

**MICROPROPAGAÇÃO E ASPECTOS DA
ANATOMIA FOLIAR DA FIGUEIRA 'ROXO DE
VALINHOS' EM DIFERENTES AMBIENTES**

CHRYSYTIANE BORGES FRÁGUAS

2003

CHRYSYTIANE BORGES FRÁGUAS

**MICROPROPAGAÇÃO E ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR
DA FIGUEIRA ‘ROXO DE VALINHOS’ EM DIFERENTES
AMBIENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

O objetivo da evolução é o de olhos cada vez mais perfeitos num mundo em que há sempre mais para ver.

Teilhard de Chardin

Aos meus pais, José Carlos e Zilda
A meu irmão Carlos Eduardo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força recebida todos os dias.

À Universidade Federal de Lavras e a CAPES, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao prof. Moacir Pasqual pela orientação, ensinamentos e amizade durante todo curso.

Ao prof. Evaristo Mauro de Castro pelo precioso auxílio na realização dos trabalhos de anatomia.

Ao Carlos Vinícius pela ajuda na realização dos cortes anatômicos.

Aos laboratoristas Vantuil Antônio Rodrigues e Antônio Clarete de Oliveira pela colaboração na condução dos experimentos e pelos bons momentos proporcionados durante todos esses anos.

À Alba Regina pela amizade e preciosa ajuda na realização dos experimentos.

Ao Leonardo pela grande força e amizade nestes anos.

À Cida Araújo, Cida Moreira, Ester, Fabíola, Manuela, Flávia, Keize, Leila, Adriana, Elda, Ana Valéria, Tatiana, Fernanda, Lúcia, Kelceane, Adriano e Enoque pelos momentos de estudos, convivência e amizade.

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

CHRYSYTIANE BORGES FRÁGUAS

MICROPROPAGAÇÃO E ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DA
FIGUEIRA ‘ROXO DE VALINHOS’ EM DIFERENTES AMBIENTES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 6 de fevereiro de 2003.

Leonardo Ferreira Dutra - UFLA

Evaristo Mauro de Castro - UFLA

Moacir Pasqual – UFLA

Orientador

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 A espécie <i>Ficus carica</i> L.....	03
2.2 Micropropagação da figueira.....	05
2.2.1 Reguladores de crescimento.....	08
2.2.2 Carvão ativado.....	12
2.2.3 Aclimatização de mudas micropropagadas.....	16
2.3 Anatomia das plantas micropropagadas.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Fase de multiplicação	25
3.1.1 BAP e carvão ativado na multiplicação <i>in vitro</i>	26
3.1.2 Cinetina e GA ₃ na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Ficus carica</i>	26
3.1.3 Cinetina e meio de cultura WPM na multiplicação <i>in vitro</i>	26
3.2 Fase de aclimatização	27
3.2.1 Tempo de permanência em meio de cultura e diferentes substratos na aclimatização da figueira.....	27
3.3 Estudo anatômico foliar	28
3.3.1 Aspectos da anatomia foliar de plântulas micropropagadas, aclimatizadas e adultas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 BAP e carvão ativado na multiplicação <i>in vitro</i>	30
4.2 Cinetina e GA ₃ na multiplicação <i>in vitro</i>	51
4.3 Cinetina e meio de cultura WPM na multiplicação <i>in vitro</i>	62
4.4 Tempo de permanência em meio de cultura e diferentes substratos na aclimatização da figueira.....	72
4.5 Aspectos da anatomia foliar de plântulas micropropagadas, aclimatizadas e adultas	82

5 CONCLUSÕES.....	93
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMO

FRÁGUAS, Chrystiane Borges, Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes. **Lavras: UFLA, 2003, 110p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)***

