrevem o sucesso na indução de clusters nodulares e a regeneração de brotos *in vitro* em vários tipos de explantes de Bromeliaceae, como por exemplo, em sementes de *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (CORREDOR-PRADO et al., 2015) e *Vriesea reitzii* (DAL VESCO et al., 2014a ; CORREDOR-PRADO et al., 2020), em segmentos nodais de *Billbergia zebrina* (DAL VESCO et al., 2011) e *Billbergia alfonso-joannis* (DE SOUZA et al., 2016) e folhas de *Vriesea reitzii* (ALVES; DAL VESCO; GUERRA, 2006; DAL VESCO; GUERRA, 2010; DAL VESCO et al., 2014b; CORREDOR-PRADO et al., 2015) e *Ananas comosus*

(SCHERER et al., 2013) com o incremento de auxinas e citocininas ao meio de cultivo, sendo estes responsáveis pela entrada nestas via morfogênica.

Para contribuir no desenvolvimento de clusters nodulares, uma classe de reguladores de crescimento que podem exercer papel são as poliaminas. Essas moléculas de baixo peso molecular são definidas como compostos policatiônicos do grupo amina, formada por hidrocarbonetos alifáticos que engloba putrescina (diamina), espermidina (triamina) e espermina (tetramina), que são relatadas como as poliaminas mais comuns em plantas, e estão relacionadas a regulação do desenvolvimento de plantas e ao estresse biótico e abiótico (PÁL et al., 2021; BANO; AMIST; SINGH, 2020; MUSTAFAVI et al., 2018). Além disto, está associada a formação de embriões somáticos durante o tratamento de maturação na ES (REIS et al., 2016), na organogênese pela formação de calos, raízes e folhas com uso de poliaminas exógenas (VIU et al., 2009), no amadurecimento de frutos (DOMINGUEZ et al., 2023) na germinação de sementes, na floração, reprodução sexual, senescência e desenvolvimento (BIONDI et al., 2022).

Em clusters nodulares, ainda não é conhecido o papel das poliaminas de forma clara, porém, sabe-se que a ausência de putrescina endógena reduziu a indução dos CNs em segmentos foliares de *Ananas comosus* (SCHERER et al., 2013). Como o intuito de compensar os níveis de putrescina endógena, adicioná-las ao meio de cultura torna-se uma alternativa promissora, para investigar qual o papel da putrescina na fase de indução de clusters nodulares e regeneração de brotos, visto que ainda não há relatos na indução de CNs e a literatura aponta que a adição da putrescina melhora a indução e alongamento de brotos na organogênese de *Cedrela fissilis* (Meliaceae) (ARAGÃO et al., 2017).

Aliados aos estudos de sucesso e regeneração de plantas por clusters nodulares, temos a anatomia nos trabalhos supracitados, que demonstra um padrão anatômico bem característico, como por exemplo, zonas meristemáticas, policentros e formação de eixos unipolares característicos desta via morfogênica (SCHERER et al., 2013; CORREDOR-PRADO et al., 2015; DE SOUZA et al., 2016; CORREDOR-PRADO et al., 2020).

O presente trabalho teve como objetivo estudar combinações 6-benzilaminopurina (BAP) e putrescina (PUT) na indução e caracterização morfoanatômica de clusters nodulares em abacaxizeiro cv. ‘Turiaçu’.

## 2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos - LCT da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís (latitude 2°35'32"S e longitude 44°13'47"O). Para isso, foram utilizadas brotações de abacaxizeiro 'Turiaçu' previamente estabelecidas *in vitro*, e subcultivadas sucessivamente em 30 ml de meio de MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (PhytoTechnology®, Lenexa, KS, USA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 4 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 2 µM de ácido naftalenoacético (ANA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica® Ltda, Jardim da Glória, SP, Brazil). O pH foi ajustado em 5,7 ± 0,1, e autoclavado a 121°C a uma pressão de 1,5 atm, por 15 minutos.

A partir das brotações de dois centímetros de comprimento foram obtidos segmentos foliares entre a terceira e a sétima folha das plantas, sendo estes cortados transversalmente com aproximadamente 1 cm, considerando a base foliar (SCHERER et al., 2013). Quatro segmentos foliares foram inoculados em placa de Petri (OLEN®, 90x15 mm) contendo 25 mL de meio MS, suplementados com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma-Aldrich®), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica®), 4 µM ANA (Sigma-Aldrich®), duas concentrações de BAP (0 e 8 µM) e três concentrações de putrescina (PUT, 0, 100 e 1000 µM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) foram adicionadas por filtroesterilização, a depender do tratamento (Tabela 1). O meio foi solidificado com 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), pH foi ajustado em 5,7 ± 0,1, e autoclavado a 121°C a uma pressão de 1,5 atm, por 15 minutos.

**Tabela 1.** Meios de cultura utilizados para indução de clusters nodulares em segmentos foliares de plantas de abacaxizeiro 'Turiaçu'.

Meios de cultura	Códigos
MS + 4 µM ANA + 0 µM BAP + 0 µM PUT	B0P0
MS + 4 µM ANA + 0 µM BAP + 100 µM PUT	B0P100
MS + 4 µM ANA + 0 µM BAP + 1000 µM PUT	B0P1000
MS + 4 µM ANA + 8 µM BAP + 0 µM PUT	B8P0
MS + 4 µM ANA + 8 µM BAP + 100 µM PUT	B8P100
MS + 4 µM ANA + 8 µM BAP + 1000 µM PUT	B8P1000

As placas de Petri com segmentos foliares permaneceram em sala de crescimento no escuro por sete dias com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 60% e posterior manutenção em condições luminosas sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro e intensidade luminosa de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provenientes de quatro lâmpadas tubulares do tipo LED branco (Diodos Emissores de Luz, T8, 9W, Avant, São Paulo - SP, Brasil).

Aos 45 dias após a inoculação (DAI) foram avaliadas: indução e oxidação de clusters nodulares (CNs, %), microbroto via CNs (%), número de microbroto/explante, comprimento de microbroto/explante (mm), número de folhas/microbroto e massa seca de CNs (g).

## **2.1 Caracterização morfoanatômica de segmentos foliares de plantas de abacaxizeiro Turiaçu *in vitro***

Para a caracterização morfológica, foram analisadas amostras dos explantes aos 7 e 21 e 45 dias após a inoculação (DAI) em condições de claro. As imagens foram capturadas utilizando estereoscópio (Biotika<sup>®</sup> L60T) equipado com uma câmera (Biotika<sup>®</sup> CMOS 5.0) para identificar eventos e estruturas referentes à morfologia dos clusters nodulares.

