



**ASPECTOS MORFO-ANATÔMICOS DE MUDAS
DE ABACAXIZEIRO "SMOOTH CAYENNE"
MICROPROPAGADAS**

LÚCIA HELENA DE BARROS ALBERT

2004

58991
050183

LÚCIA HELENA DE BARROS ALBERT

**ASPECTOS MORFO-ANATÔMICOS DE MUDAS DE
ABACAXIZEIRO "SMOOTH CAYENNE"
MICROPROPAGADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Moacir Pasqual, Dr.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Albert, Lúcia Helena de Barros

Aspectos morfo-anatômicos de mudas de abacaxizeiro "Smooth
Cayenne" micropropagadas / Lúcia Helena de Barros Albert. – Lavras :
UFLA, 2004.

54 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual,
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Abacaxi. 2. Substrato. 3. Aclimação. 4. Micropropagação. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.77435

LUCIA HELENA DE BARROS ALBERT

**ASPECTOS MORFO-ANATÔMICOS DE MUDAS DE
ABACAXIZEIRO "SMOOTH CAYENNE"
MICROPROPAGADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração em
Fitotecnia, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 13 de agosto de 2004

Dr. João Baptista da Silva

SMAMADS

Dr. Décio Karam

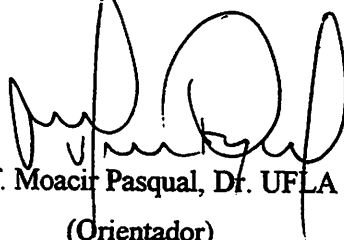
CNPMS

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA

Prof. Dr. José Darlan Ramos

UFLA

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Prof. Moacir Pasqual, Dr. UFLA
(Orientador)

LAVRAS
Minas Gerais – BRASIL

Ao meu marido, Luiz Gonzaga de Castro Júnior, por me mostrar a real beleza da vida e do amor.

DEDICO.

Aos meus filhos, Francisco e Eduardo, por me ensinarem o amor incondicional. Às minhas sobrinhas, Natália e Olívia, por serem a luz da minha vida.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora, pela força enviada todos os dias.

À Universidade Federal de Lavras e à FAPEMIG pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Dr. Décio Karam (Emprapa Milho e Sorgo), Dr. João Baptista da Silva (SMAMADS), Prof. Evaristo Mauro de Castro e Prof. Moacir Pasqual, pelos ensinamentos e confiança em momentos tão decisivos.

Ao Prof. Donizeti, Prof. Renato Paiva e Profa. Ângela, do Setor de Fisiologia Vegetal, pela valiosa e indispensável ajuda durante o Doutorado e oportunidade da convivência diária no setor.

Ao Prof. Dr. Renato Guimarães, pelas preciosas contribuições durante o curso.

Aos funcionários amigos, Lena, Joel, Odorêncio, Dalva e D.Elza, agradeço a disponibilidade e o sempre agradável convívio.

Ao colega Adriano Bortolotti da Silva, pois, sem sua ajuda fundamental, não terminaria o curso a contento.

As minhas amigas muito especiais: Cristiane G. Mendonça, Núbia M. Correia e Marluce Cortez, pois sem elas seria impossível conduzir o Doutorado.

Aos amigos Adenilson, Anne, Breno, Chrystiane, Cristiano, Dani (gaúcha), Dani (mineira), Ednabel, Fernanda, Gustavo, Ilmarina, Rayris, Louise e Marquinho, pelos momentos fantásticos e ajuda durante todo o Doutorado.

A todos os colegas do Setor de Fisiologia Vegetal, pela generosidade e afeto todos os dias.

BIOGRAFIA

Lúcia Helena de Barros Albert nasceu em São Paulo, no dia 05 de setembro de 1968. Completou o curso de Agronomia da Universidade Federal de Lavras, em 1991. Com especialização em Administração Rural pela Universidade Federal de Lavras, trabalhou quatro anos em empresas multinacionais de agroquímicos. Em 1997, ingressou no curso de pós-graduação em Fitotecnia na ESALQ/USP, obtendo o título de Mestre. Em 2000 ingressou no curso de pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, onde concluiu o Doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Descrição da espécie.....	3
2.2 Principais variedades e importância econômica.....	4
2.3 Exigências edafoclimáticas	6
2.4 Obtenção de mudas.....	7
2.5 Cultura de tecidos vegetais	8
2.6 Aclimatização.....	14
2.7 Substratos.....	15
2.8 Aspectos anatômicos na aclimatização.....	16
2.8.1 Características foliares em plantas cultivadas <i>in vitro</i>	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Fase de multiplicação	22
3.2 Aclimatização em diferentes substratos.....	23
3.3 Caracterização anatômica das folhas de plântulas micropropagadas e aclimatizadas em diferentes substratos	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Fase de multiplicação	25
4.2 Avaliação das plantas em diferentes substratos.....	26
4.3 Caracterização anatômica das folhas de plântulas micropropagadas e aclimatizadas em diferentes substratos	31
5 CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

ALBERT, Lúcia Helena de Barros. Aspectos morfo-anatômicos de mudas de abacaxizeiro “Smooth Cayenne” micropropagadas. 2004. 54 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este trabalho teve por objetivo determinar o melhor substrato na aclimatização e avaliar aspectos da anatomia foliar do abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne micropropagadas. As plantas utilizadas já se encontravam estabelecidas *in vitro*. O meio de cultura básico para multiplicação foi o MS suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP) e 30 g.L^{-1} de sacarose, com pH ajustado para 5,8. Os explantes foram inoculados de maneira asséptica em câmara de fluxo laminar. Foram realizados os seguintes experimentos: aclimatização de mudas de abacaxi conduzida em casa de vegetação com temperatura controlada, alta umidade relativa e ventilação forçada em 3 diferentes substratos: Plantimax® ; Plantimax® + húmus e Plantimax® + vermiculita. Aos 20, 40 e 60 dias, foram avaliadas características anatômicas das folhas das mudas. As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* apresentaram os parênquimas aquífero e clorofiliano menos espessos que as plantas em aclimatização e com ausência de cloroplastos. As epidermes adaxial e abaxial também se mostraram mais desenvolvidas após 60 dias de aclimatização, sendo o substrato Plantimax® + húmus o que promoveu maior crescimento, mostrando a necessidade de aclimatização de mudas de abacaxi micropropagadas antes de seu estabelecimento em campo. Ao final do experimento, aos 180 dias, foram avaliadas características fitotécnicas, mostrando que o substrato Plantimax® + húmus promoveu maior número de folhas, maior peso de biomassa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, além de altura maior das mudas. A mistura Plantimax® + húmus apresentou-se como um eficiente substrato para aclimatização de abacaxi.

* Comitê Orientador: Moacir Pasqual, Evaristo Mauro de Castro.

ABSTRACT

ALBERT, Lúcia Helena de Barros. **Anatomical aspects of the pineapple “Smooth Cayenne” plantlets micropropagated.** 2004. 54 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The objective of this work was to determine the best substrate for acclimatization and evaluate the aspects of pineapple plant leaf anatomy cv. Smooth Cayenne micropropagated. The plants used were already set up *in vitro*. The culture medium used was the MS supplemented with 1.5 mg.L^{-1} of benzilaminopurine (BAP) and 30 g.L^{-1} of sucrose, with pH adjusted to 5.8. The explants were inoculate in aseptic conditions in laminar flow cabinets. The experiments performed were: acclimatization of pineapple seedling under green house conditions, with controlled temperature, high air humidity and forced air fan, on 3 different substrates: Plantimax®, Plantimax® + humus e Plantimax® + vermiculite. Evaluations of anatomic characteristics of seedling leaves were done at 20, 40 and 60 days. The leaf structures developed *in vitro* showed smaller water storage tissue and chlorenchyma than the plants under acclimatization and absence of chloroplasts.

The adaxial and abaxial epidermis increased after 60 days under acclimatization, using the Plantimax® + humus substrate that promoted greatest growth showing that micropropagated pineapple seedling needs acclimatization before its establishment at the field.

At the end of the experiment, 180th day, the phytotecnic characteristics evaluated showed that Plantimax® + humus substract promoted greatest number of leaves, higher fresh and dry biomass of the aerial part and roots, and increase of the seedling height. The mixture Plantimax® + humus is an efficient substract to pineapple acclimatization.

* Guidance Committee: Moacir Pasqual - UFLA (Adviser), Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro é uma planta tropical provavelmente originária das zonas Central e Sul do Brasil, Nordeste da Argentina e Paraguai. É uma cultura originalmente cultivada em terras recém-desmatadas e, dessa forma, é vista como uma cultura rústica e pouco exigente. Entretanto, a produção racional do abacaxizeiro requer tratamentos culturais constantes e cuidadosos.

No Brasil, a cultura vem demonstrando baixa produtividade (25 t.ha⁻¹ a 35 t. ha⁻¹) quando comparada com outros países produtores, que têm alcançado entre 45 t.ha⁻¹ a 55 t.ha⁻¹. Isso porque, além de práticas culturais inadequadas e pequena organização dos produtores, a cultura vem sofrendo com problemas fitossanitários, dentre os quais doenças fúngicas, como a fusariose (*Fusarium subglutinans*). Essa doença se dissemina por meio de mudas contaminadas e pode provocar grandes perdas na produção ou até comprometer toda a exploração.

Mudas de abacaxizeiro podem ser obtidas pelo método convencional, em viveiro ou produção em laboratório, por meio da cultura de tecidos. As plantas advindas deste processo tecnológico ainda são muito caras e de difícil aquisição pelos produtores rurais brasileiros. Isto se deve, basicamente, aos custos de produção no laboratório e à elevada perda de planta durante o processo de aclimatização.

A cultura de tecidos é uma técnica de grande importância, pois proporciona a produção de milhares de mudas a partir de uma gema em pequeno intervalo de tempo e espaço e totalmente livres de pragas e doenças. Apesar disso, a micropropagação do abacaxizeiro ainda apresenta um alto custo, o que dificulta sua disseminação.

A aclimatização configura-se na fase em que a planta deve se adaptar à nova condição de ambiente para posteriormente ser levada a campo.

Plantas derivadas do cultivo *in vitro* requerem um período de aclimatização em função de alterações na estrutura e fisiologia induzidas *in vitro* diminuindo a capacidade dessas plantas em suprir a necessidade de energia e carbono por meio da fotossíntese e de manter um balanço hídrico favorável.

Além da utilização de mudas de boa qualidade, é imprescindível, para o sucesso na implementação da cultura, a escolha de um substrato adequado durante a fase de aclimatização, o qual atenda às necessidades das mudas e que permita o menor número possível de perdas.

Neste contexto, verificar a possibilidade de otimizar a propagação *in vitro* do abacaxizeiro e realizar estudos anatômicos dos tecidos para determinar quais os fatores limitantes do processo de aclimatização, são fundamentais para o sucesso da produção de mudas por cultura de tecidos.

O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor meio de aclimatização do abacaxizeiro, avaliar o efeito dos diferentes substratos em características fitotécnicas nas plantas de abacaxi provenientes da germinação *in vitro* e caracterizar alguns aspectos internos e externos da estrutura foliar em diferentes épocas de avaliação durante o processo de aclimatização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

O abacaxizeiro é uma monocotiledônea, herbácea perene, da família *Bromeliaceae*. O gênero mais importante é o *Ananas*, que pertence ao grupo que possui hábito terrestre e que cresce no solo à custa das próprias raízes. Este grupo inclui o abacaxi *Ananas comosus* (L.) Merrill e outras espécies que são utilizadas para a produção de fibras para cordoaria e fabricação de material rústico ou ornamentação.

Aproximadamente 50 gêneros e 2.000 espécies de *Bromaliaceae* são conhecidos. O abacaxizeiro compõe-se de um caule (talo) curto e grosso, ao redor do qual crescem as folhas, em forma de calhas, estreitas e rígidas e no qual também se inserem raízes axilares. O sistema radicular é fasciculado, superficial e fibroso e atinge pouca profundidade no solo. Na variedade Pérola 97% do sistema radicular de uma planta de doze meses se encontram-se na faixa de 0 a 30 cm e raramente alcança mais de 60 cm da superfície do solo (Inforzato et al., 1968; Reinhardt et al., 2000).

O fruto é composto ou múltiplo, do tipo sorose, formando de 100 a 200 frutinhos simples do tipo baga, inseridos sobre uma haste central, em disposição espiralada e intimamente soldados entre si. No ápice existe um tufo de folhas denominado coroa (Figura 1). A casca é formada pela união de brácteas e sépalas das flores que dão origem aos frutinhos (Medina, 1987).

