

## Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*

Anatomic modifications of micropropagated banana plants in response to *ex vitro* acclimatization

Frederico Henrique da Silva Costa<sup>I</sup> Evaristo Mauro de Castro<sup>II</sup> Moacir Pasqual<sup>III</sup>  
Jonny Everson Scherwinski Pereira<sup>III</sup> Cynthia de Oliveira<sup>IV</sup>

### RESUMO

Pesquisas acerca das modificações estruturais e fisiológicas inerentes ao processo de micropropagação são fundamentais para compreender os efeitos desta técnica, desenvolver protocolos mais eficientes e, sobretudo, reduzir perdas *ex vitro*. O objetivo neste trabalho foi avaliar e quantificar as modificações na anatomia foliar de bananeiras provenientes de micropropagação, durante a fase de aclimatização em casa de vegetação. Para tanto, brotações axilares de bananeira cv. Japira, provenientes da multiplicação *in vitro*, foram enraizadas em meio MS, acrescido de ANA (1mg L<sup>-1</sup>) e ágar (6g L<sup>-1</sup>), e mantidas à temperatura de 25°C±2°C e 16 horas de irradiância a 35µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por 35 dias. Posteriormente, as plantas foram submetidas a diferentes períodos de aclimatização (zero, 21, 42, 63, 84 e 120 dias) e avaliadas quanto à anatomia, por meio de seções transversais e paradermicas foliares. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Verificou-se que as maiores alterações anatômicas ocorrem após 42 dias do transplante *ex vitro*, com acentuado espessamento dos parênquimas clorofilianos e limbo foliar, bem como diferenciação da maioria dos tecidos. Quanto aos estômatos, estes estão distribuídos em ambas as faces da epiderme, com maior número na face abaxial e em folhas oriundas de primórdios foliares formados *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Musa* spp., cultura de tecidos, alterações estruturais, rustificação *ex vitro*.

### ABSTRACT

Researches about structural and physiological modifications in different stages of the micropropagation are fundamental to understand the effects of this technology to improve protocols and to reduce losses in the acclimatization.

The objective of this study was to assess and to quantify the variations in the foliar anatomy of micropropagated banana plants during the *ex vitro* acclimatization in greenhouse. Thus, axillary buds from *in vitro* multiplication of Japira cultivar, were rooted in MS medium, added of NAA (1mg L<sup>-1</sup>) and agar (6g L<sup>-1</sup>), and kept at room temperature (25°C ±2°C) under 16 hours photoperiod and irradiation of 35µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, for 35 days. Subsequently, the plants were submitted to different acclimatization periods (zero, 21, 42, 63, 84 e 120 days) being the leaf anatomy of the plants evaluated by transversal and paradermal sections. A completely randomized design was used. The largest anatomical alterations it were verified after 42 days of the transplantation to *ex vitro* conditions, with pronounced thickness of chlorophyllian parenchyma and leaf blade, as well, as the differentiation of the majority of foliar tissues. The stomata were distributed on both sides of the leaves, with higher number on the undersurface and on leaves formed from *in vitro* foliar primordia.

**Key words:** *Musa* spp., tissue culture, structural alterations, *ex vitro* hardening.

### INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, o cultivo de ápices caulinares e meristemas por meio do processo de micropropagação tem se constituído a base da propagação massal de mudas de bananeiras (GÜBBÜK & PEKMEZCI, 2004). Apesar de seus benefícios para a produção de mudas, o cultivo *in vitro*, sob as condições heterotróficas convencionais, promovem as

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CP 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: fredericohenrique@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

<sup>II</sup>UFLA, Lavras, MG, Brasil.

<sup>III</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica (PqEB). Av. W5 Norte (final), Brasília, DF, Brasil.

<sup>IV</sup>Curso de Agronomia, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

plantas o desenvolvimento de certas características morfofisiológicas, tais como reduzida deposição de cera epicuticular e diferenciação do mesofilo, feixes vasculares rudimentares e baixo controle de abertura e fechamento dos estômatos (CAPELLADES et al., 1990; ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO, 2003). Todas essas alterações são resultado de complexas condições formadas na atmosfera dos frascos de cultivo, incluindo reduzida irradiância, presença de carboidrato exógeno, baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub>, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas com o ambiente *ex vitro* (KODYM & ZAPATA-ARIAS, 1999; ARIGITA et al., 2002).