Este trabalho teve como objetivo estudar a multiplicação *in vitro*, aclimatização e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes. Para a multiplicação foram realizados três experimentos avaliando a influência do carvão ativado e BAP, cinetina e GA₃ e diferentes concentrações do meio de cultura WPM e cinetina. Os tubos ou frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com irradiância de 35 $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Para a aclimatização, testou-se dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem reguladores de crescimento e diferentes substratos. As plantas permaneceram em casa-de-vegetação com sistema de nebulização intermitente e tela de sombreamento 50% (sombrite[®]), durante o primeiro mês. O estudo anatômico foliar foi realizado comparando-se as plântulas *in vitro*, com 20, 40 e 60 dias de aclimatização e as cultivadas no campo. Na multiplicação, verificou-se que o carvão ativado inibe a multiplicação e as brotações obtidas com BAP são pequenas, vitrificadas e possuem excesso de calo. Com a utilização de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina obteve-se brotações maiores e sem vitrificação e o GA₃ causou excessivo estiolamento das plântulas, além de vitrificação, clorose e necrose apical. A concentração padrão (100%) do meio de cultura WPM combinada com 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cinetina é ideal para a multiplicação. Plântulas cultivadas por 30 dias em meio WPM sem reguladores de crescimento apresentam bom desenvolvimento em substrato Plantmax[®] durante a aclimatização. No estudo anatômico foliar verificou-se diferenças entre os ambientes. As plântulas *in vitro* possuem os tecidos foliares pouco desenvolvidos e grande número de estômatos, exigindo maiores cuidados na etapa inicial da aclimatização. O número de estômatos reduz durante a aclimatização, auxiliando o processo de adaptação das plantas às novas condições ambientais. Com 60 dias de aclimatização as novas folhas produzidas possuem alguns aspectos anatômicos que podem conferir maior eficiência fotossintética e maior capacidade de regulação hídrica das plantas.

* Orientador: Moacir Pasqual - UFLA

ABSTRACT

FRÁGUAS, Chrystiane Borges, **Micropropagation and anatomical leaf aspects on fig 'Roxo de Valinhos' in different environments**. Lavras: UFLA, 2003, 110p. (Dissertation – Master Program in Agronomy/Crop Science)*

The *in vitro* multiplication, acclimatization and leaf anatomy on fig 'Roxo de Valinhos' in different environments was investigated. In the first part, were tested activated charcoal and BAP, kinetin and GA₃ and different WPM culture medium concentrations combined with kinetin. Test tubes or flasks containing the explants was maintained at growth room, with 27±1°C, 35 μM.m⁻².s⁻¹ irradiance and 16 hours of photoperiod. On the second part, plantlets days permanence in culture medium without growth regulators and different substrates was tested. The plants stayed in greenhouse under intermittent mist and 50% shadow during the first month. Leaf anatomy was made to compare *in vitro* plantlets, with 20, 40 and 60 days acclimatization and plants cultivated in field conditions. The activated charcoal inhibit the multiplication. Small, vitrified and with callus excess shoots are obtained by BAP treatment. Larger shoots and without vitrification was obtained with kinetin 0,5 mg.L⁻¹, meanwhile GA₃ induced excessive etiolation, vitrification, clorosis and apical necrosis at the plantlets. Better multiplication are obtained with WPM 100% and kinetin 0,5 mg.L⁻¹ combination. Cultivated plantlets for 30 days in WPM medium without growth regulators present good development on Plantmax[®] substrate during acclimatization. At leaf anatomical study was verified differences among the environments. Plantlets *in vitro* have little developed leaf tissue and great stomatas number. Stomatas number reduces during the acclimatization. With 60 days of acclimatization the news leafs presents some anatomical aspects that can check larger fotossintetic efficiency and capacity of hidric plant regulation.

* Major Professor: Moacir Pasqual - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de figos da América do Sul e ocupa a 11^a colocação entre os principais produtores mundiais, sendo o segundo maior exportador de figo *in natura* no mundo, superado apenas pela Turquia (FAO, 1998). A exportação é vantajosa aos produtores, pois, além da colheita brasileira acontecer na entressafra dos principais países produtores, ocorre no período de excesso de oferta no mercado interno, quando os preços estão abaixo do custo de produção.

A figueira é cultivada tanto em regiões subtropicais quentes como nas de clima temperado, mostrando grande capacidade de adaptação. Destacam-se pela área plantada os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais (Penteado, 1999), sendo que o último caracteriza-se pela produção de figos verdes destinados à industrialização na forma cristalizada ou em calda. Nesse contexto, o município de Lavras oferece vantagens como localização geográfica e clima favorável ao desenvolvimento de diversas espécies frutíferas. Aliado à necessidade de buscar novas alternativas de renda para o pequeno produtor rural, criou-se o Programa Frutilavras que atualmente conta com o figo como principal cultura, registrando 25 ha plantados.