As folhas são classificadas, segundo seu formato e sua posição na planta, em A, B, C, D, E, F, da mais velha e externa para a mais nova e interna. A folha D é a mais importante do ponto de vista do manejo da cultura; sendo a mais jovem dentre as folhas adultas e, metabolicamente, a mais ativa de todas, é,

por conseguinte, usada na análise do crescimento e do estado nutricional da planta (Reinhardt et al., 2000).

Os rebentos, ou mudas, desenvolvem-se a partir de gemas axilares localizadas no caule (rebetões) e no pedúnculo (filhotes). Os plantios de abacaxi são feitos com mudas de vários tipos, tais como coroa (brotação do ápice do fruto), filhotes, filhote-rebentão e rebentão (Figura 1). Cada tipo possui características vantajosas ou não que devem ser consideradas na escolha e manejo do material de plantio.

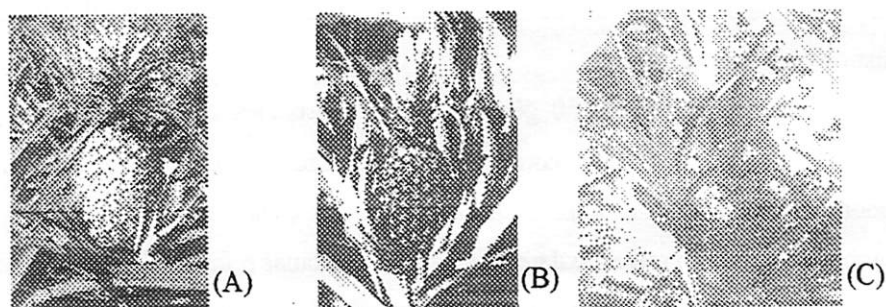


FIGURA 1 Aspecto visual de um planta adulta cv. Smooth Cayenne (A), cv. Pérola (B) e de mudas (C) de abacaxizeiro. Fonte: Cabral, Embrapa, Brasília, DF, 2000.

2.2 Principais variedades e importância econômica

Algumas características devem ser consideradas na escolha da variedade a ser cultivada. De modo geral, espera-se que a planta tenha crescimento rápido, frutos com polpa amarela, firme mas não fibrosa, teor de açúcar elevado e acidez moderada, entre outros atributos. Procura-se, ainda, que essas variedades proporcionem altos rendimentos e que sejam resistentes e ou tolerantes às principais pragas e doenças que ocorrem na cultura.

As variedades de abacaxizeiro mais conhecidas no mundo foram classificadas em cinco grupos distintos: Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco e Perolera. A definição destes grupos considera um conjunto de características comuns, tais como porte da planta, número de filhotes e rebentões, comprimento da folha, presença de espinhos na folha, cor das folhas, peso e forma dos frutos, formas dos frutinhos e sabor dos frutos (Py et al., 1984; Reinhardt et al., 2000).

O grupo Cayenne é considerado o principal grupo de abacaxizeiro cultivado no mundo e suas variedades apresentam características consideradas adequadas à industrialização e ao mercado internacional. A variedade mais plantada no mundo é a Smooth Cayenne, denominada no Brasil caiena, liso, havaiano ou ananás. É uma planta amplamente cultivada por possuir muitas características favoráveis, como crescimento semi-ereto, folhas com até 1,0 m de comprimento e com apenas 2 a 3 pares de espinhos na extremidade apical do bordo da folha. O fruto é atraente, de forma cilíndrica, polpa amarela, casca amarelo-alaranjada, elevado teor de açúcar e média acidez (Silva & Sanábio, 1996).

Tais características credenciam esta variedade como adequada para a industrialização e para a exportação como fruta fresca. Apesar disso, em clima úmido e quente, produz fruto frágil para transporte e processamento industrial, além de ser bastante susceptível à murcha associada à cochonilha e à fusariose.

Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi provenham dessa espécie. O predomínio do plantio de Smooth Cayenne nos principais países produtores do mundo, o uso de poucas variedades para plantios comerciais e a substituição de variedades locais por esta variedade vêm provocando o desaparecimento de variedades de interesse local ou regional (Reinhardt et al., 2000).

Considerando-se os países produtores, observa-se que cerca de 57,75% da produção mundial de abacaxi concentram-se em cinco países: Tailândia, Brasil, Filipinas, Índia e China. No Brasil, o abacaxizeiro é cultivado em quase todos os estados, sendo que 83% da produção nacional está concentrada nos da Paraíba, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo (FAO, 1998).

Mesmo tratando-se de uma cultura de grande demanda no mercado mundial de frutas, o abacaxi não tem lugar de destaque no cenário agrícola brasileiro. O consumo per capita é baixo (5,6 frutos/ano) e representa apenas 0,3% do valor da renda agrícola das culturas produzidas no país (Souza et al., 1999).

Independentemente da sua importância econômica, a cultura do abacaxi merece destaque pela sua condição de atividade absorvedora de mão-de-obra no meio rural, contribuindo para a geração de empregos. A abacaxicultura assentada em bases tecnológicas melhor estabelecidas faz com que tais perspectivas sociais tornem-se mais evidentes, na medida em que pode ser viabilizada sua expansão para áreas não tradicionais, ampliando sobremaneira as alternativas de ocupação de mão-de-obra (Reinhardt et al., 2000).

2.3 Exigências edafoclimáticas

O abacaxizeiro é uma frutífera tropical que se adapta melhor em altitudes de até 100 m, onde apresenta o ciclo menor, maiores produções e melhor qualidade de fruto (Silva & Sanábio, 1996). A temperatura ideal para o cultivo está entre 21°C a 31°C.

A planta é exigente em luz, desenvolvendo-se melhor em locais com alta incidência de radiação solar. Não tolera sombreamento, e a insolação ótima para

seu desenvolvimento é de 6,8 a 8,2 horas de brilho solar por dia. Umidade relativa do ar média anual de 70% ou superior é desejável, mas a planta suporta bem variações moderadas deste fator climático (Reinhardt et al., 2000).

É uma cultura que pode suportar períodos mais secos devido à disposição de suas folhas em forma de canaleta que podem captar e armazenar água em seu interior (axilas) além do tecido especial das folhas (Silva & Sanábio, 1996; Reinhardt et al., 2000).

É uma cultura muito sensível ao encharcamento do solo, que pode prejudicar o seu crescimento e a sua produção. Portanto, boas condições de aeração e de drenagem do solo são requisitos básicos para seu cultivo, por favorecerem o desenvolvimento do sistema radicular da planta, normalmente frágil e concentrado nos primeiros 20 cm do solo.

Os solos de textura média, 15% a 35% de argila e mais 15% de areia, sem impedimentos a uma livre drenagem do excesso de água, são os mais indicados para a cultura. Os solos de textura arenosa, até 15% de argila e mais 70% de areia, que não apresentam problemas de encharcamento, são também recomendados para a cultura, requerendo quase sempre a incorporação de resíduos vegetais e adubos orgânicos, que melhorem as suas capacidades de retenção de água e de fornecimento de nutrientes. O abacaxizeiro é considerado uma planta bem adaptada aos solos ácidos, sendo a faixa de pH de 4,5 a 5,5 a mais recomendada para seu cultivo (Reinhardt, 2000).

2.4 Obtenção de mudas

Os plantios de abacaxizeiro são feitos por meio de mudas, sendo a cultura de propagação predominantemente vegetativa. A propagação por sementes só ocorre quando há polinização cruzada entre variedades e ou

espécies diferentes, tendo aplicação exclusiva na pesquisa para a obtenção de novas variedades. Em plantios comerciais, não há produção de sementes devido à auto-esterilidade das flores (Reinhardt, 1998).

A muda de boa qualidade é a base para o sucesso dessa cultura. Daí a importância da utilização de mudas de boa procedência, livres de doenças, como a fusariose, isentas também de pragas, como a cochonilha e de danos mecânicos, além de vigorosas e colhidas em plantios em bom estado fitossanitário.

A propagação vegetativa é feita por meio de mudas denominadas coroa, filhote (abaixo da base do fruto), filhote rebentão e rebentão (base do talo). No Brasil, as mais usadas são os filhotes e os rebentões, principalmente na cultivar Smooth Cayenne que, com frequência, produz número reduzido de mudas tipo filhote, tornando o manejo dos rebentões muito importante (Reinhardt et al., 2000).

As mudas também podem ser produzidas em viveiros a partir de gemas existentes nas axilas das folhas, inseridas no talo das plantas. As gemas brotam e crescem quando, então, o talo é seccionado contendo pelo menos uma gema, cujas secções de talo são adequadamente cultivadas em viveiros. O seccionamento do talo permite o exame visual das partes internas, permitindo o descarte de todo o material contaminado por doenças.

Para aumentar e acelerar a taxa de multiplicação e, ao mesmo tempo, diminuir o potencial ou até mesmo evitar a disseminação de pragas e patógenos por meio de mudas convencionais, técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas para a propagação *in vitro* do abacaxizeiro.

2.5 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas em que pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indeterminados, em um meio nutritivo semidefinido ou definido e incubado em condições ambientais controladas. Para o caso de tecidos vegetais, esta definição original deve ser ampliada, de modo a incluir toda uma gama de explantes que vai desde plântulas e órgãos a células isoladas e protoplastos (Mroginski & Roca, 1993; Torres & Caldas, 1990).

Dentre as várias aplicações destas técnicas estão a utilidade em programas de melhoramento genético de plantas, o aumento de variabilidade genética para fins de seleção, a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos, a conservação e avaliação de germoplasma e a micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro* (Ferreira et al., 1998; Duval et al., 1998).

Se a cultura de tecidos consiste em cultivar assepticamente diferentes explantes constituídos por frações de um tecido ou órgão que se extrai da planta, a micropropagação é praticamente uma multiplicação massiva *in vitro*, sendo a aplicação mais prática da cultura de tecidos (Mroginski & Roca, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998). Destina-se, principalmente, àquelas espécies cujas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo. Assim, pode-se clonar indivíduos melhorados, produzindo progênies homogêneas (Lameira, 1997).

Um exemplo que justifica o uso da micropropagação é a multiplicação de plantas selecionadas por alta produtividade ou qualidade de frutos superiores. Se as estacas da espécie não enraizam ou possuem baixo percentual de enraizamento, a micropropagação pode representar uma solução para sua propagação. Outro caso, no qual a multiplicação *in vitro* é vantajosa, surge quando a espécie é rara, como a pera-do-cerrado (*Eugenia klotzchiana*), ou

produz poucas sementes, como a sucupira-branca, e a produção de mudas é insuficiente para atender à demanda. Assim, a multiplicação por cultura de tecidos oferece a possibilidade de produzir dezenas ou centenas de mudas a partir de uma única semente ou matriz selecionada (Melo et al., 1998).

Além disso, a micropropagação tem mostrado importantes vantagens em comparação com os sistemas convencionais de propagação. O incremento acelerado do número de plantas derivadas de determinado genótipo, a redução do tempo de multiplicação, a possibilidade de multiplicar grandes quantidades de plantas em uma área reduzida, o maior controle sobre a sanidade do material que se propaga e a possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade na qual existam poucos indivíduos são algumas das vantagens apontadas por Mroginski & Roca (1993).

Segundo Pierik (1990), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta cinco diferentes estágios. A fase 0 corresponde aos tratamentos dados à planta matriz, de onde são retirados os explantes, os quais tentam manter, o máximo possível, as plantas sadias e livres de doenças. A fase 1 representa o momento em que um explante é isolado sob condições estéreis. Nesta, a única exigência importante é obter crescimento e desenvolvimento sem contaminação. A fase 2 é a de propagação, onde se objetiva conseguir o material vegetal sem a perda da estabilidade genética. A fase 3 envolve a preparação das brotações ou das plântulas, obtidas na fase 2, para a transferência ao solo. Este processo pode envolver a interrupção da formação de brotos axilares e o início do seu alongamento. Posteriormente, deve-se induzir a formação de raízes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A quarta e última fase é a da transferência das plântulas do tubo de ensaio para o solo e o conseqüente estabelecimento.

Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por três maneiras: multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante indução de gemas

adventícias por organogênese direta ou indireta e multiplicação via embriogênese somática.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998) e George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotos axilares. O cultivo de segmentos nodais consiste na inoculação de uma gema, juntamente com uma porção do caule, para se obter um broto a partir desta gema. Dessa forma, a indução de brotações envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados (normalmente gemas axilares) e a quebra de dominância apical com a aplicação de reguladores de crescimento. As gemas axilares que naturalmente se formam nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas que, por sua vez, repetem o mesmo processo. Cada parte aérea é isolada das demais para a formação de novos explantes. Este é o método mais natural de propagação vegetativa das plantas *in vitro*, já que também pode-se aplicar *in vivo* (Pierik, 1990).

A composição do meio de cultura é uma importante variável que determina o sucesso na proliferação das partes aéreas. Diversos meios básicos são utilizados na fase de multiplicação e suas variações mais frequentes dizem respeito à composição de macronutrientes. A fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio são aspectos que têm merecido maior atenção (Grattapaglia & Machado, 1998). O meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) é o mais concentrado em termos de micro e macronutrientes e é também o mais empregado em cultura de tecidos (Pasqual, 2001; Tisserat, 1985).

Entre os princípios nos quais se baseia a cultura de tecidos, os dois mais importantes, sem dúvida, são a totipotencialidade celular e o balanço hormonal (Villalobos & Thorpe, 1993).

Pelo princípio da totipotencialidade das células somáticas vegetais, teoricamente, qualquer célula vegetal viva possui suficiente informação genética

para produzir uma planta normal, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas. A cultura de tecidos, dessa forma, pode propiciar a regeneração de uma planta inteira a partir de fragmentos de outra planta (Grattapaglia & Machado, 1998).

No entanto, conforme Pierik (1990), quando uma planta envelhece, sua capacidade regenerativa costuma diminuir. Dessa forma, tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens, com tecidos não lignificados especialmente no caso de árvores e arbustos. Os tecidos embrionários geralmente têm alta capacidade regenerativa e, assim, embriões e sementes são utilizados freqüentemente como material experimental para o cultivo de tecidos.

Nas plantas, naturalmente ocorre a presença de substâncias químicas, que regulam o crescimento e o desenvolvimento. Essas substâncias geralmente são ativas em baixas concentrações e são conhecidas como hormônios. O produto químico sintético com atividade fisiológica similar à dos hormônios é denominado de regulador de crescimento. As principais classes de reguladores de crescimento ou hormônios são: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (George, 1996).

A propagação *in vitro* está basicamente controlada pela inclusão de reguladores de crescimento vegetais no meio de cultura. O balanço entre os reguladores em uma planta pode, entre outras coisas, superar a dominância apical dos ramos, levando ao desenvolvimento dos brotos laterais, e induzir a formação de brotações adventícias, levando novamente à produção de mais material vegetal (Shargool & Ngo, 1994).

Embora as auxinas não sejam necessárias no cultivo *in vitro* de algumas espécies, as citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Além disso, promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, promovem a maturação dos cloroplastos e retardam a senescência das plantas (Taiz & Zeiger, 2004).

As citocininas produzem pouco efeito quando aplicadas em plantas intactas, mas têm visível efeito para estimular síntese de proteínas. Os efeitos das citocininas são mais visíveis na cultura de tecidos quando são usadas juntamente com as auxinas, estimulando a divisão celular e controlando a morfogênese. Nos segmentos nodais cultivados *in vitro*, em meio contendo citocininas, estes compostos superam a dominância apical e liberam gemas laterais da dormência. Neste aspecto, possuem um efeito oposto ao das auxinas endógenas. As citocininas de uso mais comuns são a cinetina, o 6-benzilaminopurina (BAP) e o 2-isopenteniladenina (2-iP) (George, 1996; Pierik, 1990).

Porém, segundo Ozias-Akins & Vasil (1985), citocininas exógenas nem sempre são necessárias e muitos tecidos desenvolvem-se indefinidamente *in vitro*, apenas com suprimento de auxinas.

Apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente por excessivo número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação (Leshem et al., 1988). Qi-guang et al. (1986) observaram que altas concentrações de BAP inibiram a brotação das gemas e, conseqüentemente, o número de partes aéreas, promovendo a formação de calo em *Castanea mollissima*.

O efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, sendo comum a constatação de efeito residual em subculturas subseqüentes, afetando o alongamento e tornando-se fator limitante na fase de enraizamento. Grattapaglia et al. (1987) constataram, em diversas espécies de *Eucalyptus*, correlação negativa alta entre concentrações crescentes de BAP e a taxa de enraizamento na geração seguinte de subcultura na ausência de reguladores de crescimento. Torna-se necessária uma fase intermediária de alongamento, com o objetivo de reduzir ou eliminar a citocinina endógena dos explantes. Essa fase caracteriza-se

pela transferência das culturas para meio de cultura na ausência de reguladores de crescimento (Nieuwkerk et al., 1986)

2.6 Aclimatização

A aclimatização é conceituada como a fase ou estágio da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro* para o ambiente natural ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado.

Um dos maiores obstáculos para a aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos é a dificuldade de transferir com sucesso essas mudas das condições *in vitro* para o solo devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (Read & Fellman, 1985). Isso pode ser um fator limitante devido à perda de vigor e à morte das plantas também pela perda excessiva de água, e à mudança de metabolismo heterotrófico para autotrófico.

Segundo Dunstan & Turner (1984), a aclimatização é constituída de dois fatores, enraizamento (*in vitro* e *in vivo*) e transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas. Preece & Sutter (1991) citam que as técnicas de aclimatização podem ser efetuadas durante o cultivo *in vitro* e após a transferência das mudas.

Há diversos fatores envolvidos na aclimatização, como o genótipo, o estresse hídrico, a alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*) para autotrófico, a infecção por patógenos e o estresse pela luz.

Escolher o substrato correto pode ser decisivo para o sucesso da aclimatização. O substrato deve ser de baixa densidade, rico em nutrientes, de composição química equilibrada e física uniforme, elevada capacidade de troca de cátions (CTC), aeração e drenagem, boa coesão entre as partículas e raízes e

ser preferencialmente estéril às plantas daninhas e com boa flora bacteriana (Coutinho & Carvalho 1983).

Segundo Howard (1987), as mudas provenientes do cultivo *in vitro* são de pequeno tamanho (menos de 5 cm de altura) quando transplantadas, de modo que necessitam aumentar entre 10 a 20 vezes o seu tamanho para serem utilizadas. A escolha de um substrato adequado é uma das técnicas estudadas com o objetivo de não perder plantas na fase de aclimatização.

2.7 Substratos

A escolha de substratos adequados é uma das prioridades para produtores de mudas e plantas envasadas (Fitzpatrick et al., 1998). Pode-se definir o substrato como o meio físico, natural ou sintético, no qual se desenvolvem as raízes das plantas que crescem em um recipiente, com volume limitado (Ballester-Olmos, 1992), desempenhando papel importante na sobrevivência e desenvolvimento das plantas em aclimatização. O substrato deve ser de baixa densidade, rico em nutrientes, composição química equilibrada e física uniforme, e elevada capacidade de troca de cátions (CTC). Além disso se deve apresentar boa aeração e drenagem, boa coesão entre as partículas e raízes, e ser, preferencialmente, isento de plantas daninhas e com boa flora bacteriana (Coutinho & Carvalho, 1983).

Vários autores têm tentado obter uma porosidade ideal, possibilitando o fornecimento de água e oxigênio de maneira adequada, pelo ajuste da taxa de constituintes de substrato (Poole & Waters, 1972; Paul & Lee, 1976). Para isto diversos materiais são utilizados: solo, areia, turfa, serragem, casca de arroz carbonizada, húmus e resíduos orgânicos, entre outros.

O húmus, ou matéria orgânica do solo, não é apenas uma fonte de nutrientes. Talvez, tão ou mais importantes sejam as propriedades coloidais decorrentes de sua estrutura orgânica complexa, aliada a uma fina subdivisão de partículas (Raij, 1991). A matéria orgânica corrige a falta ou excesso de aeração e drenagem do solo por meio da agregação e estruturação de solos arenosos e argilosos (Kiel, 1985).

Salvador (2000) obteve ótimos resultados em cultivo convencional de gloxínia em estufa, utilizando como substrato composto de húmus, vermiculita e perlita (1:2:0.5), atingindo média de 11 botões florais. Os substratos para violeta africana devem ser porosos, ricos em matéria orgânica e com boa drenagem. Iuchi (1994), trabalhando com rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*), obteve melhor desenvolvimento das plantas com o uso de areia mais húmus nas proporções de 2:1 ou 1:2. O húmus em mistura com substrato comercial agromix® (1:1) apresentou resposta semelhante para abacaxi (*Ananas comosus* L.) quando utilizado como substrato para plantas vindas de cultivo *in vitro* (Silva et al., 1998) e a utilização da mistura de solo/xaxim/areia/húmus proporcionou maior crescimento das plantas micropropagadas de abacaxi sem afetar o índice de sobrevivência (Fauth et al., 1994).

2.8 Aspectos anatômicos na aclimatização

As condições ambientais sob as quais ocorre o cultivo *in vitro*, no que se refere à composição do meio de cultura e do ar no interior dos recipientes, bem como quanto à luminosidade e à temperatura, fazem com que a planta proveniente da micropropagação apresente algumas características peculiares. Ainda que haja variação entre as espécies, algumas características são encontradas em praticamente todas as plantas. A descrição dessas características

pode ser feita em relação às folhas, às raízes e ao mecanismo de nutrição (George, 1996).

Ainda não se sabe ao certo como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente de plântulas micropropagadas, é afetada pelas condições ambientais de cultivo. Alterações na morfologia foliar podem influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados principalmente à fotossíntese e às trocas gasosas (Debergh & Maene, 1984). Especula-se que o ambiente de cultivo pode afetar e conduzir a diferentes atividades enzimáticas, resultando em várias mudanças nos processos metabólicos da planta. Algumas respostas comumente assemelham-se a plantas cultivadas sob condições de estresse.

Segundo Serret (1996), os explantes apresentam estrutura e fisiologia modificadas, devido a algumas condições, como baixa irradiância, altos níveis de sacarose e baixo teor de CO₂ disponível, dificultando a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e afetando a sobrevivência *ex vitro*.

2.8.1 Características foliares em plantas cultivadas *in vitro*

A desordem estrutural e funcional das folhas de plantas cultivadas *in vitro* é resultado de complexos fatores no meio de cultura. A consequência é uma baixa taxa de sobrevivência das plantas quando transferidas para condições *ex vitro* (Ziv, 1987). Pasqual et al. (2001) afirmam que, durante o processo de transferência para a condição *ex vitro*, a cutícula é freqüentemente menos desenvolvida devido à umidade relativa dos frascos ser alta. Como consequência, ocorre elevada perda de água durante o processo de aclimatização. As modificações manifestadas principalmente nas folhas afetam os principais processos executados por estas, ou seja, a fotossíntese e as trocas gasosas (Deberg & Maene, 1984).

A membrana cuticular (MC) ou cutícula, usada em seu sentido mais amplo, pode ser definida, de acordo com Devine et al. (1993) e Holloway (1982), pela sua posição anatômica ou sua natureza química. Quimicamente ela é sempre caracterizada por dois grupos específicos de substâncias lipídicas: cutinas, as quais constituem uma estrutura de suporte da membrana; e ceras depositadas na superfície externa, chamadas de ceras epicuticulares e também firmemente dispersas no interior da matriz de cutina, logo abaixo da superfície, chamada de cera cuticular.

A cutícula que recobre todas as células da epiderme da planta serve como uma interface entre o corpo da planta e o ambiente, realizando a proteção e a prevenção da perda de água dos tecidos vegetais (Bucovac, 1990). É uma membrana composta basicamente de cutina juntamente de uma mistura de ceras que cobrem grande parte dos tecidos das plantas. A permeabilidade da água através da cutícula é influenciada pela estrutura e pelo conjunto das ceras cuticulares e epicuticulares (Martin & Juniper, 1970)

As ceras são compostas de longas cadeias hidrocarbonatadas lineares ou ramificadas de alcanos, álcoois, cetonas e aldeídos graxos, ácidos graxos saturados e insaturados, e ésteres graxos com comprimento de cadeia variando em 21 e 35 átomos de carbono, formando uma camada praticamente contínua na superfície da cutícula. A composição das ceras é a principal determinante da molhabilidade da cutícula. As estruturas de cera podem ser amorfas ou apresentar forma de grânulos, bastonetes, placas, crostas ou agregados (Velini & Trindade, 1992).