Todavia, embora essas modificações perdurem até os primeiros dias após o transplante *ex vitro*, as novas folhas formadas no novo ambiente serão mais adaptadas, tornando as plantas mais eficientes nos processos do desenvolvimento vegetal (SANDOVAL et al., 1994). Por essa razão, uma fase de aclimatização *ex vitro*, logo após as etapas de cultivo *in vitro*, é necessária e vantajosa, pois possibilita que alterações fisiológicas e, estruturais, adaptativas das plantas ao novo ambiente ocorram nas plantas (MARIN, 2003). Nesse sentido, a realização de estudos sobre as modificações induzidas nas diferentes etapas da micropropagação auxiliam significativamente, o desenvolvimento de técnicas mais eficazes de aclimatização (GONÇALVES et al., 2000; ROHR et al., 2003), além de contribuir para o melhor entendimento dos efeitos dessa técnica e ampliarem sua utilização.

O objetivo do trabalho foi avaliar e quantificar as modificações na anatomia foliar de bananeiras provenientes de micropropagação, durante a fase de aclimatização *ex vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no município de Lavras, localizado na Região Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil, a 918m de altitude, latitude 21°14' S e longitude 45°00' GRW, de abril a agosto de 2006. Como material vegetal foram utilizadas plantas micropropagadas de bananeira 'Japira' (AAAB), um híbrido resistente às principais doenças que acometem a cultura da banana nos dias atuais. As plantas foram obtidas a partir do alongamento e enraizamento *in vitro* de brotações axilares em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de ANA (ácido naftalenoacético) (1mg L<sup>-1</sup>) e ágar (6g L<sup>-1</sup>), a pH 5,8±0,1. Para tal, utilizaram-se frascos de 250mL, contendo 40mL de meio, quatro brotações por frasco e vedação com filme plástico transparente, os quais permaneceram em

sala de crescimento a 25°C±2°C e 16 horas de irradiância (35µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (fornecida por duas lâmpadas tubulares, Osram® 20W – Luz do dia especial).

Decorridos 35 dias *in vitro*, as plantas foram removidas dos frascos de cultivo, submetidas à lavagem e poda de suas raízes e, posteriormente à aclimatização *ex vitro*, nas quais foram aplicados os tratamentos. Para isso, empregaram-se tubetes de 0,3L, contendo terra de subsolo, casca de arroz carbonizada e Plantmax® HT (1:1:1 v v<sup>-1</sup>), acrescida de húmus de minhoca (50g L<sup>-1</sup>) e superfosfato simples (20g L<sup>-1</sup>). Após o transplante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação coberta por filme de polietileno transparente (150 microns), com sombreamento de 70% e nebulização intermitente. Quanto aos tratamentos, estes consistiram de plantas sob diferentes períodos de aclimatização (zero, 21, 42, 63, 84 e 120 dias), as quais foram avaliadas quanto à anatomia foliar.

Os estudos anatômicos foram conduzidos utilizando-se o terço médio da segunda folha expandida, coletadas de cinco plantas diferentes por tratamento, previamente fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) por 72 horas e conservadas em álcool etílico 70% (v v<sup>-1</sup>). Os cortes transversais e paradérmicos, obtidos em micrótomo de mesa manual e à mão livre, foram submetidos à clarificação com hipoclorito de sódio (1,0-1,25% de cloro ativo), tríplex lavagem em água destilada, coloração com azul de astra-safranina (transversais) e safranina 1% (paradérmicos) e, posteriormente, montados em lâminas semipermanentes com água glicerinada (KRAUS & ARDUIN, 1997). Nas seções transversais, com auxílio de microscópio Ken-a-vision 2100 e ocular micrométrica, foram feitas medições das epidermes e hipodermes, em suas faces adaxial e abaxial, dos parênquimas paliádico e esponjoso, na região após o terceiro feixe lateral, além de medidas da nervura foliar (feixe central). Para a caracterização dos estômatos, foi analisado o número de estômatos por mm<sup>2</sup> e os diâmetros polar e equatorial, obtidos em microscópio Olympus CBB e Ken-a-vision 2100.

O delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, e pelo menos 15 e 12 medições/observações para os cortes transversais e paradérmicos, respectivamente. Os dados obtidos foram analisados, utilizando o *software* estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000) e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. Embora os tratamentos estudados fossem de caráter quantitativo, optou-se pelo teste de médias devido, principalmente, ao alto número de variáveis avaliadas e para melhor visualização dos valores.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Espessura e organização dos tecidos

Quanto à organização do mesofilo, a bananeira é uma espécie classificada como dorsiventral ou bifacial, com o parênquima paliçádico voltado para

a epiderme adaxial e imediatamente abaixo da hipoderme adaxial, e o parênquima esponjoso dirigido à epiderme abaxial (Figuras 1a, c). Em adição, as células do parênquima paliçádico são tipicamente alongadas, dispostas em fileiras, apresentando uma ou mais camadas de células (a depender do ambiente de cultivo)

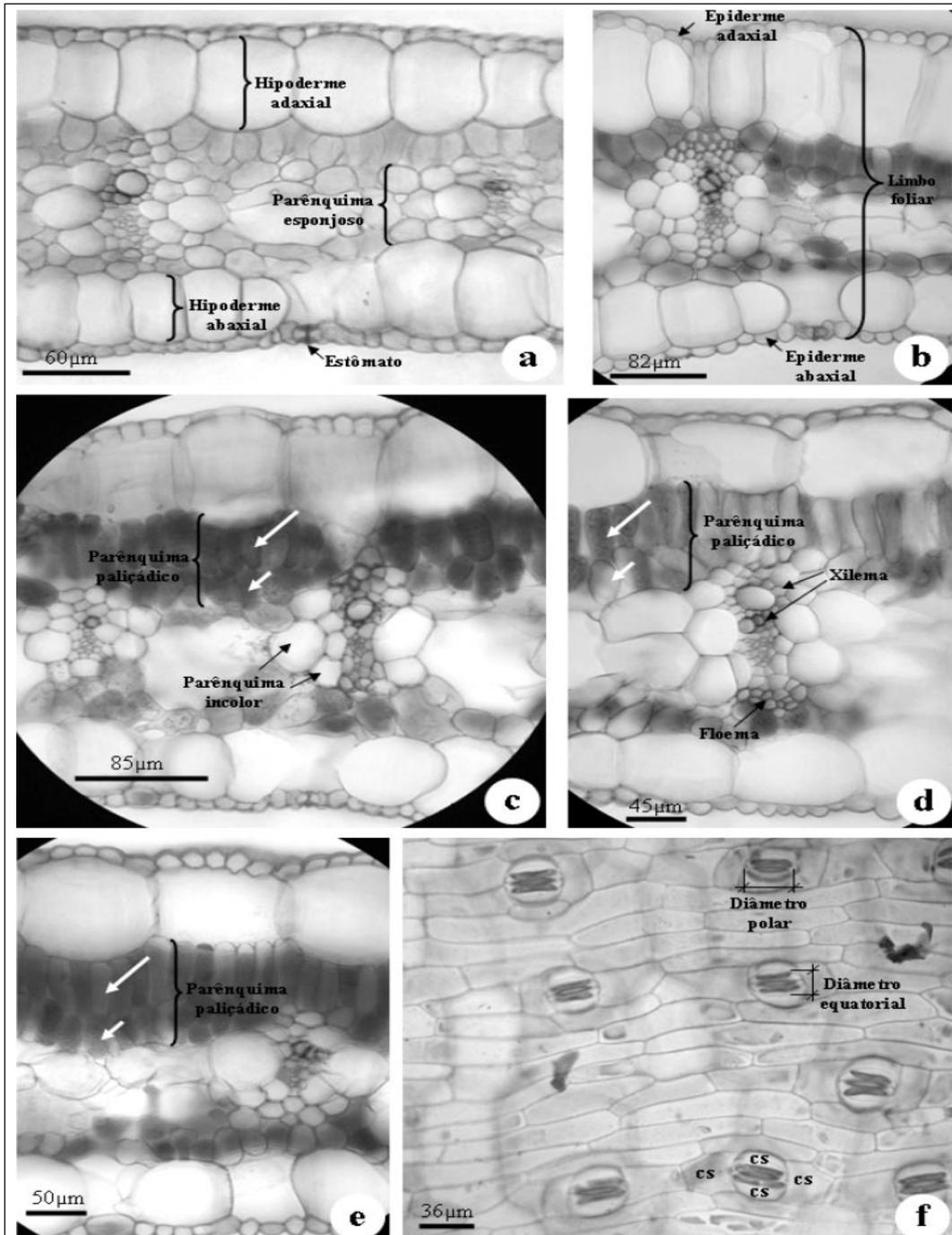


Figura 1 - Fotomicrografias de seções transversais e paradérmica da face abaxial de bananeira cultivar 'Japira' (AAAB) em diferentes períodos de aclimatização *ex vitro*: (a) zero dias (*in vitro*), (b) 21 dias, (c) 42 dias, (d) 63 dias, (e) 84 dias, e (f) 21 dias. Obs.: cs – células subsidiárias, setas maior e menor – primeira e segunda camadas de células de parênquima paliçádico.