No Brasil, o cultivo da figueira baseia-se praticamente no plantio de uma única variedade, a Roxo de Valinhos. A planta caracteriza-se pelo seu elevado vigor e produtividade e apresenta frutas do tipo comum, que são formados partenocarpicamente.

A maioria dos plantios existentes no Estado de São Paulo apresenta o vírus do Mosaico, que é transmitido por estaquia, método convencional de propagação da figueira. Nematóides, juntamente com o vírus do Mosaico, constituem sérios problemas fitossanitários para os ficicultores. A tecnologia de produção e conservação pós-colheita inadequadas e a concorrência com outras

frutas mais populares são alguns dos fatores que dificultam a ficicultura no Brasil.

Considerando as amplas possibilidades de produção e comercialização do figo tanto no mercado interno como externo, há necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de plantio aliado à obtenção de mudas sadias e isentas de patógenos, favorecendo a formação de frutos dentro dos padrões de qualidade. As diversas técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais vêm sendo utilizadas com sucesso e com vários objetivos, desde a obtenção de mudas sadias de diversas espécies até o apoio a programas de melhoramento genético.

Na fase de multiplicação *in vitro*, embora o principal objetivo seja obter maior número de brotos por explante e em curto espaço de tempo, é necessário considerar alguns aspectos qualitativos importantes, de forma a garantir a obtenção de plântulas sem qualquer alteração morfológica e variação somaclonal. Outra etapa da micropropagação que inspira cuidados é a aclimatização, devido à dificuldade de transferir com sucesso plântulas da condição *in vitro* para a casa-de-vegetação e posteriormente para o campo, em função da grande diferença entre essas condições ambientais.

Entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos no Brasil com figueira em relação à micropropagação, restando algumas lacunas a serem estudadas visando a obtenção de plântulas perfeitas e com elevado percentual de sobrevivência durante e após a aclimatização. Poucas são as informações sobre como a anatomia de órgãos vegetativos, principalmente de plantas micropropagadas, é afetada pelas condições ambientais de cultivo ou como a anatomia das plantas transplantadas é modificada durante a aclimatização. A avaliação da mudança estrutural que ocorre durante a aclimatização é necessária para a compreensão deste processo de adaptação, sendo essencial para o desenvolvimento de um eficiente protocolo de micropropagação.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para a multiplicação *in vitro* e aclimatização de plântulas de figueira e, caracterizar alguns aspectos de anatomia foliar na condição *in vitro*, na fase de aclimatização e em plantas adultas no campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie *Ficus carica* L.

A figueira cultivada tem o nome botânico de *Ficus carica* L., pertence à família Moraceae e apresenta número diplóide (2n) de cromossomos igual a 26 (Darlington e Wylie, 1955). A família Moraceae inclui 60 gêneros e mais de 2.000 espécies de árvores, arbustos, trepadeiras e pequenas ervas, sendo que predominam indivíduos com hábito de crescimento arbóreo ou arbustivo. Os indivíduos dessa família, quase que sem exceção, apresentam látex. O gênero *Ficus* compreende cerca de 1.000 espécies, algumas das quais produtoras de frutos comestíveis, e é dividido em 48 subgêneros. A espécie *Ficus carica* L. pertence ao subgênero Eusyce, que é caracterizado por apresentar somente flores unissexuais e por ginodioicismo (Simão, 1998).

A planta da figueira pode desenvolver-se formando árvores de médio a grande porte. No Brasil, as técnicas culturais utilizadas, especialmente as podas anuais de inverno, condicionam as plantas a um porte arbustivo, com longevidade econômica de cerca de 30 anos.

As folhas da figueira são grandes, caducas, lobadas e suas características de tamanho, forma, cor, textura e pecíolo são utilizadas para diferenciação varietal (Pereira, 1981).