Para a caracterização anatômica, foram analisadas amostras dos explantes iniciais (tempo 0), aos 7 dias do cultivo no escuro e aos 7 e 45 dias após a inoculação (DAI) em condições de claro. As amostras foram fixadas em solução FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico), seguindo metodologia de Johansen (1940) durante 72 horas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol em série etílica (30%, 40%, 50%, 60% e 70%) durante 1 h, em seguida desidratadas novamente em série etílica de (80%, 90%, 95% e 100% durante 2 h à  $4^\circ\text{C}$ , cada, e posterior inclusão em historesina (Historesin<sup>®</sup>, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a montagem das lâminas, cortes transversais com  $5 \mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo (Lupetec modelo MRP2015). Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro, secos à temperatura ambiente e corada com azul de toluidina (0,05% em pH 4,0) (O'Brien; McCully, 1981) por 8 min. As imagens foram capturadas em microscópio (Global Optics<sup>®</sup> modelo NO226T) equipado com câmera (Biotika<sup>®</sup> CMOS 5.0).

## 2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com duas concentrações de BAP (0 e 8  $\mu\text{M}$ ) e três concentrações da poliamina putrescina (PUT, 0, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ ), totalizando seis tratamentos, oito repetições e unidade experimental composta por quatro segmentos foliares por placa. Para os dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados.

Para as variáveis indução e oxidação de clusters nodulares (CNs, %), microbroto via clusters nodulares (CNs, %), número de microbroto/explante e comprimento de microbroto/explante (mm) foi aplicado  $y = \sqrt{x + 1}$  e para o número de folha/microbroto e massa seca de clusters nodulares (CNs, g) foi aplicado  $y = \sqrt{x + 0,5}$ .

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 3. Resultados

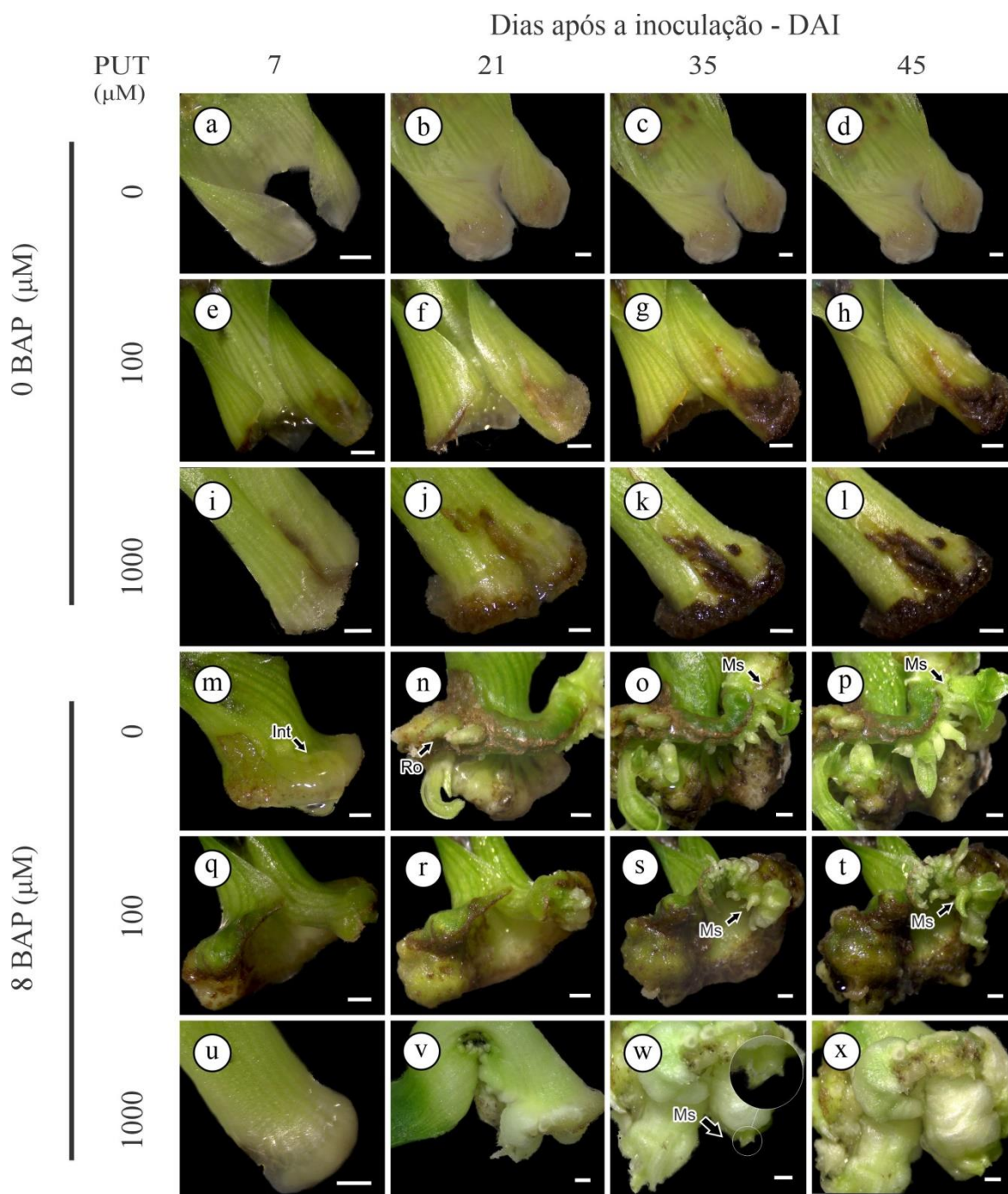
O meio de cultura MS + 4  $\mu\text{M}$  de ANA, nas concentrações de putrescina (0, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ ) (B0P0, B0P100 e B0P1000) não tiveram resposta quanto à entrada na via morfogênica de clusters nodulares. Em contrapartida, o mesmo meio associado com 8  $\mu\text{M}$  de BAP e as mesmas concentrações de putrescina (B8P0, B8100 e B81000), demonstraram alta eficiência na indução de clusters nodulares, ou seja, a combinação de ANA, BAP e PUT no meio de cultura foi responsável pela indução de clusters nodulares, e ficou evidente que o BAP de forma isolada, ou seja sem presença da auxina ANA, permitiria apenas a entrada na via da organogênese.