As ceras epicuticulares, pertencentes à primeira camada, podem ser amorfas ou depositadas em variáveis formas físicas. Em algumas espécies elas formam uma camada plana, achatada, enquanto que em outras elas são prensadas na forma de lâminas ou cristais com vasta extensão em termos de tamanho e forma. Estes cristais podem ter estruturas definidas como cristalinas

ou semicristalinas (Devine, 1990; Baker, 1982). Essas diferenças nos padrões cuticulares podem, ser taxonomicamente úteis em termos genéricos e mesmo entre espécies. A cera pode ser depositada em flocos grandes ou pequenos, em grânulos, hastes, tubos ou lâminas, que podem estar esculpido em cumes ou outras formas. As condições sob as quais as plantas se desenvolvem podem afetar a forma da cera. As amostras de cera variam nas diferentes espécies e, em alguma extensão, dentro da mesma espécie, sob condições diferentes. A formação da cera aparentemente começa num estágio inicial do desenvolvimento da folha e persiste até o final; as projeções parecem alcançar uma densidade e um comprimento bastante uniformes e então permanecem relativamente inalteradas.

Estudos indicam que a estrutura cristalina das ceras epicuticulares em folhas de plantas micropropagadas foram significativamente diferentes daquelas que crescem em casa de vegetação (Sutter & Langhans, 1979; Fuchigami et al., 1981; Sutter, 1988). A estrutura cristalina das espécies estudadas por meio de microscopia de varredura (MEV) mostrou que as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram uma estrutura disforme quando comparadas com plantas que cresceram em casa de vegetação (Sutter, 1985).

Ceras epicuticulares em folhas cultivadas *in vitro* diferem quimicamente daquelas que crescem em casa de vegetação. Ceras formadas nas folhas *in vitro* tinham uma alta proporção de componentes ésteres e compostos polares e menor número de cadeias de hidrocarbonetos do que as folhas em casa de vegetação. Desde componentes polares que são menos hidrofóbicos e permitem grande permeabilidade de água do que longas cadeias de hidrocarbonetos, provavelmente contribuem para perda de água.

Como um reduzido conjunto de ceras epicuticulares está diretamente relacionado com o aumento significativo da perda de água, taxas de transpiração

foram bem maiores em plantas de cultura de tecidos quando comparadas com as taxas de plantas já aclimatizadas (Wardle et al., 1983; Sutter & Langhans, 1982).

A maioria dos estudos mostra que há uma correlação positiva entre o conjunto de ceras e a sobrevivência de plantas quando transferidas do tubo de ensaio para o substrato (Preece & Sutter, 1991).

Estômato

Os estômatos são originados de uma divisão celular assimétrica, posteriormente dividindo-se paralelamente ao eixo principal da folha, formando as duas células-guarda. O desenvolvimento dos estômatos na folha é um processo que ocorre durante o crescimento foliar e eles estão relacionados com a entrada e saída de ar no interior dos órgãos que se encontram e com a saída de água (Alquini et al., 2003).

A estrutura e o funcionamento do estômato têm sido implicados pelo não controle da entrada e saída de água, mostrado pelas plantas micropropagadas quando removidas do meio de cultura. Em todas as espécies observadas, os estômatos estavam totalmente abertos quando em cultivos *in vitro*. A densidade estomática *in vitro*, medida por número de estômatos por mm^2 , foi maior em maçã (Blanke & Belcher, 1989) e rosa (Capellades et al., 1990) mas, menor em ameixa (Brained et al., 1981), quando comparada com a de plantas que cresceram em casa de vegetação.

A morfologia e a densidade dos estômatos podem ser alteradas *in vitro* por mudanças das condições ambientais. Em rosas que cresceram em condições *in vitro*, o aumento no nível de luz de 25 para $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e o decréscimo da umidade relativa de 100% para 75% resultaram em um estômato muito similar àqueles formados em plantas em casa de vegetação. Os estômatos foram mais elípticos e em menor número (Capellades et al., 1990).

O tempo de fechamento dos estômatos durante a transferência das plantas *in vitro* para casa de vegetação pode ser determinante para a sobrevivência das plantas durante a aclimação. Esse tempo pode ser variável de acordo com a espécie e as condições *in vitro*. Na verdade, a maioria dos estômatos fecha entre 12 e 24 horas após a retirada da planta do meio de cultura. Shackel et al. (1990) calcularam que a perda de água após 24 horas supera duas ou três vezes o peso inicial das plantas. Esses dados revelam que a demanda transpiratória pode resultar em um severo estresse hídrico por meio da resposta de fechamento de estômatos à baixa umidade relativa.

O estresse hídrico pode ser resultado da excessiva transpiração de algumas partes das plantas, especialmente as folhas, ou de uma inadequada absorção de água pelo sistema radicular. A cutícula e o estômato são as principais vias da perda de água pelas folhas.

A proliferação de brotos *in vitro* requer condições especiais, como alta umidade, superfluxo de fatores nutricionais (minerais e carboidratos), alto nível de reguladores de crescimento e baixa intensidade de luz. Porém, essas mesmas condições são as principais causas de má formação de brotos (Gaspar et al., 1987; Ziv, 1987). As condições da cultura de tecidos, embora promovam um aumento na proliferação de brotações e no crescimento de plântulas, são desfavoráveis à formação normal das folhas.

A avaliação das mudanças estruturais que ocorrem em um tecido ou órgão formado em condições *in vitro* é de grande valia para se descobrir a eficiência do processo organogenético e a funcionabilidade deste novo órgão, tornando-se pré-requisito indispensável para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de plantas. Dessa forma, faz-se necessário estudar as mudanças anatômicas de órgãos vegetativos, influenciadas pelo ambiente de cultura de tecidos.



3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi constituído de experimento relativo à aclimatização e ao estudo anatômico de folhas de mudas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne micropropagadas. Para sua realização foram utilizados o Laboratório do Setor de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura e o Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG.

3.1 Fase de multiplicação

O material vegetal foi estabelecido *in vitro* a partir de gemas axilares da cultivar Smooth Cayenne. Estas gemas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e posteriormente lavadas em água destilada e autoclavada. Após este procedimento foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescidos, de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (benzilaminopurinana) e 30 mg.L^{-1} de sacarose em câmara de fluxo laminar.

Após a diferenciação das gemas em novas plântulas, estas foram transferidas para meio de multiplicação com três repicagens (realizadas a cada três meses) em meio de cultura MS acrescidos de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e 30 mg.L^{-1} de sacarose.

Após este período de estabelecimento e multiplicação, as mudas de abacaxizeiro foram mantidas por 30 dias em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento para uniformização e retirada do efeito residual da citocinina e posterior montagem do experimento. Os meios foram solidificados

com 0,7% de ágar e tiveram seu pH ajustado em 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Em todas as fases após a inoculação, as mudas de abacaxizeiro foram mantidas em sala de crescimento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, irradiância de $35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas.

3.2 Aclimatização em diferentes substratos

Após 30 dias em meio de cultura MS sem regulador de crescimento as plântulas foram classificadas por tamanho (aproximadamente 1,5 cm), retiradas do tubo de ensaio e lavadas em água destilada para remover o excesso de meio de cultura no sistema radicular. Após esse processo, foram transferidas para casa de vegetação e transplantadas para vasos contendo três tipos diferentes de tratamentos: substrato Plantimax®, Plantimax® + húmus e Plantimax® + vermiculita. As plântulas foram deixadas em casa de vegetação sob sombrite® 50% onde permaneceram por 180 dias, com sistema de nebulização intermitente e ventilação forçada.

Após esse período de condução do experimento, as plântulas foram avaliadas em relação à altura das mudas, número de folhas, peso da biomassa fresca (PBFPA) e seca (PBSPA) da parte aérea e sistema radicular (PBFR e PBSR) e comprimento da raiz.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e três repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro plantas. Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Scott-Knott, do programa Sisvar (Ferreira, 2000), a 1% e 5% de probabilidade.

3.3 Caracterização anatômica das folhas de plântulas micropropagadas e aclimatizadas em diferentes substratos

Para o estudo anatômico das folhas foram utilizadas plântulas mantidas *in vitro* e mudas com 20, 40 e 60 dias de aclimatização em diferentes substratos.

Folhas completamente expandidas foram coletadas das mudas de abacaxizeiro aos 20, 40 e 60 dias dos três diferentes substratos na fase de aclimatização em casa de vegetação e também das brotações estabelecidas em meio MS sem regulador de crescimento (*in vitro*). As folhas foram fixadas em álcool etílico 70% (v/v).

Os procedimentos para a obtenção das lâminas com os cortes anatômicos das folhas coletadas foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras. Os cortes anatômicos foram efetuados a mão, com auxílio de lâmina de barbear. Posteriormente, sucedeu-se a clarificação em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de três a cinco minutos, e três lavagens em água destilada. Em seguida, o material foi neutralizado com solução de ácido acético 1% (v/v) por um minuto, repetindo-se as lavagens com água destilada (Johansen, 1940; Sass, 1951). Para a avaliação dos tecidos foliares (medições de espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas aquífero e clorofiliano), foram realizados cortes transversais, os quais foram corados com azul de astra-safranina. A partir das seções transversais foram efetuadas três medições de cinco plantas, com auxílio de ocular micrométrica.

Para as avaliações relativas à caracterização dos estômatos (número médio por mm^2 e diâmetro polar e equatorial), foram realizados cortes paradérmicos na região mediana das folhas, os quais foram colocados sobre uma

lâmina contendo safranina a 1%, água glicerinada do material obtido e lutagem com esmalte.

Posteriormente, estas lâminas foram fotomicrografadas utilizando-se um microscópio Olympus CBB em câmara clara e filme ASA 400 colorido.

As medições anatômicas foram analisadas utilizando-se delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 3X3, sendo três substratos e três tempos com cinco repetições. As médias foram comparadas pelo teste de médias Scott-Knott, do programa Sisvar (Ferreira, 2000), a 1% e 5% de probabilidade.

Após essa análise, comparou-se cada substrato isoladamente com o tratamento *in vitro* por meio do teste de médias Scott-Knott, do programa Sisvar (Ferreira, 2000), a 1% e 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fase de multiplicação

Após multiplicação em meio de cultura MS com regulador de crescimento BAP e 30 dias em meio MS sem regulador de crescimento, as plantas apresentaram 100% de formação de brotos (Figura 2), confirmaram-se, assim, os estudos feitos por Moreira (2001) e Almeida (2002), que obtiveram melhor taxa de multiplicação com mudas de abacaxizeiro no meio MS suplementado apenas com BAP e melhor desenvolvimento das mudas em meio MS sem reguladores de crescimento.

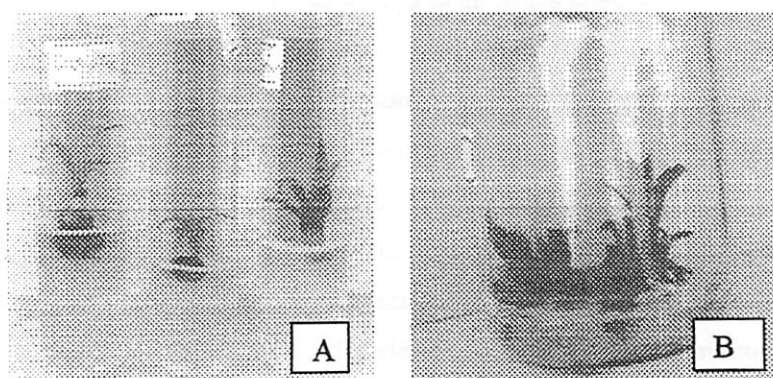


FIGURA 2 Brotações de abacaxizeiro obtidas por gemas axilares inoculadas em meio MS suplementado com BAP (A) e somente MS para uniformização (B). UFLA, Lavras, MG, 2004.

4.2 Avaliação das plantas em diferentes substratos

Verifica-se, por meio das análises de variância (Tabela 1 e 2), que houve interação significativa para todas as variáveis analisadas pelo teste F, constatando-se o efeito dos diferentes substratos.