O número de ramos é variável e depende da finalidade de exploração e do sistema de condução. Nas operações de poda de inverno ou verão e na colheita das frutas, nota-se abundante exudação de látex através dos ferimentos. Nesse látex existe uma enzima proteolítica denominada ficina, que juntamente com os pêlos existentes na epiderme das folhas e das frutas causa irritação na pele, principalmente durante as desbrotas, colheita e embalagem (Pereira e Nachtigal, 1999). O sistema radicular é do tipo fibroso, no geral pouco profundo, podendo estender-se a grandes distâncias quando encontra condições favoráveis.

O figo é originado a partir do desenvolvimento das flores dentro de um receptáculo denominado sicônio; sendo assim, a fruta da figueira é, na realidade, uma infrutescência, pois não é originada do ovário. A parte suculenta do figo consiste principalmente de tecido parenquimatoso dos órgãos florais, cujas células se tornaram maiores e armazenam substâncias de reserva. Os frutos verdadeiros da figueira são os aquênios, que se formam pelo desenvolvimento dos ovários. Entretanto, no caso da espécie cultivada no Brasil, os aquênios encontram-se ocos, devido à não polinização. Para que ocorra a polinização é necessária a presença da vespa *Blastophaga psenes* L., que é um agente natural de polinização em *Ficus carica*, e do caprifigo, no qual esses insetos ovipositam e se desenvolvem. A polinização ou caprifigação ocorre quando as vespas saem do interior dos frutos do caprifigo e penetram em outro tipo de figo, levando os grãos de pólen. No Brasil, os caprifigos existem apenas em coleções experimentais devido à inexistência desta vespa. No caso da variedade Roxo de Valinhos, a fixação e o desenvolvimento das frutas ocorre partenocarpicamente, não sendo necessário o estímulo da polinização e nem a formação de sementes para a frutificação (Maiorano, 1997; Pereira e Nachtigal, 1999).

As frutas dessa variedade apresentam coloração roxo-violácea escura, alcançando cerca de 7,5 cm de comprimento e 60 a 90 gramas. São de formato oblongo-periformes com ostíolo grande e aberto. A polpa mostra coloração

róseo-avermelhada, com cavidade central, macia e de sabor agridoce. Podem ser utilizadas para o consumo *in natura* quando maduras, industrializadas verdes, inchados e maduros ou rami (Pereira e Nachtigal, 1999).

Embora existam cerca de 25 variedades de figueira, a única cultivada comercialmente é a Roxo de Valinhos, caracterizando-se por rusticidade, vigor, produtividade e adaptação à poda drástica. Segundo Penteado (1999), em outros países, essa variedade apresenta outros sinônimos, tais como ‘San Piero’, ‘Brown Turkey’, ‘Negro d’Espagne’, ‘Portugal’ e ‘Nero’, entre outros.

Segundo Rigitano (1964), podem ser descritos quatro tipos pomológicos gerais de *Ficus carica* de acordo com as características florais e os hábitos de frutificação: Caprifigo, Smyrna, São Pedro e Comum, ao qual pertence a ‘Roxo de Valinhos’.

2.2 Micropropagação da figueira

A propagação da figueira pode ocorrer por via sexuada e assexuada, embora a propagação sexuada seja utilizada exclusivamente em trabalhos de melhoramento genético. Para que ocorra a polinização natural da figueira é necessária a presença do caprifigo, progenitor masculino, e da vespa da espécie *Blastophaga psenes*; porém, como esse inseto não é encontrado no Brasil, a polinização natural não ocorre (Medeiros, 1987). Dessa forma, a figueira é propagada comercialmente por via assexuada através da estaquia, mergulhia, alporquia, rebentões ou filhotes (Silva, 1983). As mudas obtidas a partir da mergulhia e os rebentões, apesar de apresentarem precocidade de produção pelo fato de já se encontrarem enraizados, podem ser portadores de nematóides (Simão, 1998). Campos (1997) afirma que a utilização de mudas de figo isentas de nematóides constitui uma das medidas importantes para evitar a infestação

por esse patógeno, um dos mais importantes da cultura. Ainda não há porta-enxertos resistentes a *Meloidogyne* e *Heterodera fici* para uso no Brasil.