A partir da morfologia dos clusters nodulares, nós observamos que os segmentos foliares cultivados nos meios B8P0, B8P100 e B8P1000 foram mais responsivos a partir dos 7 DAI, compreendendo desde o intumescimento da base do explante até a formação de microbrotos (Figura 1m-1x). Em contrapartida, os segmentos foliares cultivados nos meios B0P0, B0P100 e B0P1000 não apresentaram resposta quanto à morfologia, somente início de diferenciação e oxidação na base do segmento foliar (Figura 1a-1l).

Aos 7 DAI, os segmentos foliares cultivados em meios B0P0 e B0P100 não apresentaram resposta, apenas quando cultivados em B0P1000 no qual houve início de intumescimento na base do segmento foliar (Fig 1a, 1e, 1i), o que também foi observado em

B8P0, B8P100 e B8P1000, e em B8P100, os calos eram mais mais compactos (Figura 1m, 1q, 1u).

Aos 21 DAI, os segmentos foliares cultivados nos meios B0P0, B0P100 e B0P1000 apresentaram início de intumescimento na base do segmento foliar (Figura 1b, 1f , 1j), e no meio B8P0 a base do segmento foliar estava mais intumescida com raízes e folhas aparentes, e início da diferenciação para formação de microbrotos (Figura 3n). Por outro lado, observamos formação de CNs mais compactos nos segmentos foliares cultivados B8P100 de cor amarelo-esverdeados, de tamanho volumoso e com aglomerado de células, indicando início formação de microbrotos (Figura 1r). O segmento foliar cultivado no meio B8P1000 apresentou base mais intumescida com formação de nódulos esbranquiçados (Figura 1v).



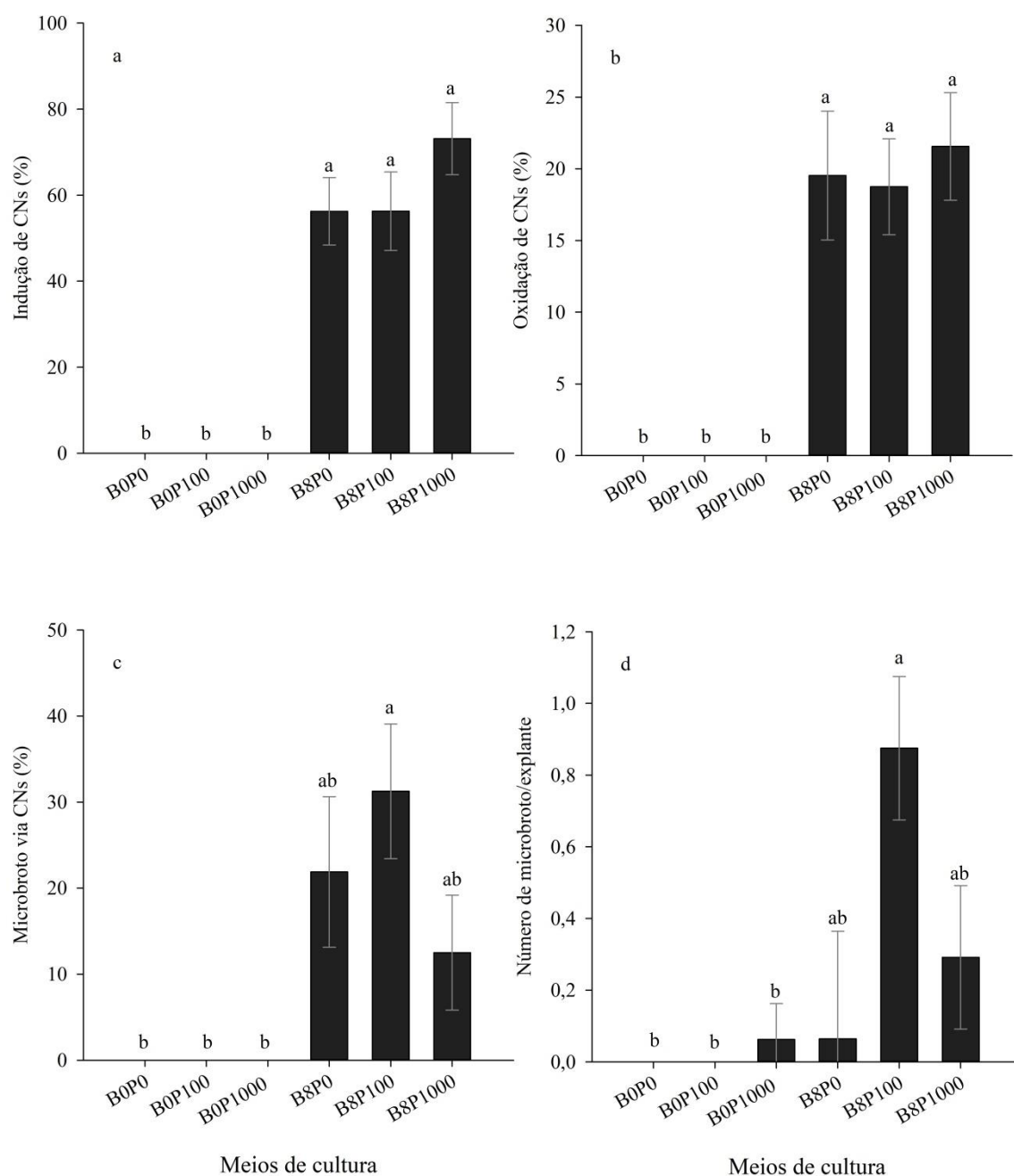
**Figura 1.** Segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiagu’ aos 7, 21, 35 e 42 dias após a inoculação (DAI), submetidos a concentrações de BAP (0 e 8  $\mu\text{M}$ ) e de PUT (0, 100 e 1000  $\mu\text{M}$ ) para indução de clusters nodulares aos 7 DAI, (A, E, I, M, Q e U); 21 DAI (B, F, J, N, R e V); 35 DAI (C, G, K, O, T e W), e 45 DAI (D, H, L, P, U e X). Int= Intumescimento; Ro= Raízes; Ms= microbrotos. Barras = 1 mm.