TABELA 1 Análise de variância para altura de plantas, número de folhas e comprimento do sistema radicular, das plantas de abacaxizeiro aclimatizadas por 180 dias. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	GL	QM		
		Altura	Número de folhas	Comprimento da raiz
Substrato	2	18,2534**	24,8198**	112,4611**
Erro	6	1,7113	1,3767	0,9967
CV (%)		10,58	6,78	6,32

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Maiores alturas das mudas foram obtidas em plântulas que permaneceram 180 dias em substratos com Plantimax® adicionados de vermiculita ou húmus, que diferiram estatisticamente do tratamento no qual as plântulas permaneceram apenas no Plantimax® (Figura 3). Moreira (2001) também obteve maior altura de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola em substratos que continham material orgânico e menor altura no substrato apenas formado por Plantimax®.

Resultados semelhantes foram obtidos por Calvete et al. (2000), ao concluírem que os substratos que apresentaram maior retenção de água e proporcionaram maior crescimento das mudas de morangueiro. Fráguas (2003) também obteve maior altura de mudas com o uso do substrato Plantimax® + húmus na aclimatização de plântulas de figueira “Roxo de Valinhos”, provavelmente pela maior quantidade de nutrientes existentes no meio fornecido na fase inicial de crescimento e desenvolvimento. Este autor também observou redução no crescimento após 60 dias, devido à compactação do substrato, dificultando a absorção de água e nutrientes, uma vez que, por apresentarem maior tamanho, necessitam de maior quantidade de nutrientes e água. O desenvolvimento da parte aérea das plantas fica prejudicado se o sistema radicular não se desenvolve adequadamente. Foram testados diversos substratos para o enraizamento *ex vitro* de macieira e observaram relação inversa entre a capacidade de retenção de água do substrato e a sua capacidade em promover o desenvolvimento das raízes.

Segundo Bellé & Kämpf (1993), o substrato deve apresentar, entre outras características, elevado espaço de aeração, permitindo perfeito crescimento e desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, da parte aérea da planta. Dessa forma, obteve-se também maior número de folhas no substrato contendo húmus, superando significativamente os outros dois tratamentos que não continham a presença do mesmo (Figura 3).

Resultados semelhantes demonstram que a presença de húmus no substrato aumenta consideravelmente o número de folhas promovendo melhor desenvolvimento da planta (Moreira, 2001; Silva 2001).

O húmus influencia as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos e ou substratos, constituindo-se em um fator de grande importância para a sustentabilidade deste ambiente restrito (Rocha, 2000). O número de folhas constitui-se um dos principais fatores no índice de pegamento de mudas em campo, uma vez que é aparato responsável pela captação de energia solar e produção de matéria orgânica por meio da fotossíntese (Souza, 1994).

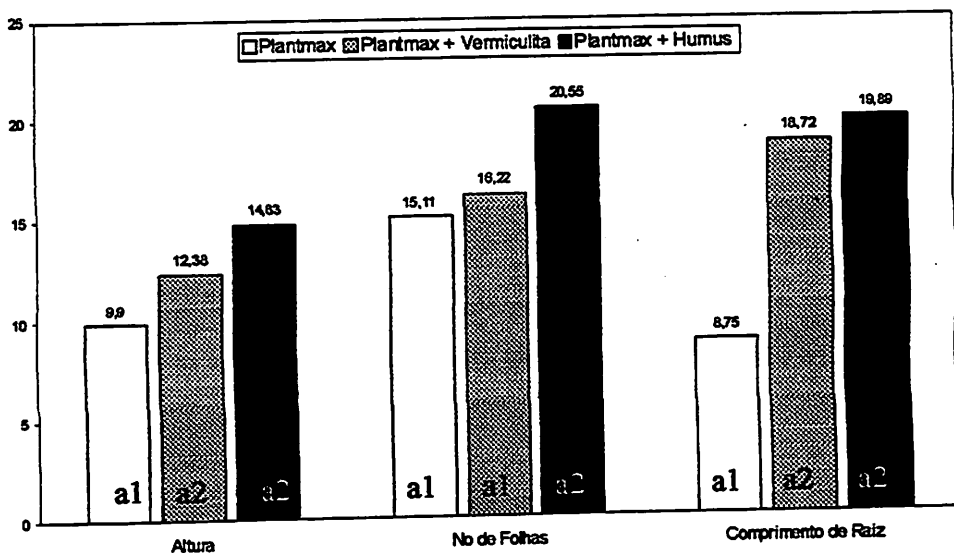


FIGURA 3 Altura das mudas, número de folhas e comprimento de raiz de mudas de abacaxizeiro em função de diferentes substratos em aclimatização em casa de vegetação. Lavras, UFLA, 2004.

Apesar das mudas de abacaxizeiro micropropagadas serem de fácil enraizamento, é importante observar o desenvolvimento das raízes na fase de aclimatização, visto que as raízes formadas *in vitro* podem apresentar-se pouco

ramificadas, quebradiças, isentas de pêlos e até com uma inadequada conexão vascular entre as raízes e as brotações. Às vezes, é necessário que haja a formação de novas raízes (Cailloux, 1984). Neste experimento, o comprimento da raiz também foi maior e significativo para o tratamento que utilizou Plantimax® + húmus (Figura 3).

Peso da biomassa fresca e seca da parte aérea

Os substratos também se mostraram significativos para biomassas frescas e secas da parte aérea e radicular (Tabela 2).

TABELA 2 Análise de variância do peso da biomassa fresca (PBFPa) e seca (PBSPa) da parte aérea, peso da biomassa fresca (PBFR) e seca (PBSR) do sistema radicular de plantas de abacaxizeiro aclimatizadas por 180 dias. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	GL	QM			
		PBFPa	PBSPa	PBFR	PBSR
Substrato	2	101,0536 **	0,6419**	6,5831* *	0,0190*
Erro	6	0,7319	0,0545	0,2380	0,0039
CV (%)		8,49	24,59	22,68	23,35

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

O melhor resultado para peso da biomassa fresca da parte aérea ao final do experimento foi obtido com plântulas em substrato Plantimax® + Húmus (Figura 4). De forma semelhante, os maiores pesos da biomassa seca foram obtidos com o mesmo substrato (Figura 5). Pode-se inferir que, além da melhoria em aspectos nutricionais do substrato, o húmus confere também

melhores propriedades de natureza física e qualidades a ponto de torná-lo mais capaz de suprir a planta em água e nutrientes (Tibau, 1987).

Os menores valores de biomassa fresca e seca foram observados nas mudas de abacaxizeiro quando se utilizou o Plantimax® isoladamente. Para as variáveis peso da biomassa fresca e seca do sistema radicular, houve diferença significativa apenas para o tratamento que utilizou Plantimax® isoladamente (Figura 4 e 5). Resultados contrários foram obtidos por Fráguas (2003) na aclimatização de figueira, resultando em maiores biomassas, tanto da parte aérea como do sistema radicular, com o uso apenas do Plantimax®.

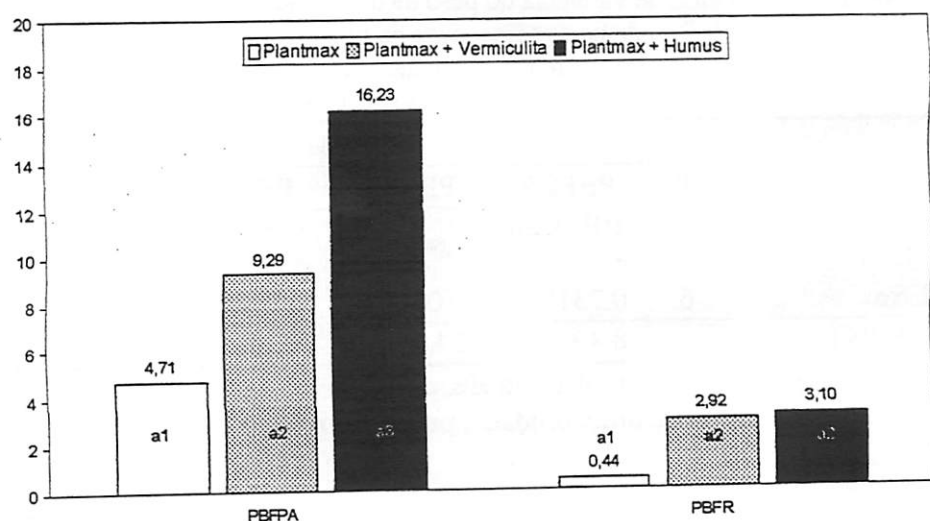


FIGURA 4 Médias de peso da biomassa fresca da parte aérea e sistema radicular do abacaxizeiro em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2004.

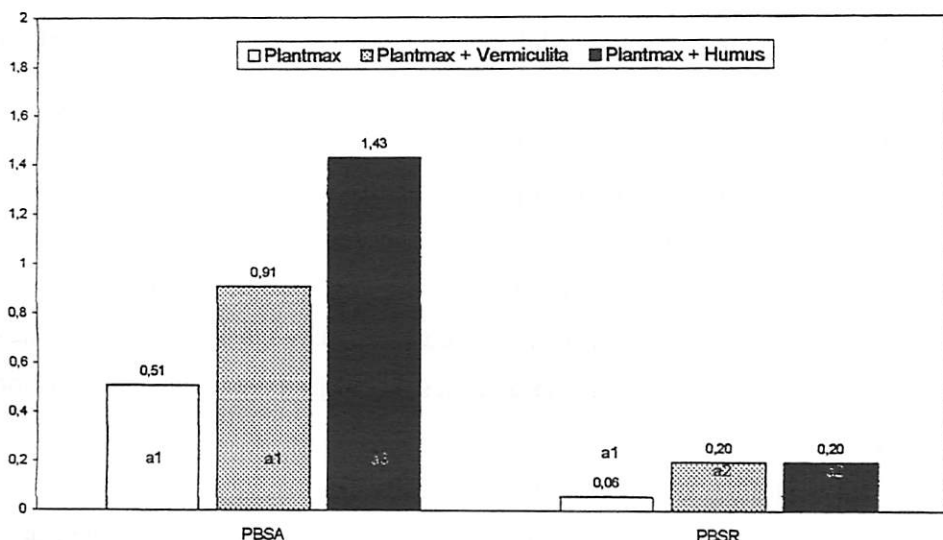


FIGURA 5 Médias de peso da biomassa seca da parte aérea e sistema radicular do abacaxizeiro em diferentes substratos. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Percebe-se que, apesar de se obter respostas para cada espécie, podem-se confrontar respostas contrárias até entre diferentes cultivares. Moreira (2001), trabalhando com abacaxizeiro cv. Perola, obteve maiores crescimentos nas mudas quando utilizou compostos orgânicos nos substratos. Entretanto, Collard et al. (2003) constataram, em trabalho com mudas de abacaxizeiro em diferentes substratos, aumento da altura de 47,2%, do peso de matéria fresca de 65%, e do peso de matéria seca de 66% para o tratamento com Plantimax® em relação ao tratamento do solo suplementado com material orgânico. No tratamento com Plantimax® isoladamente, produziu-se o maior número de mudas.

4.3 Caracterização anatômica das folhas de plântulas micropropagadas e aclimatizadas em diferentes substratos

A partir das seções transversais das folhas de plantas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* e aclimatizadas em casa de vegetação observou-se que a lâmina foliar das mudas apresentou epiderme superior e inferior uniestratificada, hipoestomática, mesofilo homogêneo apresentando camada de hipoderme com células que acumulam água (parênquima aquífero), voltada para a face adaxial e parênquima clorofiliano. Em cortes paradérmicos observou-se um tipo de estômato normalmente encontrado em numerosas famílias de monocotiledôneas, que é o tetracítico que é envolvido por quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células guarda, sendo o par restante polar e freqüentemente menor (Figuras 6, 7 e 10).

Verifica-se, por meio de análise de variância, que houve diferença significativa entre as variáveis anatômicas (espessura de epiderme superior e inferior, parênquimas aquífero e clorofiliano e número de estômatos) de folhas de plântulas aclimatizadas em diferentes substratos ao longo do tempo, não tendo o diâmetro polar e o equatorial apresentado esta diferença significativa (Tabela 3 e 4).