(Figuras 1c – e). Por outro lado, no parênquima esponjoso, as células não são bem definidas (Figura 1a).

Com relação às características avaliadas, os resultados mostraram efeitos significativos do período de aclimatização no espessamento dos tecidos. Para as epidermes, menor espessura na face adaxial foi observada em plantas ao zero dia na aclimatização (ao final do enraizamento *in vitro*), após o qual, verificou-se espessamento significativo até os 42 dias (Tabela 1). De modo semelhante, a epiderme da face abaxial de plantas *in vitro* também apresentou menor espessamento, porém incremento significativo nesse tecido ocorreu apenas até os 21 dias *ex vitro*. Esses resultados são contrários àqueles reportados por PEREIRA (2004) para a espécie *Uncaria guianensis*, em que nenhuma diferença foi verificada na espessura da epiderme abaxial, durante a aclimatização, diferentemente da espécie *Uncaria tomentosa* que apresentou diferenças significativas. Em adição, os resultados obtidos, no presente trabalho, mostraram que a epiderme da face adaxial foi sempre mais espessa, se comparada à abaxial (Tabela 1), semelhante ao trabalho de PEREIRA (2004).

Quanto à espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, maiores espessamentos foram observados nas plantas aclimatizadas por 84 dias, diferentemente das plantas *in vitro* que apresentaram espessura significativamente menor (Tabela 1). O espessamento dos parênquimas em resposta ao período de aclimatização está de acordo com os resultados obtidos por PEREIRA (2004) e GONÇALVES et al. (2000) em plantas micropropagadas de *Uncaria* spp. e do híbrido de *Castanea sativa* x *C. crenata*. Nesse mesmo sentido, LEE et al. (2000) afirmam que a ocorrência de células paliçádicas mais alongadas constitui um padrão clássico de resposta e de

adaptação das plantas à alta intensidade de luz, evidenciando a plasticidade adaptativa ao novo ambiente.

Comportamento semelhante ao verificado para os parênquimas clorofilianos ocorreu também para a espessura da nervura central e limbo foliar (Tabela 1). Em relação às hipodermes, menor espessura de ambas as faces da epiderme foi observada nas plantas não aclimatizadas, as quais diferiram significativamente, comparadas as plantas aclimatizadas. Além disso, maior variação, durante a aclimatização ocorreu na hipoderme da face abaxial em detrimento da adaxial.

Acrescenta-se ainda que, de modo geral, as supostas folhas de transição (21 dias) e aquelas aos 42 dias de aclimatização tiveram certas similaridades, com pouca ou nenhuma distinção anatômica (Tabela 1, Figura 1b, c), possivelmente, por serem provenientes de primórdios foliares não totalmente diferenciados *ex vitro*. Nesse sentido, SANDOVAL et al. (1994) argumentam que o grau de transição e diferenciação em relação à anatomia foliar, durante a fase de adaptação *ex vitro* das plantas micropropagadas, está associado à quantidade e estágio de maturidade dos primórdios foliares remanescentes do cultivo *in vitro* no momento da transferência das plantas, bem como também às condições de estresse, às quais as plantas são submetidas. Foi observado também que diferenças mais acentuadas quanto à organização e diferenciação dos tecidos foliares ocorreram somente entre as plantas oriundas da fase final de enraizamento *in vitro* (Figura a) e aquelas aclimatizadas por período superior a 42 dias. Nesse aspecto, maior diferenciação foi verificada para o parênquima paliçádico, que apresentou células mais alongadas e a formação de uma segunda camada de células (Figura 1d, e), além do que os feixes vasculares tornaram-se maiores e mais diferenciados em resposta à aclimatização. Essas observações

Tabela 1 - Espessura dos tecidos foliares, feixe central e limbo foliar de bananeiras micropropagadas sob a influência do período de aclimatização.