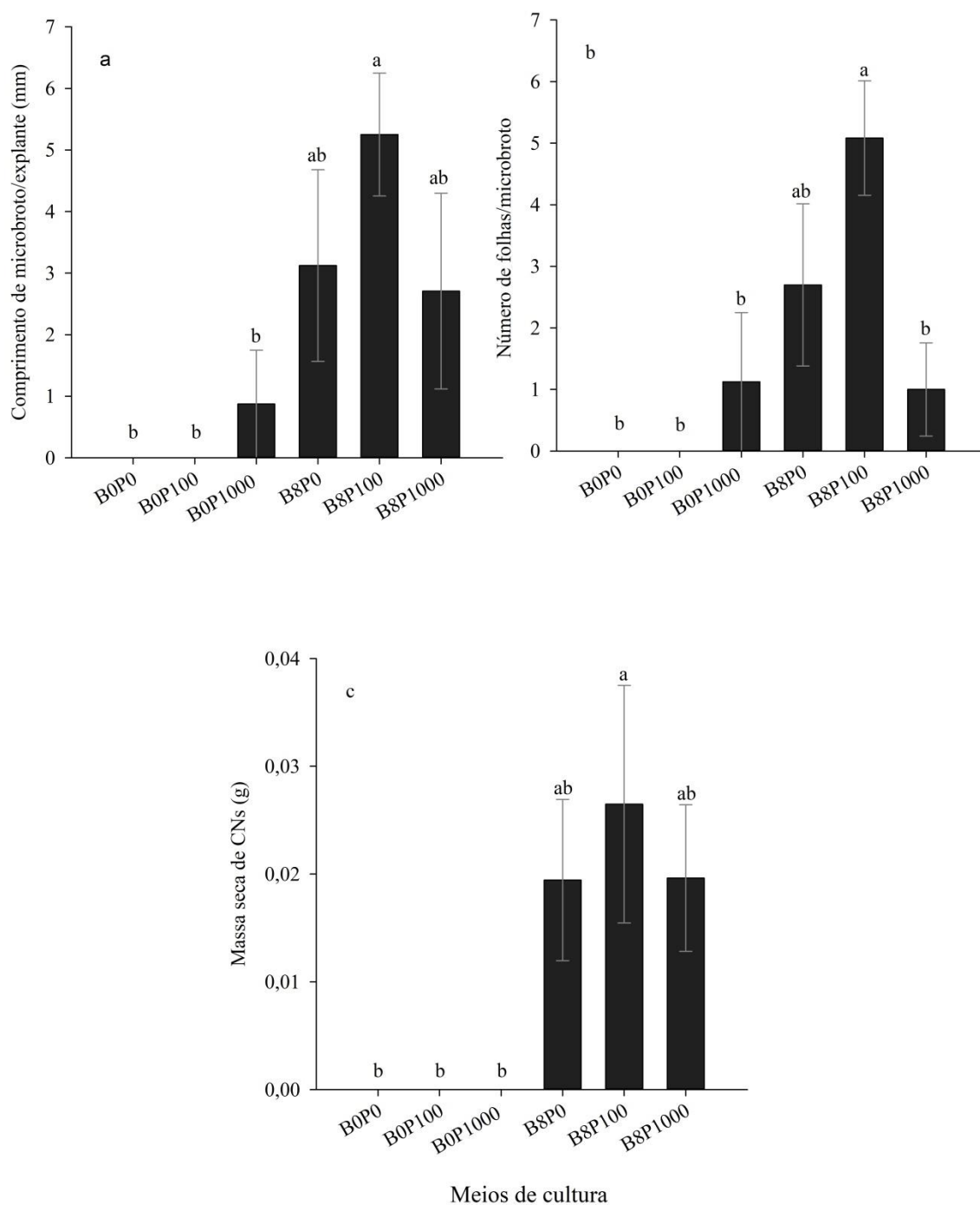
Aos 35 e aos 45 DAI, nós observamos um padrão morfológico semelhante nos segmentos foliares. Os meios B0P0, B0P100 e B0P1000 apresentaram oxidação e estagnação do intumescimento na base (Figura 1c, 1g, 1k, 1d, 1H e 1L), mas aqueles cultivados em B8P0 apresentaram CN de tamanho volumoso, com leve oxidação, proeminência de microbrotos com folhas, além do desenvolvimento de novas folhas ao longo da base do explante (Figura 1o e 1P). Quando cultivado no meio B8P100, o segmento foliar apresentou formação de nódulos volumosos por toda a base, com coloração verde escura e significativa oxidação, parte da base da folha apresentou um aglomerado de formação de microbrotos (Figura 3s, Ms e 1t). Por outro lado, no meio B8P1000, o segmento foliar apresentou CN de textura compacta e esbranquiçada com microbroto na base (Figura 1w e 1x).

Os clusters nodulares apresentaram variações quanto à indução, conforme a combinação de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. A indução de CNs foi eficiente apenas quando os segmentos foliares foram inoculados em meios B8P0, B8P100 e B8P1000, com destaque para o meio B8P1000, que apresentaram 73% de indução de CNs, com incremento de 17%, quando comparados aos meios B8P0 e B8P100 (56% para ambos) (Figura 2a). Ainda, nós observamos oxidação de CNs nos meios B8P0, B8P100 e B8P1000, com destaque para o meio B8P1000 (21%, Figura 2b).

A maior conversão de microbrotos via CNs foi observada em segmentos foliares cultivados em meio B8P100 (31%) (Figura 2c). O meio B8P100 apresentou um maior número de microbroto/explante (Figura 2d) e maior comprimento, com 5,25 mm (Figura 3a), e cinco folhas/microbroto (Figura 3b), confirmando melhor conversão dos CNs em microbrotos. Ainda, CNs produzidos neste meio tiveram massa seca de 0,02 g, apresentando diferença significativa dos meios com ausência de BAP (B0P0, B0P100 e B0P1000) (Figura 3c).



**Figura 2.** Indução de clusters nodulares (A), oxidação de clusters nodulares (B), microbrotos via clusters nodulares (C) e número de microbrotos/explante (D) de segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’, aos 45 dias do cultivo *in vitro*, nos meios B0P0, B0P100, B0P1000, B8P0, B8P100 e B8P1000. \*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8).



**Figura 3.** Comprimento de microbroto/explante (mm) (A), número de folhas/explante (B), massa seca de clusters nodulares (C) de segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’, aos 45 dias do cultivo *in vitro*, nos meios B0P0, B0P100, B0P1000, B8P0, B8P100 e B8P1000 \*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8).