TABELA 3 Resumo da análise de variância para epiderme superior (ES), epiderme inferior (EI), parênquima aquífero (PA) e parênquima clorofiliano (PC) de plantas de abacaxizeiro aclimatizadas por 60 dias. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	GL	QM			
		ES	EI	PA	PC
Substrato	2	757,617**	296,442**	43975,787**	11450,074**
Tempo	2	250,329**	208,141**	12981,532**	109184,627**
Substrato*Tempo	4	109,670**	165,525**	16444,428**	24929,810**
Erro	36	0,741	0,215	6,567	870,460
Total	44				
CV (%)		2,57	2,64	0,81	9,55

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 4 Análise de variância para número médio de estômatos/mm² e diâmetro polar e equatorial (μm) de folhas de abacaxizeiro aclimatizadas. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Fontes de variação	GL	QM		
		Número de estômatos	Diâmetro polar	Diâmetro equatorial
Substrato	2	1351,827**	0,089 n.s.	2,208 n.s.
Tempo	2	2555,920**	0,024 n.s.	20,175**
Substrato*Tempo	4	214,265**	0,908 n.s.	9,256 n.s.
Erro	36	17,575	0,876 n.s.	2,334
Total	44			
CV (%)		4,82	4,81	6,05

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

n.s. não significativo

Observa-se, nas Tabelas 5 e 6, que os resultados de espessura da epiderme superior e inferior variam de acordo com os tratamentos. Houve aumento da epiderme superior aos 20 dias, com espessuras maiores quando se usou Plantimax® ou Plantimax® mais vermiculita (Tabela 5). A partir dos 40 dias o substrato que permitiu maior desenvolvimento da epiderme superior foi o Plantimax® usado isoladamente.

Verificou-se que, até os 20 dias de aclimatização, não houve diferença estatística na epiderme inferior em relação aos tratamentos de Plantimax® + vermiculita ou húmus.

TABELA 5 Espessura média (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima aquífero e clorofiliano do limbo foliar de abacaxizeiro, nos diferentes tratamentos, aos 20 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamentos	Epiderme superior	Epiderme inferior	Parênquima aquífero	Parênquima clorofiliano
Plantimax	35,28 a	12,51 b	306,91 a	217,32 a

Plantimax + vermiculita	30,15 b	13,79 a	274,53 b	229,22 a
Plantimax + húmus	21,29 c	14,01 a	274,53 b	184,76 b

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Da mesma maneira que na epiderme superior, a epiderme inferior mostrou aumento significativo com do substrato Plantimax® usado isoladamente, apresentando alterações bem significativas aos 40 dias (Tabela 6).

Em relação aos outros tecidos, a medição do parênquima aquífero (de reserva) e do parênquima clorofiliano apresentou um comportamento diferenciado em relação às epidermes. Aos 20 dias, o substrato que promoveu um aumento inicial foi o Plantimax® usado isoladamente, porém, a partir dos 40 dias, houve um aumento significativo no parênquima aquífero com o uso do substrato Plantimax® + húmus, que manteve esse aumento até os 60 dias. Já o parênquima clorofiliano apresentou, nos primeiros 20 dias, um aumento progressivo e maior quando usado o substrato Plantimax®. A partir dos 40 dias, o substrato Plantimax® + húmus foi o que favoreceu um crescimento muito maior na espessura desse tecido.

TABELA 6 Espessura média (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima aquífero e clorofiliano do limbo foliar de abacaxizeiro, nos diferentes tratamentos, aos 40 dias de aclimatização. UFLA, Lavras-MG, 2004.

Tratamentos	Epiderme superior	Epiderme inferior	Parênquima aquífero	Parênquima clorofiliano
Plantimax	48,72 a	32,28 a	251,03 c	396,58 a
Plantimax + vermiculita	29,71 c	16,93 b	270,79 b	267,31 b
Plantimax + húmus	31,26 b	12,73 c	421,40 a	424,33 a

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 7 Espessura média (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima aquífero e clorofiliano do limbo foliar de abacaxizeiro, nos diferentes tratamentos, aos 60 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamentos	Epiderme superior	Epiderme inferior	Parênquima aquífero	Parênquima clorofiliano
Plantimax	39,39 a	22,01 a	289,38 c	277,76 c
Plantimax + vermiculita	37,65 b	20,24 b	307,59 b	369,98 b
Plantimax + húmus	28,56 c	13,75 c	435,50 a	411,89 a

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Número de estômatos

Os resultados mostram que o tempo de aclimatização influenciou significativamente a densidade estomática e, diferentemente de muitas espécies, o número de estômatos aumentou com o tempo de aclimatização nas mudas de abacaxizeiro micropropagadas. O substrato que apresentou o maior aumento foi o substrato Plantimax + húmus (Tabelas 8, 9 e 10).

O diâmetro equatorial e o diâmetro polar dos estômatos não apresentaram diferença significativa em relação aos diferentes substratos durante o tempo de aclimatização. Sun et al. (1995) citam que os estômatos são estruturas fundamentais para as plantas porque, através deles, ocorrem os processos de troca gasosa. Portanto, qualquer variação em número e ou tamanho destes pode acarretar uma maior ou menor eficiência da planta quanto à taxa fotossintética.

Resultados semelhantes foram observados por vários autores com diferentes espécies. O número de estômatos por mm^2 foi maior em plântulas de macieira (Blanke & Belcher, 1989) e roseira (Capellades et al., 1990), porém,

menor em ameixeira (Brainerd et al., 1981), e figueira (Fraguas, 2003) se comparado ao das plantas *in vitro*. Conner & Conner (1984) verificaram diferença no número de estômatos entre plântulas *in vitro*, aclimatizadas e propagadas em casa de vegetação, mas, quando esses valores foram expressos em índice estomático, não houve diferença estatística na densidade de estômatos.

TABELA 8 Número médio de estômatos/mm² e diâmetros polar e equatorial (µm) de folhas de abacaxizeiro, nos diferentes tratamentos, aos 20 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamentos	Número de estômatos	Diâmetro equatorial	Diâmetro polar
Plantimax	64,38 b	19,55 a	28,65 a
Plantimax + vermiculita	76,96 a	19,21 a	25,97 b
Plantimax + húmus	74,74 a	19,55 a	25,11 b

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 9 Número médio de estômatos/mm² e diâmetros polar e equatorial (µm) de folhas de abacaxizeiro, nos diferentes tratamentos, aos 40 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Tratamentos	Número de estômatos	Diâmetro equatorial	Diâmetro polar
Plantimax	81,34 c	19,02 a	24,33 a
Plantimax + vermiculita	90,24 b	19,87 a	24,51 a
Plantimax + húmus	108,78 a	19,60 a	24,51 a

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 10 Número médio de estômatos/mm² e diâmetros polar e equatorial (µm) de folhas de abacaxizeiro, nos diferentes tratamentos, aos 60 dias de aclimatização. UFLA, Lavras, MG, 2004.

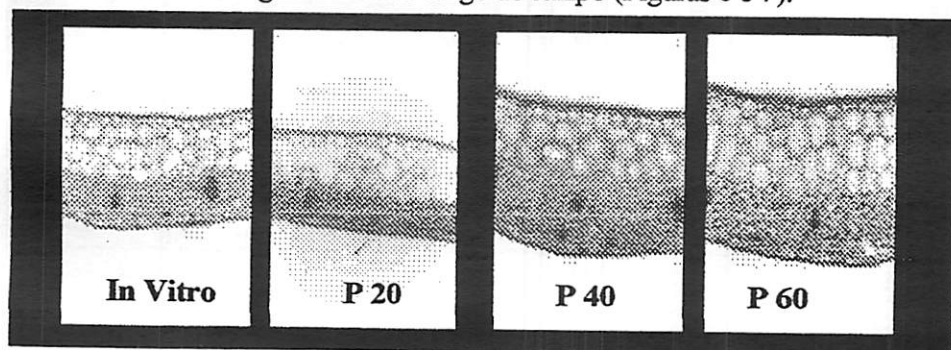
Tratamentos	Número de estômatos	Diâmetro equatorial	Diâmetro polar
Plantimax	89,39 b	19,82 a	23,86 a
Plantimax + vermiculita	89,54 b	19,17 a	25,48 a
Plantimax + húmus	108,04 a	19,55 a	23,11 a

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Análises anatômicas comparativas entre substrato Plantimax® + Húmus e o tratamento *in vitro* ao longo do tempo

A comparar características anatômicas entre o tratamento de mudas *in vitro* e aquelas aclimatizadas em substrato Plantimax® + húmus, observaram-se diferenças entre as mudas cultivadas nos diferentes ambientes ao longo do tempo. As dimensões dos tecidos foliares e o número de estômatos foram influenciados.

Além da organização anatômica dos tecidos foliares apresentar diferenças, como a forma e o arranjo das células entre as mudas *in vitro* e as em fase de aclimatização, as medidas das espessuras das epidermes superior e inferior, dos parênquimas clorofilianos e aquíferos das folhas de abacaxizeiro diferiram de forma significativa ao longo do tempo (Figuras 6 e 7).



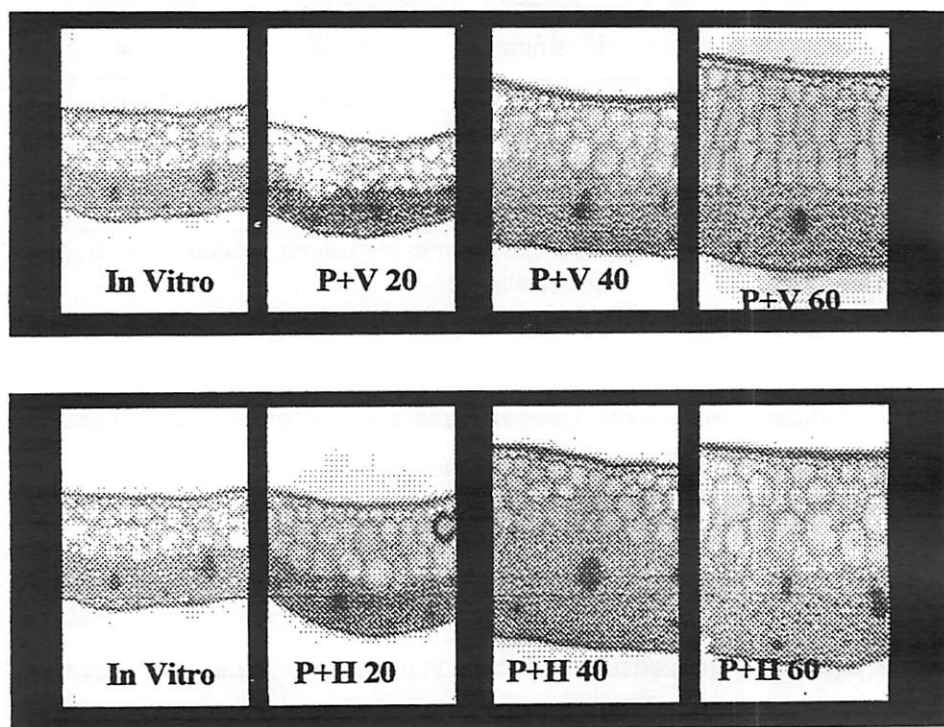
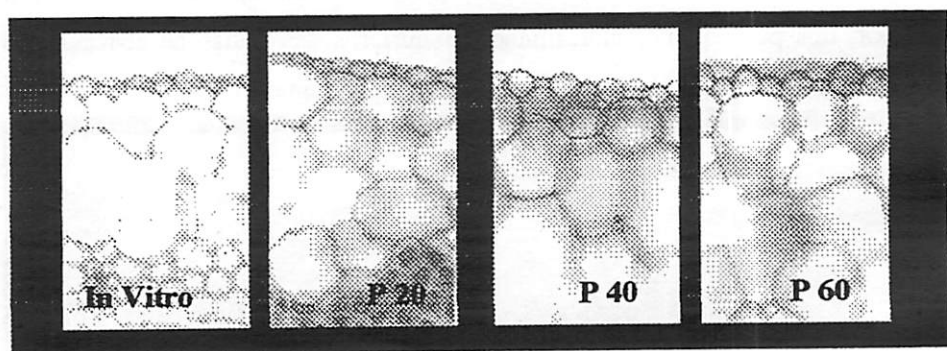


FIGURA 6 Fotomicrografia de seções transversais da folha de abacaxizeiro *in vitro* e aclimatizadas em Plantimax® + húmus, aos 20, 40 e 60 dias, em comparação com os outros substratos (aumento de 10X). UFLA, Lavras, MG, 2004.