A estaquia é o processo de propagação comumente utilizado no Brasil, embora o vírus do Mosaico, se presente, seja transmitido para as novas mudas. A maioria dos plantios existentes em São Paulo apresenta esse vírus e as perdas causadas são difíceis de serem avaliadas pela inexistência de lotes sadios para comparação. O vírus é transmitido pelo ácaro *Eriophyes fici*, sendo necessário um único ácaro infestado se alimentar da planta para haver a sua transmissão. (Ribeiro, 1999).

Avanços no plantio de pomares implicam na necessidade de produção de mudas de alta qualidade e baixo custo, o que requer o uso de métodos intensivos de propagação (Corrêa, 1990; Yui, 1990), sendo a propagação vegetativa essencial para a manutenção dos caracteres agronômicos desejáveis do genótipo.

A técnica de cultura de tecidos vegetais tem sido de grande utilidade na resolução de diversos problemas de várias culturas. É uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e micropropagação de plantas em larga escala e para a obtenção de plantas livres de vírus através da cultura de meristemas.

Segundo Kerbauy (1997), algumas das vantagens da técnica da multiplicação clonal *in vitro* são: produção de plantas mais uniformes em curto período de tempo, controle efetivo de doenças, facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e espaço físico reduzido para o cultivo.

A micropropagação pode ser útil tanto na produção de plantas matrizes quanto na produção direta de porta-enxertos e de mudas das cultivares-copa sem enxertia.

As espécies frutíferas lenhosas que têm sido micropropagadas através de meristemas e segmentos nodais fazem parte, em sua maioria, da família Moráceas, entre elas a figueira e amoreira. Muitas espécies lenhosas ornamentais

pertencentes a esta família têm sido micropropagadas satisfatoriamente da mesma maneira, como, por exemplo, *Ficus religiosa* (Jaiswal e Narayan, 1983), *F. lyrata* (Debergh e De Wael, 1977), *F. elástica* e *F. benjamina* (Makino et al., 1977).

Devido à grande variabilidade genética e à maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro*, a micropropagação de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências do explante (Coelho, 1999; Decchetti, 2000). Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). Embora o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) tenha favorecido o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, a utilização de composições mais diluídas, como o meio WPM (Lloyd e McCown, 1980), para algumas espécies lenhosas tem fornecido melhores resultados (Grattapaglia e Machado, 1998; Brum, 2001).

Dois estratégias têm sido utilizadas para a micropropagação em plantas lenhosas: a regeneração de calos e a multiplicação de brotos (Einset, 1986). Porém, a regeneração de calos resulta em alta porcentagem de variação somaclonal, tornando esta estratégia questionável para a multiplicação clonal em larga escala. A multiplicação de brotos, por outro lado, é um método adequado que pode ser utilizado na propagação clonal de diversas espécies.

Sucesso na regeneração de plantas *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares e explantes nodais tem sido descrito para várias espécies da família Moraceae (Mhatre, Bapat e Rao, 1985; Bapat, Mhatre e Rao, 1987; Hossain et al., 1992; Pattnaik, Sahoo e Chand, 1996).

Trabalhos *in vitro* com diversas variedades de *Ficus carica* têm sido restritos à produção de plantas livres de vírus através de cultura meristemas (Murithi, Ragan e Waite, 1982; Pontikis e Melas, 1986; Haelterman e Docampo,

1994; Nobre et al., 1998; Demiralay et al., 1998; Gunver et al., 1998; Kumar, Radha e Chitta, 1998). No Brasil, poucas são as pesquisas realizadas com o cultivo *in vitro* da figueira ‘Roxo de Valinhos’, embora os resultados observados por Guerra e Costa (1988), Barbosa et al. (1992), Anjos Sobrinho, Pasqual e Paiva (1998) e Brum (2001) confirmem a possibilidade da propagação *in vitro* da figueira. Entretanto, há a necessidade de otimização do protocolo de propagação e posterior aclimatização das mudas.