A caracterização anatômica dos CNs a partir de segmentos foliares foi realizada para determinar respostas morfogênicas durante a entrada nessa via (Figura 4). Para isso, nós observamos que nos segmentos foliares de B8P0 e B8P100 houve formação de meristemoides (Figura 4o, 4p, 4s e 4t), no entanto, segmentos foliares em meio B8P1000 apresentaram apenas intensa divisão celular (Figura 4w e 4x).

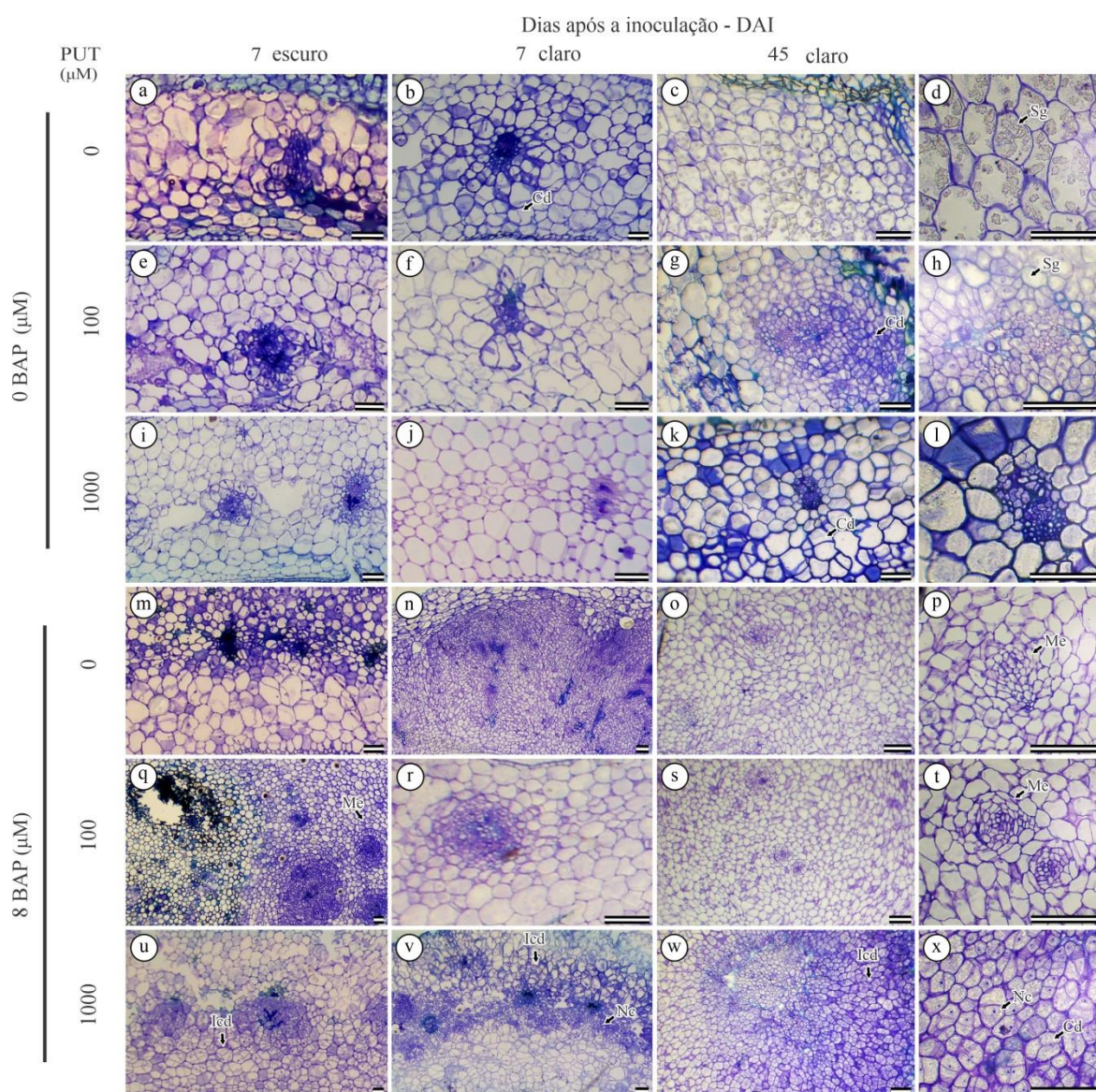
Aos 7 DAI do cultivo no escuro, a secção transversal dos segmentos foliares cultivados em meios B0P0 apresentaram células do parênquima paliçádico mais alongadas, e o parênquima lacunoso com células mais arredondadas (Figura 4a) e no meio B0P100, as células destes parênquimas apresentaram-se mais arredondadas (Figura 4e). No meio B0P1000, observamos espaços próximos da faixa no qual estão dispostos os feixes vasculares (Figura 4i). Já no meio B8P0, observamos pouca divisão celular no parênquima lacunoso, com células dispostas em ângulo assimétrico. Na secção transversal dos segmentos foliares mantidos em meio B8P100 observamos meristemoides ao longo do tecido, com células dispostas em espiral (Figura 4q), e em B8P1000 observamos divisão celular intensa no parênquima lacunoso (Figura 4u).

Aos 7 DAI do cultivo em claro, as secções dos segmentos foliares do meio B0P0 apresentaram divisão celular próximo ao feixe vascular (Figura 4b), em B0P100 e B0P1000 observamos o feixe vascular (Figura 4f e 4j). Os segmentos foliares do meio B8P0 apresentaram secções com divisão celular desordenada ao longo de todo o tecido e células com núcleo (Figura 4n), no B8P100 apenas vista do feixe vascular (Figura 4r), já na secção do meio B8P1000 observamos intensa divisão celular no parênquima paliçádico e lacunoso e células com núcleo aparente nas faixas onde estão dispostos os feixes vasculares (Figura 4v).

Aos 45 dias, os segmentos foliares mantidos em B0P0 apresentaram secções com células grandes em formato mais alongado, e presença de estruturas de reserva próximas à epiderme que corresponde a grânulos de amido (Figura 4c e 4d). Já nos segmentos foliares mantidos em meio B0P100, nós observamos células com divisão celular ativa em ângulo longitudinal e transversal próximo ao feixe vascular, no entanto, a divisão não progrediu para início da morfogênese (Figura 4g), e ainda observar presença de estrutura de reserva (Figura 4h). Em B0P1000, nós observamos início de divisão celular próximo ao feixe vascular, e células com formato arredondado (Figura 4k e 4l).