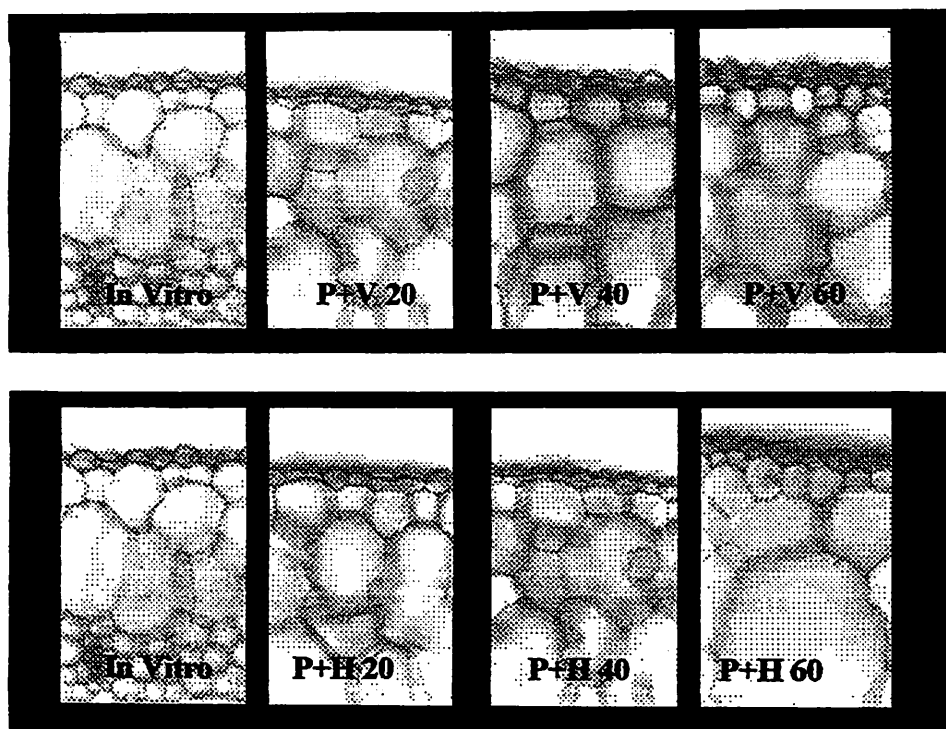


FIGURA 7 Fotomicrografia de seções transversais da folha de abacaxizeiro *in vitro* e aclimatizadas em Plantimax® + húmus aos 20, 40 e 60 dias, em comparação com os outros substratos (aumento de 40X). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Aos 40 dias de aclimatização, observou-se o maior aumento na espessura da epiderme superior, porém, não diferindo das plantas com 60 dias. A epiderme inferior é menos espessa nas plântulas *in vitro* e difere estatisticamente das mudas em fase de aclimatização (Figura 7 e 8).

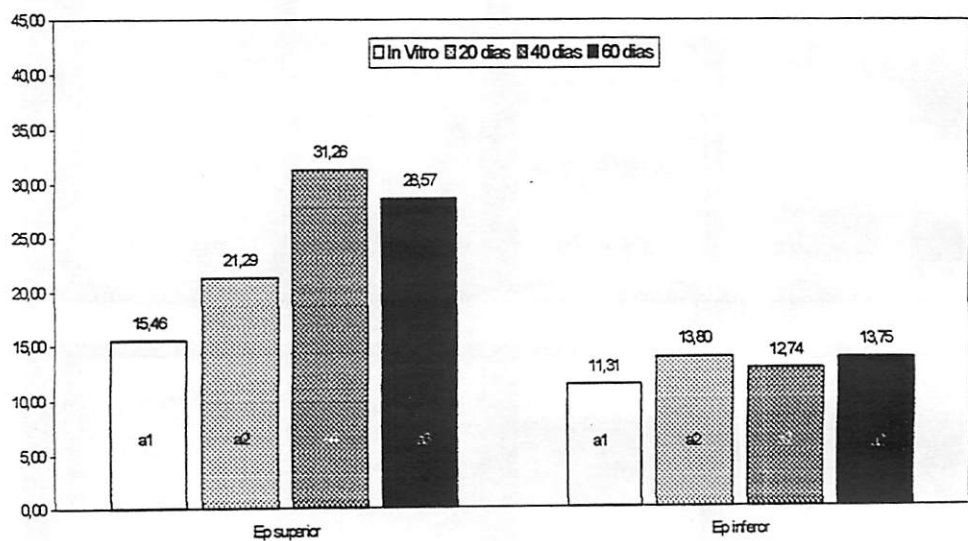
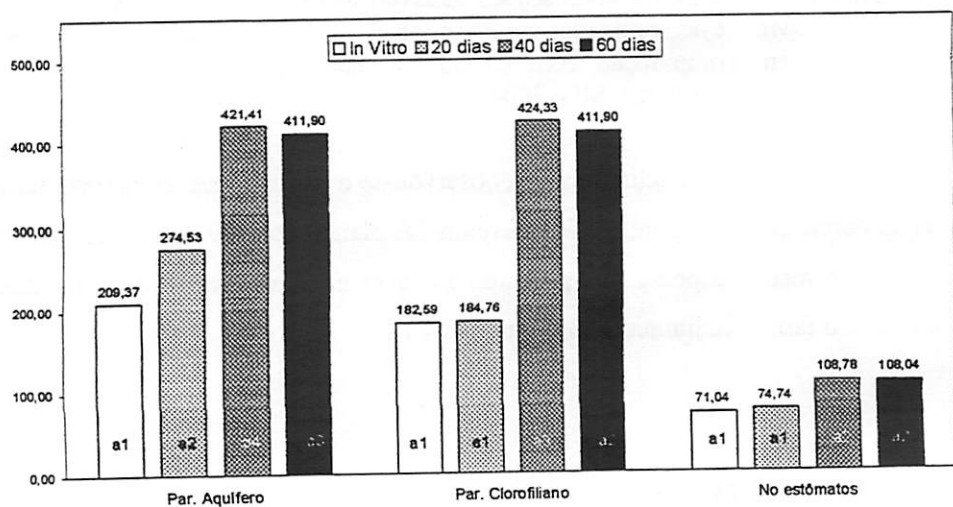


FIGURA 8 Médias de espessuras das epidermes superior e inferior de mudas de abacaxizeiro in vitro e aclimatizadas em substrato Plantimax® +



húmus, aos 20, 40 e 60 dias. UFLA, Lavras, MG, 2004.

FIGURA 9 Médias de espessuras dos parênquimas aquífero e clorofiliano e número de estômatos de mudas de abacaxizeiro *in vitro* e aclimatizadas em substrato Plantimax® + húmus, aos 20, 40 e 60 dias. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Diversos estudos histológicos demonstram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas menos desenvolvidos ou pouco diferenciados, se comparados com os de plantas desenvolvidas em casa de vegetação. Em relação aos tecidos, Brainerd & Fuchigami (1981) verificaram apenas uma camada de células paliçádicas nas folhas de brotações de ameixeira micropropagada, em vez das duas ou três comumente encontradas e maiores espaços intercelulares no mesofilo, quando comparadas com folhas de plantas desenvolvidas na casa de vegetação ou campo, havendo redução desses espaços quando as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação. Segundo observações de Fabbri et al. (1986), as folhas de plantas micropropagadas de morangueiro tornaram-se mais espessas durante a aclimatização devido ao aumento do tamanho das células paliçádicas, mas não houve mudança no número de camadas ou quantidade dos espaços do mesofilo. As folhas formadas durante a aclimatização tinham camadas bem mais espessas dos parênquimas aquíferos e clorofilianos a partir dos 40 dias e, apesar de não ter ocorrido grande aumento na espessura das epidermes, todas se diferenciaram do tratamento *in vitro* (Figuras 7, 8 e 9).

Vários estudos têm sido realizados em outras espécies, analisando diferenças anatômicas e possíveis reorganizações dos tecidos durante a fase de aclimatização. Entre outras espécies em que somente uma camada de células paliçádicas foi formada *in vitro*, estão a framboeseira, o morangueiro (Fabbri et al., 1986) e o cafeeiro (Santos, 2001), apresentando-se mais curtas e não alongadas conforme característica das células paliçádicas de plantas crescidas na

casa de vegetação ou no campo. Fidelis (2000) observou que o mesofilo *in vitro* de *Brosimum guadichaudii* é formado de três a quatro estratos de células, mas sem diferenciação no formato.

Além da diferença significativa nas espessuras do mesofilo das folhas de abacaxi analisadas, percebe-se, igualmente, diferença no formato das células, demonstrando a plasticidade das mesmas em função do tratamento utilizado e das épocas de análise (Figura 6).

Fidelis (2000) também observou que a superfície adaxial das lâminas foliares de *Brosimum guadichaudii* Tréc. obtidas *in vitro* e *in vivo* apresentavam também apenas uma camada de células.

Santos (2001) observou diferenças nas estruturas das folhas de plântulas de cafeeiro obtidas por propagação *in vitro* em relação às propagadas *in vivo*. As folhas do cultivo *in vitro* apresentaram parênquimas paliçádico e lacunoso mais espessos e com células mais curtas e não alongadas. Além disso, nas folhas cultivadas *in vivo* não houve presença de esclerênquima e o sistema vascular foi mais desenvolvido. Fidelis (2000) observou um número maior de tricomas simples e secretores nos caules de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.) obtidos *in vitro*.

Soares (2003) avaliou, em seu trabalho com ingazeiro [Inga Vera Willd. Subsp. Affinis (DC.) T. D. Penn.], que a epiderme abaxial das lâminas foliares de folhas obtidas por meio da aclimatização apresentaram média maior em sua espessura que a de folhas obtidas pelo cultivo *in vitro*. Provavelmente, esse fato pode estar relacionado à irradiação nas folhas cultivadas nos diferentes ambientes. A maior irradiação nas folhas aclimatizadas ocasionou o aumento na espessura da epiderme abaxial, como forma de minimizar os efeitos negativos do excesso de radiação luminosa na planta.

Um aspecto visível nas epidermes adaxial e abaxial das folhas produzidas, tanto pelo cultivo *in vitro* quanto pelo *in vivo*, é a cutícula. Mesmo

sendo visualmente mais espessa na folhas produzidas pelo cultivo *in vivo*, sua presença nas folhas obtidas *in vitro* é muito importante. A cutícula, assim como os estômatos, está relacionada à umidade do ambiente. Esta pode evitar a perda excessiva de água pela planta, sendo um fator benéfico para a sobrevivência de plântulas produzidas *in vitro* em ambientes com menor umidade como os ambientes *ex vitro*. Neste trabalho não foi observada mudança na cutícula.

Santos (2001) trabalhou com lâminas foliares de diferentes cultivares de café (Café) (*Coffea arabica* 'Rubi' e *Coffea canephora* 'Apoatã'), obtidas por cultivo *in vivo* e *in vitro*. Esta autora observou que, nos dois tratamentos, o parênquima paliçádico das folhas era constituído por apenas uma camada de células na cultivar Rubi e estratificado na cultivar Apoatã, com quatro camadas de células nas folhas obtidas *in vitro* e de nove a dez camadas de células nas folhas obtidas *in vivo* e que o parênquima paliçádico das folhas obtidas *in vivo* possuía sempre células maiores que o das folhas obtidas *in vitro*. Em relação ao parênquima esponjoso, na cultivar Rubi, a autora observou um parênquima esponjoso formado de cinco a seis camadas de células nas folhas obtidas *in vitro* e de oito camadas de células nas folhas obtidas *in vivo*.

Em trabalho de Soares (2003) percebeu-se que as diferenças entre as lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vivo* e *in vitro* foram causadas também nos parênquimas paliçádico e esponjoso e não pelo número de camadas de células do mesófilo. Enquanto apenas o parênquima esponjoso apresentou diferenças no número de camada de células entre os cultivos *in vitro* e *in vivo* (uma camada a mais para o cultivo *in vivo*), as espessuras da epiderme abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso apresentaram-se sempre significativamente maiores nas lâminas foliares obtidas pelo cultivo *in vivo*. As diferentes condições de umidade relativa e de luz entre os ambientes *in vivo* e *in vitro* podem ter contribuído para as diferenças observadas na lâmina foliar do ingazeiro.

Na Figura 10 observam-se estômatos do tipo tetracítico com aumento de números por mm^2 até os 40 dias, não ocorrendo diferença em seus formatos durante todo o experimento.