2.2.1 Reguladores de crescimento

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, os quais são sintetizados em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas, sendo distribuídos em diferentes órgãos, nos quais exercem suas funções inibindo ou estimulando processos fisiológicos e/ou bioquímicos vitais. Esses fitormônios podem ser sintetizados em laboratório e são denominados de substâncias reguladoras de crescimento ou fitoreguladores (Taiz e Zeiger, 1991a).

Segundo Skoog e Miller (1957), um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* e, conseqüentemente, são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos.

As auxinas promovem o crescimento do caule, folhas e raízes, além de serem responsáveis pela dominância apical (Taiz e Zeiger, 1991a). Porém, na fase de multiplicação, para muitas espécies não há a necessidade da adição de auxina no meio de cultura (Quoirin e Lepoivre, 1977), que pode ser prejudicial devido, provavelmente, a um desbalanço da relação endógena de auxinas e citocininas dos explantes, reduzindo ou inibindo o número de brotações ou

favorecendo demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo em detrimento da multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1998). Novak e Juvova (1983) e Peixoto (1990) verificaram efeitos prejudiciais da adição de ANA (ácido naftalenoacético) na regeneração e multiplicação de segmentos nodais de videira. Da mesma forma, Brum (2001) concluiu que não há necessidade da adição de ANA na fase de multiplicação de *Ficus carica* 'Roxo de Valinhos'.

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 e retardam a senescência das plantas (Taiz e Zeiger, 1991b).

O tipo de citocinina e a sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para o ajustamento dos meios de cultura (Grattapaglia e Machado, 1998).

O BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu e Wang, 1983) e é a citocinina mais utilizada, seguida pela cinetina e 2iP (isopenteniladenina).

Um procedimento viável para indução múltipla de brotos e regeneração de plântulas foi desenvolvido com gemas apicais coletadas de árvores adultas de *Ficus carica* 'Gular', utilizando meio MS suplementado com BAP 2 mg.L⁻¹ e ANA 0,2 mg.L⁻¹ (Kumar, Radha e Chitta, 1998). Resultado semelhante foi verificado por Brum (2001) com a variedade Roxo de Valinhos, porém, com a associação de concentrações superiores a 2 mg.L⁻¹ de BAP e baixas concentrações de ANA observou menor incremento no número total de brotos. Nobre et al. (1998) observaram bons resultados quanto à taxa de multiplicação

da figueira 'Berbera' e 'Lampa' (5,3 brotos por explante) utilizando $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Embora o BAP seja mais utilizado, isto não significa que é ideal para todas as espécies ou para diferentes variedades dentro de uma mesma espécie. Jordan e Iturriaga (1980) verificaram que a utilização da cinetina como único regulador de crescimento no meio de cultura diminuiu a formação de calos em *Ficus carica*. Pereira et al. (2000) utilizando $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina verificaram aumento na produção de brotos de *Salix humboldtiana*. A utilização de $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina estimulou a formação de brotos e o número de folhas por explante de *Emblica officinalis* (Mishra et al., 1999).

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, Werker e Shalev, 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, Assis e Caldas (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, Zimmerman e Fordham, 1986). O carvão ativado tem sido útil nessa fase devido a sua capacidade de reter concentrações excessivas de fitoreguladores e compostos tóxicos que inibem a

morfogênese (Fridborg et al., 1978; Pan e Staden, 1998). Após o transplântio das plântulas para a casa-de-vegetação, observam-se ainda outros efeitos residuais atribuídos às citocininas, como, por exemplo, menor capacidade de sobrevivência decorrente da vitrificação, da quebra de dominância apical, da manutenção de um hábito arbustivo, além da miniaturização e quando transferidas para o campo apresentam deformação de frutos (Grattapaglia e Machado, 1998).

As giberelinas têm como um dos principais efeitos em cultura de tecidos o alongamento das brotações durante a multiplicação ou antes do enraizamento. Segundo Kochba et al. (1974), a presença de ácido giberélico (GA_3) no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. Todavia, quando aplicado em concentrações relativamente elevadas, o ácido giberélico impede a formação de raiz, especialmente se as auxinas forem aplicadas simultaneamente. De acordo com George (1996), o efeito do GA_3 na proliferação de brotações varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo também da espécie que está sendo micropropagada.