No meio com B8P0 a secção transversal dos segmentos foliares apresentou células grandes, com formato irregular e núcleo aparente, além da formação de meristemoides ao

longo do tecido (Figura 4o), meristemoides estes com características de elevado número de células pequenas e amontoadas, com núcleo aparente (Figura 4p), e em B8P100, nós observamos regiões mais densas, com presença de meristemoides ao longo do tecido e células alongadas com formato irregular (Figura 4 s), estes meristemoides apresentaram células pequenas dispostas em espiral, com núcleo aparente (Figura 4t) e em B8P1000, nós observamos intensa divisão celular assimétrica em ângulo longitudinal e transversal, e células com núcleo e nucléolo grandes e proeminentes (Figura 4w e 4x).



**Figura 4.** Caracterização anatômica de clusters nodulares oriundas de segmentos foliares de abacaxizeiro 'Turiaçu' aos 7 dias do escuro, 7 dias do claro e 45 dias após a inoculação (DAI), submetidos a concentrações de BAP (0 e 8 μM) e concentrações de PUT (0, 100 e 1000 μM); Secção transversal de segmento foliar aos 7 DAI no escuro (a, e, i, m, q e u); 7

DAI no claro (b, f, j, n, r e v) e aos 45 DAI (c, d, g, h, k, l, o, p, s, w e x). Sg= grânulo de amido; Cd= divisão celular; Me= meristemoide; Icd= intensa divisão celular; Nc= núcleo; Barras = 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Discussão

No presente estudo, a indução de clusters nodulares e regeneração de microbrotos foi obtida em segmentos foliares de abacaxizeiro ‘Turiaçu’ cultivados em meios de cultura com presença de 4  $\mu\text{M}$  de ANA, 8  $\mu\text{M}$  de BAP e 100  $\mu\text{M}$  de PUT (B8P0, B8P100 e B8P1000), efeito contrário foi obtido em segmentos foliares cultivados em meios sem BAP, com presença apenas de 4  $\mu\text{M}$  de ANA e concentrações de PUT (B0P0, B0P100 e B0P1000). Ficou evidente que, a presença de 4  $\mu\text{M}$  de ANA, combinada com 8  $\mu\text{M}$  de BAP e PUT no meio de cultura foi essencial para indução das clusters nodulares, pois a adição de PUT ao meio de cultura sem BAP e ANA não induziu respostas na formação de clusters nodulares, tão pouco de regeneração em microbroto.

Alguns autores relatam que a alta eficiência na indução das culturas nodulares em sementes, explantes foliares e segmentos nodais em espécies de Bromeliaceae e em abacaxizeiro devem-se ao efeito combinado de citocininas e auxinas (TENG, 1997; RECH FILHO et al., 2009; SCHERER et al., 2013; CORREDOR-PRADO et al., 2015). O efeito da combinação de BAP e ANA foi observado por Scherer et al., (2013), ao induzirem CNs em explantes foliares de abacaxizeiro em meio com 8  $\mu\text{M}$  de BAP e 2  $\mu\text{M}$  de ANA obtiveram 65% de indução. Resposta mais elevada foi obtida por Corredor-Prado et al. (2015), ao induzirem CNs no mesmo tipo de explante em meio com 2  $\mu\text{M}$  de BAP e 4  $\mu\text{M}$  de ANA, no qual obtiveram 72% de indução, dessa forma o balanço entre os dois hormônios propicia boa resposta nesta via morfogenética.

Quanto as PAs endógenas, Aragão et al. (2016) relataram que a suplementação de BAP ao meio de cultura influência nas PAs endógenas, principalmente no aumento de PUT livre em segmentos nodais apicais de algumas espécies lenhosas, e conferem maior número de brotos por explante, quando comparada aos cultivos sem BAP; tais ações podem explicar os resultados obtidos no nosso estudo. No entanto, há relatos de que pode ocorrer o inverso, ou seja, a adição de poliaminas podem modular o conteúdo endógeno ou o metabolismo do BAP, e reduzir a taxa de regeneração de brotos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2022). Apesar das PAs serem consideradas reguladores de crescimento, o uso isolado destas moléculas não induz CNs.



A adição de PAs nos meios de cultura tem potencial de induzir o alongamento de broto em plantas. De fato, Aragão et al. (2017), ao adicionarem 2,5 mM de PUT obtiveram alongamento de brotos, e ao contabilizarem as PAs observaram aumento do conteúdo endógeno de PUT após o tratamento dos brotos com 2,5 mM de PUT em comparação ao controle (0 mM). Assim, no presente estudo, o meio B8P100 apresentaram maior comprimento de microbrotos quando comparado ao meio B8P1000.

Scherer et al. (2013), ao estudarem a indução de clusters nodulares e multiplicação de abacaxi em biorreatores, quantificaram o conteúdo endógeno de poliaminas nos CNs e observaram que a ausência de PUT nos tecidos causou um decréscimo em clusters nodulares, e relataram que o acúmulo de poliaminas endógenas no estágio inicial da morfogênese, resulta na intensa atividade metabólica celular, além do mais, o conteúdo endógeno de putrescina na planta passa por osmoregulação mais fina e influência nessa atividade.

Para outros autores, as PAs são conhecidas por regular a organogênese em plantas (BIONDI et al., 2022). Deste modo, os nossos resultados indicam que as PAs regulam as CNs. Os efeitos dos níveis de PUT exógenos e endógenos estão relacionados a morfogênese de brotos *in vitro* em algumas espécies, como em *Arabidopsis thaliana* (TASSONI et al., 2000), *Colocasia esculenta* (FRANCISCO et al., 2008), *Cariniana legalis* (LERIN et al., 2019), *Citrus limon* (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2022) e *Dalbergia Nigra* (PESSANHA et al., 2022).

Nós observamos que, nos eventos morfoanatômicos em segmentos foliares inoculados em meios de cultura B8P0, B8P100 e B8P1000 foram responsivos a partir dos 7 DAI, compreendendo desde o intumescimento da base do explante até a formação de microbrotos, com presença de meristemoides e intensa divisão celular. Os nódulos apresentaram cor amarelo-esverdeada, levemente oxidado de aspecto compactos e dispostos em forma aglomerada. Os eventos morfológicos descritos são similares aos observados em *Ananas comosus* (SCHERER et al., 2013), porém, estes autores observaram em combinações de reguladores de crescimento diferentes do que nós trabalhamos.