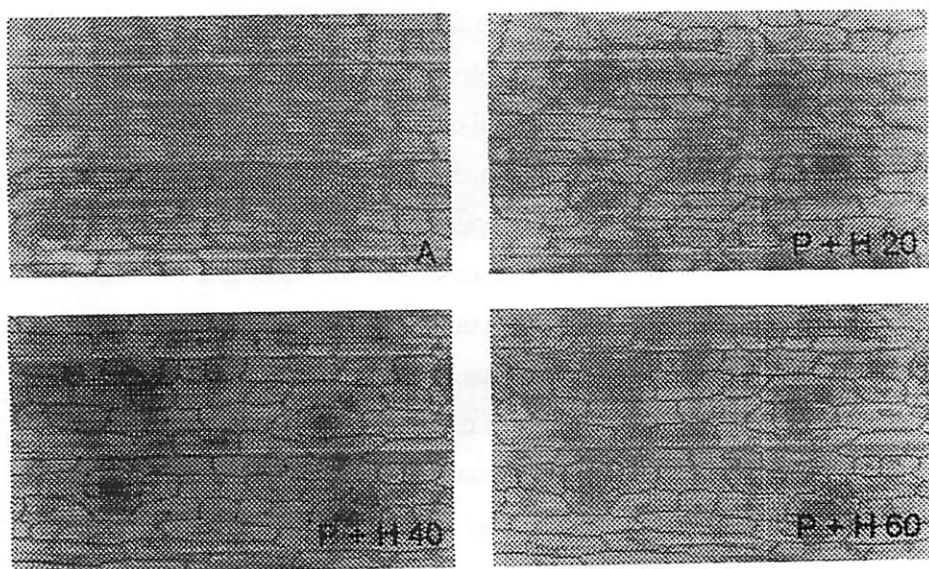


FIGURA 10 Secções paradérmicas de lâminas foliares de folhas de abacaxizeiro obtidas pelo cultivo *in vitro* (A) e aclimatizadas em Plantimax® + húmus, aos 20,40 e 60 dias (B). UFLA, Lavras, MG, 2004.

5 CONCLUSÕES

O melhor meio de aclimatização para plântulas micropropagadas de abacaxizeiro foi o uso de substrato suplementado com matéria orgânica. O tempo de permanência em casa de vegetação também deve ser avaliado, pois o uso deste substrato com maior conteúdo de matéria orgânica (Plantimax® +

húmus) propiciou maior desenvolvimento da parte aérea e radicular das mudas e permitiu que, a partir de 40 dias de aclimatização, já não se verificassem mais mudanças significativas na anatomia foliar das mesmas.

Plântulas estabelecidas em meio MS apresentaram bom desenvolvimento durante os primeiros 20 dias em substrato Plantimax® na aclimatização, porém, demonstraram melhor desenvolvimento aos 40 dias, quando o substrato continha húmus na sua formulação.

As estruturas foliares desenvolvidas *in vitro* apresentaram os parênquimas aquífero e clorofiliano menos espessos que na fase de aclimatização.

O número de estômatos de plântulas *in vitro* de mudas de abacaxizeiro foi menor que o das mudas após a aclimatização e não houve diferença em seus diâmetros polar e equatorial.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M. et al. Otimização do protocolo de micropropagação do abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 2, p. 296-300, ago. 2000.

ALQUINI, Y. et al. Epiderme. In: _____. *Anatomia vegetal*. Viçosa: Editora UFV, 2003. p. 87-108.

BAKER, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. (Ed.) *The plant cuticle*. London: Academic Press, 1982. p. 139-165

BALLESTER-OLMOS, J. F. **Substratos para el cultivo de plantas ornamentales**. Valencia: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 1992. 44 p. (Hojas Divulgadora, 11).

BELLÉ, S.; KÄMPF, A. N. Produção de mudas de maracujá amarelo em substratos à base de turfa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 3, p. 385-390, mar. 1993.

BLANKE, M. B.; BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 85-89, 1989.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.

BUKOVAC, M. J.; PETRACEK, P. D.; FADER, R. G.; MORSE, R. D. Sorption of organic compounds by plant cuticle. *Weed Science*, Champaign, v. 38, n. 3, p. 289-298, May 1990.

CAILLOUX, M. Plant tissue culture: rapid propagation, induced mutation and the potencial role of protoplast techniques. In: VOSE, P. B ; BLIXT, S. G. *Crop breeding*. New York, 1984. p. 311-460.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). *Substrato para plantas – a base da produção vegetal em recipientes*. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 257-264.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

COLLARD, F. H.; ALMEIDA, A.; COSTA, M. C. R. Obtenção de mudas de abacaxi da variedade smooth cayenne (*Ananas comosus* L) a partir do seccionamento transversal circular do caule submetido a diferentes substratos. Disponível em: www.unitau.br/prppg/iniciant/veic/tabela_resumos_bio.htm >. Acesso em: 2004.

CONNER, L. N.; CONNER, A. J. Comparative water loss from leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured *in vitro* and *in vivo*. *Plant Science Letters*, Clare, v. 36, n. 3, p. 241-246, 1984.

COUTINHO, M.; CARVALHO, E. J. M. Caracterização das propriedades de alguns substratos para a propagação de mudas. *Bragantia*, Campinas, v. 14, p. 167-176, 1983.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Pathological and physiological problems related to "in vivo" culture of plant. *Parasitica*, Gembloux, v. 40, n. 1, p. 69-75, 1984.

DEVINE, M. D. Mechanisms of herbicide absorption and translocation in plants. *Weed Science*, Champaign, v. 38, n. 3, p. 279, May 1990.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. *Physiology of herbicide action*. London: Prentice Hall, 1993. 441 p.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E. The acclimatization of micropropagated plants. In VASIL, I. K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications*. Orlando: Academic Press, 1984. v. 1, p. 123-129.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S. K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 331-337, May 1986.

FAUTH, A.; TOFOL, M.; SILVA, A. L.; MARASCHIN, M. Aclimação de mudas de abacaxi (*Ananas comosis* (L) Merrill) resistentes a fusariose, cultivados *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 16, n. 2, p. 7-12, 1994.

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

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum guadichaudii* Tréc. Desenvolvidas in vitro e in vivo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, abr./jun. 2000.

FITZPATRICK, G. E.; DUKE, E. R.; KLOCK-MORE, K. A. Use of compost products for ornamental crop production: research and grower experiences. **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 6, p. 941-944, Oct. 1998.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION - FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em : 25 abr. 1998.

FRAGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos'**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FUCHIGAMI, L. H.; CHENG, T. Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically culture plum. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, July 1981.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, R.; MAENE, L.; PAQUES M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 1, p. 152-166.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 - The Technology**, Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T. F.; CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftaleno acético) na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, 1987. p. 8.

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-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

HOLLOWAY, P. J. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: na overview. In: CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. **The plant cuticle**. London: Academic Press, 1982. p. 1-32.

HOWARD, B. H. Propagation. In: ROM, R. C.; CARLSON, R. F. **Rootstocks for fruit crops**. New York: Wiley InterScience, 1987. p. 29-77.

INFORZATO, R.; GIACOMELLI, E. J.; ROCHELLE, L. A. Sistema radicular do abacaxizeiro aos 4, 8, 12 meses, plantado no início da estação seca em solo latossolo vermelho escuro-orto. *Bragantia*, Campinas, v. 27, n. 11, p. 135-41, mar. 1968.

IUCHI, V. L. **Morfologia, biologia floral, propagação e crescimento de 'Rainha do Abismo' (*Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore)**. 1994. 168 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-hill, 1940. 430 p.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985. 492 p.

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

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 88 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnadian. *Annals of Botany*, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1988.

MARTIN, J. T.; JUNIPER, B. E. **The cuticles of plants**. Edinburgh: St. Martin's Press, 1970. 178 p.

MEDINA, J. C. Abacaxi. 1: cultura. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Frutas Tropicais 2: abacaxi**. Campinas, 1987. p. 1-132.

MELO, J. T.; SILVA, J. A. da; ALMEIDA TORRES, R. A. de; SILVEIRA, C. E. dos S. da; CALDAS, L. S. Coleta propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 195-231.

MOREIRA, M. A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananás comosus* (L) Merrill cv. Pérola**. 2001. 81 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI L. A. (Ed.). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p. 19-40.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NIEUWKERK, J. P.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 3, p. 516-518, June 1986.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PAUL, J. L.; LEE, C. I. Relation between growth of *Chrysanthemum* and aeration of conerainer media. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 101, n. 5, p. 500-503, Sept. 1976

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Martins Nijoff, 1990. 326 p.

POOLE, R. T.; WATERS, W. E. Evaluation of various pottings media for growth of foliage plants. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, orlando, v. 85, p. 395-398, 1972.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation - tecnology and application**. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

PY, C.; LACOUÉILHE, J. J.; TEISSON, C. **L'ananas: as culture e se produits**. Paris: Maisonneuve e Larose, 1984. p. 21-35.

QI-GUANG, Y.; READ, P. E.; FELLMAN, C. D.; HOSIER, M. A. Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on Chinese chestnut culture in vitro. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 133-134, Feb. 1986.

RAIJ, B. Van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres/Potafos, 1991. 373 p.

READ, P. E.; FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 166, p. 15-20, 1985.

REINHARDT, D. H. R. C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 13-19, 1998.

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

ROCHA, M. T. **Fertilidade orgânica e qualidade do solo: um estudo de alguns indicadores de manejo sustentável**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SALVADOR, E. D. **Caracterização física e formulação de substratos para o cultivo de algumas plantas ornamentais**. 2000. 148 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SANTOS, B. R. **Propagação in vitro e abordagem fitoquímica em Salix (Salix humboldtiana Willd)**. 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, C. G. **Micropropagação e caracterização bioquímico-anatômica em Coffea arabica e Coffea canephora**. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 115, n. 3, p. 468-472, July 1990.

SHARGOOL, P. D.; NGO, T. T. **Current topics in plant molecular biology - biotechnological applications of plant cultures**. Florida: CRC, 1994. 214 p.

SILVA, A. B. **Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Gloxinia (Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; MACIEL, A. L. R.; ALVES, J. M. C.; PEREIRA, A. B. Aclimação de brotações de abacaxi (*Ananas comosis* L.) produzidas *in vitro*: ação de Agromix, húmus e Kelpak. *Revista da Universidade de Alfenas*, Alfenas, v. 4, n. 2, p. 107-110, 1998.

SILVA, C. R. de R. e.; SANÁBIO, D. **Cultura do abacaxizeiro informações básicas**. Lavras – MG. : UFLA, 1996. (Boletim técnico, 9).

SOARES, et al. Caracterização anatômica de folhas obtidas por cultivo *in vivo* e *in vitro* de ingazeiro (*Inga vera* subsp. *Afinis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras, MG. *Anais...* Lavras, 2003. p. 279.

SOUZA, H. U. **Efeito da composição e doses de superfosfato simples no crescimento e nutrição de mudas de bananeira (*Musa sp*) cv. Mysore obtidas por cultura de meristemas**. 1994. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SOUZA, J. da S.; CARDOSO, C. E. L.; TORRES FILHO, P. Situação da cultura no mundo e no Brasil e importância econômica. In: CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 403-428.

- SUN, O. J.; SWEET, G. B.; WHITEHEAD, D.; BUCHAN, G. D. Physiological responses to water stress and waterlogging in nothofagus species. *Tree Physiology*, Victoria, v. 15, n. 10, p. 629-638, Oct. 1995.
- SUTTER, E. Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated in vitro. *Annals of Botany*, London, v. 55, n. 3, p. 321-329, 1985.
- SUTTER, E. G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from in vitro culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1988.
- SUTTER, E. G.; LANGHANS, R. W. Epicuticular wax formation on carnadian plantlets regenerated from shoot tip culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 104, n. 4, p. 493-496, July 1979.
- SUTTER, E. G.; LANGHANS, R. W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture, *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 60, n. 12, p. 2896-2902, Dec. 1982.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: _____. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 21, p. 517-540.
- TIBAU, A. O. *Matéria orgânica e fertilidade do solo*. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 220 p.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis in plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). *Plant cell culture, a practical approach*. Oxford: IRL, 1985. p. 79-105.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1990. 433 p.
- VELINI, E. D.; TRINDADE, M. L. B. Comportamento de herbicidas na planta. Época de aplicação de herbicidas In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE MANEJO INTEGRADO DE PLANTAS DANINHAS EM HORTALIÇAS, Botucatu, 1992. *Anais...* Botucatu, 1992. p. 65-85.
- VILLALOBOS V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI L. A. (Ed.). *Cultivo*

de tejidos en la agricultura - fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1993. p. 19-40.

WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. In vitro acclimatization of aseptically culture plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 386-389, May 1983.

ZIV, M. "In vivo" hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: **WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). Plant tissue culture and its agricultural applications.** London: Butterworths, 1987. p. 187-196.