Período de aclimatização (dias)	Epiderme adaxial	Epiderme abaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima esponjoso	Hipoderme adaxial	Hipoderme abaxial	Feixe central	Limbo foliar
	-----µm-----							
0	15,9 d	11,3 b	39,0 e	65,3 d	50,4 c	50,9 d	428,2 f	232,8 d
21	19,4 c	15,0 a	66,0 d	75,5 c	83,0 a	68,5 b	539,5 e	327,3 c
42	23,2 a	15,3 a	70,2 d	75,2 c	87,8 a	60,6 c	600,9 d	332,3 c
63	22,2 b	16,6 a	75,7 c	94,2 b	79,2 b	74,1 a	684,3 c	362,0 b
84	21,6 b	16,2 a	96,5 a	108,0 a	75,7 b	75,2 a	890,1 a	393,1 a
120	21,9 b	16,0 a	87,3 b	103,7 a	76,5 b	64,5 b	834,6 b	369,9 b
CV (%)	7,61	13,69	12,69	10,99	13,09	11,81	9,23	6,49

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

corroboram àquelas relatadas por ROMANO & MARTINS-LOUÇÃO (2003), segundo os quais, maior diferenciação do mesofilo em *Quercus suber* L. ocorreu em folhas formadas após a transferência das plantas para o substrato, que tiveram estrutura característica de plantas de sol, com pequenos espaços intercelulares, alta densidade de células paliçádicas (duas ou três camadas), além de incremento no desenvolvimento dos tecidos vasculares.

Adicionalmente, muitos dos resultados obtidos neste trabalho foram reportados em bananeiras 'Grande Naine' (AAA), submetidas a  $80\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $27^\circ\text{C}$  em sala de crescimento (SANDOVAL et al., 1994), que evidenciaram nessas plantas a presença de epiderme pouco espessa, com células, algumas vezes, irregulares em tamanho e com sinuosidades; hipoderme formada por extensas células; falta de diferenciação entre os parênquimas paliçádico e esponjoso; presença de feixes vasculares rudimentares e uma fina camada de cutícula. Contrariamente, plantas, com 90 dias *ex vitro*, apresentaram parênquima paliçádico constituído de duas camadas de células, sendo uma camada, acima, formada de células alongadas e outra, abaixo, com células mais isodiamétricas.

#### Estômatos

Em relação às características estomáticas, as folhas de bananeira apresentam estômatos do tipo tetracítico, caracterizados por possuir quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células-guarda e o par restante polar e, freqüentemente, menor (Figura 1f). Quanto à distribuição, os estômatos estão presentes em ambas as faces da epiderme, porém são mais numerosos na face abaxial (Tabela 2), razões que classificam a bananeira como anfi-hipoestomática e

corroboram com as observações de SANDOVAL et al. (1994) e ROCHA (2005), para as cultivares Grande Naine e Prata Anã.

Quanto ao número de estômatos por  $\text{mm}^2$ , resultados superiores para a face adaxial ocorreram nas plantas aos zero, 21 e 42 dias, as quais não apresentaram nenhuma diferença significativa entre si. De modo semelhante, maior número de estômatos por  $\text{mm}^2$ , na epiderme abaxial, também foi observado nas plantas *in vitro*, significativamente superior aos demais períodos de aclimatização (Tabela 2). Vários autores têm reportado a redução na densidade de estômatos em reposta ao período de aclimatização, sendo, inclusive, um processo característico dessa fase (LEE et al., 1985; 1988), provavelmente, em decorrência de um aumento na taxa de crescimento das células epidérmicas e demais tecidos foliares.

Para o diâmetro dos estômatos, diâmetro polar significativamente maior da face adaxial ocorreu aos 21 e 120 dias de aclimatização, seguido dos 63 dias, enquanto menor diâmetro equatorial foi obtido aos 63 dias, sucedido dos zero, 21, 42 e 84 dias. Como consequência, resultados significativamente superiores à relação DP/DE foram verificados nas plantas aclimatizadas por 21 e 63 dias (Tabela 3). Para a face abaxial, plantas aos 21, 42, 84 e 120 dias apresentaram diâmetro polar significativamente superior, ao passo que menor diâmetro equatorial ocorreu aos 42, 63 e 120 dias. Dessa forma, maior relação DP/DE foi verificada aos 120 dias de aclimatização.