Na indução de folhas de *V. reitzii* houve a formação de protruções amarelo-esverdeadas na região basal das folhas (RECH FILHO et al., 2005). Na mesma espécie, os nódulos apresentaram cor amarela esverdeados, aspecto friável ou levemente compacta dispostos de forma aglomerada, quanto ao padrão anatômico os autores observaram células semelhantes ao estágio inicial da embriogênese, no entanto, ao longo da diferenciação está a formação de eixos unipolares (DAL VESCO; GUERRA, 2010).

Corredor-Prado et al. (2015), ao induzirem CNs em folhas de *V. reitzii* (Bromeliaceae) e realizarem estudos histológicos, observaram aos 14 dias do cultivo *in vitro* secções com formação de algumas regiões mais densas pela proliferação de células na base do explante, e aos 28 dias observaram células com núcleo e vacúolo aparente, tais respostas indicam células com feições meristemáticas que podem estar relacionadas a posterior formação de eixo unipolar; resultado semelhantes obtido em segmentos foliares cultivados em meio B8P100 no presente estudo.

No nosso estudo, os CNs apresentam rota morfogenética intermediária entre a organogênese e a embriogênese somática, pois os primeiros eventos na morfogênese em CNs são semelhantes ao estágio inicial da embriogênese, no entanto, ao longo da diferenciação, essa rota apresenta formação de eixos unipolares diferente da embriogênese que possui eixo bipolar, semelhante a Dal Vesco e Guerra (2010). Souza et al. (2016), por meio do estudo da morfo-histodiferenciação em segmentos nodais de *Billbergia alfonso-joannis* (Bromeliaceae) obtiveram policentros, regeneração a partir de eixos unipolares durante o desenvolvimento e formação de nódulos secundários a partir de nódulos pré-existent, afirmaram ainda que os estudos desta natureza servem para comprovar que os clusters nodulares diferem de outros processos de propagação *in vitro*.

Portanto, a partir desse trabalho podemos estudar de maneira inédita uma nova via morfogenética para o abacaxi ‘Turiaçu’, que futuramente poderá contribuir para a produção em larga escala de plantas. No entanto, estudos futuros devem ser realizados, a fim de aprimorar a conversão de brotos e determinar conteúdo endógeno as poliaminas, a fim de investigar seu papel quando combinadas com outros reguladores.



## 5. Conclusão

O meio de cultura MS com adição de 4  $\mu\text{M}$  de ANA, 8  $\mu\text{M}$  de BAP e 100  $\mu\text{M}$  de PUT (B8P100) de fato foi crucial para a indução de CNs a partir de segmentos foliares de abacaxizeiro 'Turiaçu'. O meio B8P100 promoveu alta indução de CNs e formação de microbrotos, e a partir dos estudos anatômicos, formação de meristemoides, o que indica a competência para formação de microbrotos por esta via morfogênética. Ainda, tais informações poderão auxiliar na elucidação e entendimento da indução e regeneração nesta rota morfogênética (CNs) e beneficiará a produção eficiente de mudas de abacaxizeiro 'Turiaçu'. Ainda permanecem lacunas em nosso conhecimento sobre as PAs, desse modo investigações futuras serão necessárias não apenas sobre o conteúdo endógeno de poliaminas, mais estudos bioquímicos sobre metabolismo das PAs, além da caracterização molecular e expressão dos genes envolvidos em clusters nodulares, esses resultados servirão para elucidar o papel das PAs em clusters nodulares.

## Referências

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.

ARAGÃO, V. P. M., de Souza Ribeiro, Y. R.; Reis, R. S.; MACEDO, A. F.; FLOH, E. L. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 124, p. 611–620, 2015.

ARAGÃO, V. P. M.; REIS, R. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Putrescine promotes changes in the endogenous polyamine levels and proteomic profiles to regulate organogenesis in *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 495-505, 2017.

ARAÚJO, J. R. G.; MARTINS, M. R.; SANTOS, F. N. Fruteiras nativas - ocorrência e potencial de utilização na agricultura familiar do Maranhão. 2ed. In: MOURA, E.G. **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. São Luís: UEMA/IICA, p. 257-312, 2007.

ARAÚJO, J. R. G.; AGUIAR J. R, R.A.; CHAVES, A. M. S.; REIS, F. O.; MARTINS, M. R. Turiaçu: a pineapple cultivar traditional and native from Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, p. 1270–1276, 2012.

BARON, K. N.; STASOLLA, C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 44, p. 384-395, 2008.

BANO, C.; AMIST, N.; SINGH, N. B. Chapter 18 - Role of polyamines in plants abiotic stress tolerance: Advances and future prospects, 2020. In: TRIPATHI, D. K.; PRATAP, SINGH, V.; CHAUHAN, D. K.; SHARMA, S.; PRASAD, S. M.; DUBEY, N. K.; RAMAWAT, N. (eds) **Plant Life Under Changing Environment**. Academic Press, p. 481-496, 2020.

BIONDI, S.; ANTOGNONI, F.; MARINCICH, L.; LIANZA, M.; TEJOS, R.; RUIZ, K.B. The polyamine “multiverse” and stress mitigation in crops: A case study with seed priming in quinoa. **Scientia Horticulturae**, v. 304, p. 111292, 2022.

**Não há fontes bibliográficas no documento atual.**

CORREDOR-PRADO, J. P.; SCHMIDT, E. C.; GUERRA, M. P.; BOUZON, Z. L.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. Paludosa (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, p. 200-209, 2015.

CORREDOR-PRADO, J. P.; DE CONTI, D.; GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R. Dynamics of proteins, carbohydrates and global DNA methylation patterns during induction of nodular cluster cultures from seeds of *Vriesea reitzii*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 42, p. e42448, 2020.

DALVESCO, L. L., GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodule cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 748–755, 2010.

DAL VESCO, L. L.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. (2011). Induction and scale-up of *Bilbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.128, p. 515-522, 2011.

DAL VESCO, L. L., PESCADOR, R., CORREDOR PRADO, J. P. WELTER, L. J.; GUERRA, M. P. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v.3, p. 271-278, 2014a.

DAL VESCO, L. L.; VIEIRA, P. M.; CORREDOR PRADO, J. P.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P.; ELTER, L. J. Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, p. 542-548, 2014b.