Figueiredo, Albarello e Viana (2001) relatam a necessidade do GA_3 para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa*. Gomes (1999) observou que a utilização de GA_3 em concentrações que variam de 1 a 6 $mg.L^{-1}$ favorece o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de brotações de moreira, porém, a utilização de 4 e 6 $mg.L^{-1}$ do regulador promoveu a formação de calos na base do explante.

Yui et al. (1993) verificaram que a adição de giberelina ao meio MS, em concentrações que variam entre 0,1 e 1 $mg.L^{-1}$, não apresenta efeitos significativos sobre a proliferação de brotações em porta-enxertos e cultivares de macieira. No entanto, de acordo com esses autores, quando o objetivo é a formação de brotos de macieira alongados, apropriados para a fase de

enraizamento, é indicada a adição de giberelina em concentrações superiores a 0,1 mg.L⁻¹. De Fossard et al. (1978) constataram efeito deletério desse fitoregulador no cultivo de *Eucalyptus ficifolia*, provocando alongamento excessivo, deformações foliares e formação de calo na base das brotações laterais.

Em algumas espécies pode haver estiolamento das brotações de acordo com a concentração de giberelina utilizada. Contudo, desordens fisiológicas como necrose apical e abscisão foliar, frequentemente observadas em condições normais de microcultivo (Munhoz et al., 1999), têm sido associadas à deficiência de cálcio (Sha, McCown e Peterson, 1985) e ao acúmulo de gases como o etileno (Lemos e Blake, 1996). Segundo Biasi, Koller e Kämpf (1994), na micropropagação do abacateiro, a adição de GA₃ ao meio de cultura aumenta a porcentagem de brotações anormais, com folhas alongadas, retorcidas, cloróticas, quebradiças e de fácil abscisão. Mishra et al. (1999) descreveram o alongamento dos internódios de *Emblica officinalis* quando utilizaram 1 mg.L⁻¹ de GA₃, enquanto 3 mg.L⁻¹ causou desfolhamento de alguns explantes. Resultados semelhantes foram descritos por Decchetti (2000) em brotações de *Annona glabra*.

2.2.2 Carvão ativado

Entre os efeitos proporcionados, principalmente à organogênese e à embriogênese, pela adição do carvão ativado ao meio de cultura, estão: promoção de ambiente escuro, favorecendo o enraizamento; adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo próprio meio ou explante; adsorção de reguladores de crescimento e outros compostos orgânicos e liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que beneficiam o crescimento *in vitro* das culturas. Alteração do pH do meio de cultura para um nível ótimo,

favorecendo a morfogênese, tem sido relatada como outro efeito do carvão ativado (Pan e Staden, 1998).

A estrutura do carvão ativado foi melhor estudada através de Raio-X, mostrando sua natureza amorfa e estrutura microcristalina. Os microporos possuem $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ de superfície de área, 75,7% de porosidade e $1,4 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ de volume de poro (Qadeer et al., 1994). A utilização de técnicas especiais de fabricação resulta em carvões altamente porosos e sua enorme área de superfície proporciona incontáveis locais de ligação por onde se prendem as substâncias, conferindo o alto poder de adsorção (Roy, 1995).

O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,2 a 3% (Beyl, 2000; Guerra e Handro, 1988; Fridborg et al., 1978; Anagnostakis, 1974), porém sua presença pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e tecido utilizado (Pan e Staden, 1998).

Vários são os trabalhos que citam a utilização de carvão ativado na micropropagação de espécies frutíferas tais como ameixeira, framboeseira, morangueiro, macieira, videira, abacaxizeiro e bananeira (Roy, 1995).

A oxidação é um problema comumente observado no cultivo de plantas lenhosas e foi definido por Gould e Murashige (1985) como sendo a mudança de coloração de compostos fenólicos liberados pelo explante no meio de cultura. Preece e Compton (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura no cultivo de algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo taninos, flavonóides e fenóis. O efeito inibitório no desenvolvimento é atribuído à presença de taninos e fenóis, sendo a autotoxicidade dos exudatos variável com as cultivares, espécies e gêneros (Compton e Preece, 1988; Preece e Compton, 1991). Nem todos os compostos produzidos pelo processo de oxidação são tóxicos, mas a maioria inibe o desenvolvimento dos explantes,

podendo causar danos severos, principalmente no estágio inicial de desenvolvimento da cultura, levando até à morte (George e Sherrington, 1984).