Em estudo conduzido com a bananeira 'Grande Naine', SANDOVAL et al. (1994) verificaram que estômatos de plantas *in vitro* e plantas em condições de campo possuem diâmetros polares e equatoriais de  $38\mu\text{m}$  e  $27\mu\text{m}$  e  $15\mu\text{m}$  e  $17\mu\text{m}$ , o que se traduz em relações DP/DE de 2,53 e 1,59. Já em castanheiras (*Castanea sativa* x *C. crenata*) cultivadas *in vitro*, GONÇALVES et al. (2000) observaram a presença de estômatos esféricos, elevados, com células guardas irregulares e consistentemente abertos, enquanto, nas novas folhas formadas *ex vitro*, esses eram deprimidos, quase fechados e, gradualmente, elípticos com células guardas e subsidiárias bem diferenciadas. De acordo com KHAN et al. (2002) e ROCHA (2005), a relação DP/DE associada ao formato das células-guarda são importantes particularidades para inferir sobre a funcionalidade dos estômatos, visto que a forma elíptica (maior DP/DE) é característica de estômatos funcionais, ao passo que a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal. Contudo, cada espécie e condição de cultivo podem apresentar um resultado específico.

Tabela 2 - Número de estômatos por  $\text{mm}^2$  de folhas de bananeiras micropropagadas sob a influência do período de aclimatização.

Período de aclimatização (dias)	Número de estômatos por $\text{mm}^2$	
	Epiderme Adaxial	Epiderme Abaxial
0	27,6 a	106,6 a
21	22,1 a	82,1 b
42	22,7 a	88,8 b
63	15,9 b	74,1 b
84	14,7 b	84,5 b
120	14,7 b	90,7 b
CV (%)	40,98	15,84

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro

Tabela 3 - Diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos e relação DP/DE de folhas de bananeiras micropropagadas sob a influência do período de aclimatização.

Período de aclimatização (dias)	-----Epiderme adaxial-----			-----Epiderme abaxial-----		
	DP	DE	DP/DE	DP	DE	DP/DE
	-----µm-----			-----µm-----		
0	33,3 c	19,9 b	1,7 b	31,9 c	19,4 b	1,7 d
21	37,5 a	19,7 b	1,9 a	36,3 a	18,7 c	2,0 c
42	33,7 c	19,4 b	1,7 b	36,9 a	18,0 d	2,1 b
63	35,9 b	18,3 c	2,0 a	34,9 b	18,2 d	1,9 c
84	34,9 c	20,3 b	1,7 b	37,0 a	21,4 a	1,7 d
120	38,1 a	21,4 a	1,8 b	38,3 a	17,8 d	2,2 a
CV (%)	8,10	9,57	9,72	7,13	5,19	7,84

Médias seguidas por letras distintas, dentro de cada variável avaliada, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

## CONCLUSÕES

Maiores alterações anatômicas em folhas de bananeira ocorrem entre 42 dias e 84 dias do transplântio *ex vitro*, com acentuado espessamento e diferenciação da maioria dos tecidos. Folhas de bananeiras micropropagadas são anfi-hipoestomáticas. Maior número de estômatos ocorre em folhas oriundas de primórdios foliares formados *in vitro*. O estudo estrutural, em folhas de bananeiras micropropagadas, permite uma melhor compreensão das alterações que ocorrem na fase de aclimatização.

## REFERÊNCIAS

- ARIGITA, L. et al. Influence of CO<sub>2</sub> and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, n.1, p.166-173, 2002.
- CAPELLADES, M. et al. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141-145, 1990.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.3**: sistema de análise estatística. Lavras: Universidade Federal de Lavras; Departamento de Ciências Exatas, 2000. Software.
- GONÇALVES, J.C. et al. Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n.520, p.183-193, 2000.
- GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v.28, p.355-361, 2004.
- JOHANSEN, B.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523p.
- KHAN, P.S.S.V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.71, n.2, p.141-146, 2002.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.55, n.2, p.141-14, 1999.
- KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.
- LEE, H. et al. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Maryland, v.78, n.3, p.637-641, 1985.
- LEE, N. et al. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*- and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, 1988.
- LEE, D. W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v.87, n.4, p.447-455, 2000.
- MARIN, J.A. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.616, p.139-142, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

PEREIRA, R. de C.A. **Anatomia foliar comparada de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Uncaria tomentosa* (Willdenow Ex Roemerr & Schultes) como subsídio ao estudo de micropropagação *in vitro*.** 2004. 133f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.

ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”: alterações morfoanatômicas.** 2005. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.

ROHR, R. et al. Acclimatization of micropropagated forest trees. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n.616, p.59-69, 2003.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.616, p.439-442, 2003.

SANDOVAL, J.A. et al. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. ‘Grande Naine’ (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v.49, n.1, p.37-46, 1994.