DE SOUZA, T. V.; THIESEN, J. F.; LANDO, A. P.; GUERRA, M. P.; SANTOS, M. Morpho-histodifferentiation of *Bilbergia* Thunb. (Bromeliaceae) nodular cultures. **Protoplasma**, v. 254, p. 435–443, 2016.

DOMÍNGUEZ, C.; MARTÍNEZ, Ó.; NIETO, Ó.; FERRADÁS, Y.; GONZÁLEZ, M. V.; REY, M. Involvement of polyamines in the maturation of grapevine (*Vitis vinifera* L. ‘Mencia’) somatic embryos over a semipermeable membrane. **Scientia Horticulturae**, v. 308, p. 111537, 2023.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, p. 109-112, 2014. Disponível: ISSN 1413-7054.

FRANCISCO, A. A.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; RAMOS, P. R. R.; LIMA, G. P. P. Reguladores vegetais e teores endógenos de poliaminas durante o desenvolvimento de taro cultivado *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1251- 1257, 2008.

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

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Micropropagation: uses and methods. In: **Plant Propagation by Tissue Culture**, Springer, Dordrecht, p. 29-64, 2008.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York, 1940.

KESSEL-DOMINI, A.; PÉREZ-BRITO, D.; GUZMÁN-ANTONIO, A.; BARREDO-POOL, F. A.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; CORTÉS-VELÁZQUEZ, A.; CANTO-FLICK, A.; AVILÉS-VIÑAS, S. A.; RODRÍGUEZ-LLANES, Y.; SANTANA-BUZZY, N. Indirect somatic embryogenesis: an efficient and genetically reliable clonal propagation system for *Ananas comosus* L. Merr. Hybrid ‘MD2’. **Agriculture**, v. 12, p. 713, 2022.

LERIN, J.; ARAGÃO, V. P. M.; REIS, R. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. Proteomic profile and polyamine contents are modulated by light source to promote *in vitro* shoot development in *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze (Lecythidaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 329–342, 2019.

MARTIN-TANGUAY, J. Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. **Physiology Plant**, v. 100, p. 675–688; 1997.

MUSTAFAVI, S. H.; BADI, H. N.; SEKARA, A.; MEHRAFARIN, A.; JANDA, T.; GHORBANPOUR, M.; RAFEE, H. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 10, p. 102, 2018.

NELSON, B. J.; ASARE, P. A.; ARTHUR JUNIOR, R. In vitro growth and multiplication of pineapple under different duration of sterilization and different concentrations of benzylaminopurine and sucrose. **Biotechnology, Faisalábád**, v.14, n.1, p.35-40, 2015.

O'BRIEN, T.; MCCULLY, M. The study of plant structure principles and selected methods, 1st ed. Termarcarphi Pty Ltda., Melbourne, Australia, 1981.

PÁL, M.; SZALAI, G., GONDOR, O. K.; JANDA, T. Unfinished story of polyamines: Role of conjugation, transport and light-related regulation in the polyamine metabolism in plants. **Plant Science**, v. 308, p. 110923, 2021.

PESSANHA, L. D. S.; ARAGÃO, V. P. M.; DE OLIVEIRA, T. D. R.; OLIVEIRA, T. dos R. de; DE SOUSA, K. R. de; SILVEIRA, V.; SANTA-CARTARINA, C. Benzyladenine affects polyamine contents and proteomic profiles during *in vitro* shoot development and *ex vitro* rooting in *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 151, p. 75–92, 2022.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M.; CELDRÁN-SÁNCHEZ, V.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; PÉREZ-TORNERO, O. Assessment of the polyamines modulation on cytokinins and ethylene and its effect in lemon (*Citrus limon*) de novo regeneration. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 165–175, 2022.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MÜLLER, C. V.; GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799–1808, 2005.

REINHARDT, D. H. R.; BARTHOLOMEW, D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; PÁDUA, T. R. P. de; JUNGHANS, D. T.; MATOS, A. P. de. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, p.1-22, 2018.

REIS, R. S.; VALE E. DE M.; HERINGER, A. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA V. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal Proteomics**, v. 130, p. 170-9, 2016.

REIS, F. O.; ARAUJO, J. R. G.; BRAUN, H.; JUNIOR, A. C. V. N.; PEREIRA, A. P. A. Fruit quality of a traditional pineapple cultivar (Turiaçu) compared to the most popular cultivar (Pérola) in Brazil. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.13, p. 546–551, 2019.

SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; FRAGA, H. P. de F.; VESCO, L. L. D.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHERER, R. F.; DE FREITAS, F.; HUGO, P.; KLABUNDE, G. F.; DA SILVA, D. A.; GUERRA, M. P. Global DNA Methylation Levels During the Development of Nodule Cluster Cultures and Assessment of Genetic Fidelity of In vitro-Regenerated Pineapple Plants (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 677–683, 2015.

TASSONI, A.; VAN BUUREN, M.; FRANCESCHETTI, M.; FORNALÈ, S.; BAGNI, N. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 383-393, 2000.

TENG, W. L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 454–457, 1996.

VIU, A. F. M.; VIU, M. A. O.; TAVARES, A. R.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 501-504, 2009.

## **Considerações finais**

---

No presente trabalho constatou-se que a indução das clusters nodulares em segmentos foliares de abacaxizeiro 'Turiaçu' ocorreu apenas nos meios com presença de auxina, citocinina e putrescina combinadas no meio de cultivo, com destaque ao meio de cultura o meio com 4  $\mu\text{M}$  de ANA, 8  $\mu\text{M}$  de BAP e 100  $\mu\text{M}$  de PUT (B8P100) teve melhores respostas quanto a indução de CNs, formação, comprimento e número de folhas de microbrotos. A caracterização morfoanatômica foi essencial para mostrar que no meio B8P100 os segmentos foliares apresentaram formação de nódulos volumosos por toda a base, com coloração verde escura e significativa oxidação, parte da base da folha, com aglomerado de microbrotos e a anatomia dos clusters nodulares mostrou formação de meristemoides nestes meios.

É possível considerar que este trabalho contribuirá para geração de conhecimento sobre esta nova via morfogenética em abacaxizeiro cv. 'Turiaçu' e tais descobertas permitirão elucidar o entendimento sobre a indução e regeneração nesta rota morfogenética (CNs) e beneficiará a produção eficiente de mudas de abacaxizeiro cv. 'Turiaçu'. Estudos bioquímicos sobre metabolismo das PAs, caracterização molecular e expressão dos genes envolvidos em CNs servirão para elucidar o papel das PAs nesta via morfogenética.