Além do carvão ativado, a cisteína, PVP (polivinilpirrolidona), ácido ascórbico e ácido cítrico têm sido adicionados ao meio de cultura com o objetivo de controlar o processo de oxidação (Paiva, 1998). Bon, Gendraud e Franclet (1988), estudando a micropropagação de sequóia, observaram que a adição de carvão ativado não foi eficiente para controlar a oxidação, mas estabilizou o processo, evitando que houvesse acúmulo de fenóis.

O efeito não-seletivo do carvão ativado pode proporcionar resultados negativos na micropropagação. Pesquisas relatam a absorção de tiamina, ácido nicotínico (Weatherhead, Burdon e Henshaw, 1978), piridoxina, ácido fólico (Johansson, Calleberg e Gedin, 1990), reguladores de crescimento e quelatos de ferro (Herberle-Bors, 1980 e Johansson, Calleberg e Gedin, 1990).

O efeito positivo da adição de carvão ativado em meio de cultura na fase de enraizamento foi descrito por vários autores (Thakur, Sharma e Kanwar, 2001; Figueiredo, Albarello e Viana, 2001; Te-chato e Lim, 2000), embora Boggetti, Jasik e Mantell (2001) não tenham verificado efeito do carvão no enraizamento de *Anacardium occidentale*. Damiano (1978), Anderson (1980), Amin e Jaiswal (1987) relataram o efeito favorável do carvão, quando utilizado em baixas concentrações, no enraizamento de brotações de morangueiro, framboeseira e goiabeira, respectivamente. Porém, Rosati, Marino e Swierczewski (1980) relataram que a adição de carvão promoveu efeito negativo na porcentagem de brotos enraizados, clorose e abscisão de folhas de *Prunus salicina*.

Resultados divergentes referentes à parte aérea também foram observados em brotações micropropagadas de diferentes espécies. Arena e Pastur (2001) citam que a adição de carvão ativado ao meio de cultura promoveu alongamento das brotações de *Berberis buxifolia*, mas reduziu o índice de

multiplicação. Resultados semelhantes foram observados por Ahuja (1985), além de constatar o aumento no tamanho das folhas de *Eucalyptus citriodora*, e por Webb, Flinn e Georgis (1988), porém com inibição da risogênese de *Pinus strobus*. Kowalski e Staden (2001) citam que a utilização de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura WPM proporcionou melhor crescimento das brotações de *Podocarpus henkelii*, mas causou hiperidricidade em *Podocarpus elongatus*. Segundo Kadota, Imizu e Irano (2001), a adição de carvão ativado reduziu a proliferação de brotações e a biomassa de pereira, além de algumas brotações apresentarem hiperidricidade. Youmbi e Benbadis (2001) concluíram que o desenvolvimento de *Dacryodes edulis* é acelerado quando o meio de multiplicação é enriquecido com 2g.L⁻¹ de carvão ativado.

Hazra et al. (2002) relataram o efeito sinérgico do carvão ativado na multiplicação e enraizamento de brotações de algodoeiro. Mohamed-Yasseen (2001) verificou, em plântulas de milho, aumento no comprimento das brotações e raízes quando o carvão ativado foi adicionado ao meio.

No cultivo *in vitro* de *Ficus carica*, com a adição de 3 mg.L⁻¹ de carvão houve melhoria na coloração das folhas, qualidade e quantidade de raízes formadas (Barbosa et al. 1992).

A diversidade de resultados obtidos com a utilização de carvão ativado se deve, principalmente, ao genótipo da espécie em questão, à adsorção de algumas substâncias químicas e compostos orgânicos, além de metabólitos tóxicos liberados no cultivo *in vitro* (Wang e Huang, 1976), e possivelmente à sua interferência na ação das auxinas e citocininas (Constantin, Henke e Mansur, 1977).

2.2.3 Aclimatização de mudas micropropagadas

Aclimatização é o processo pelo qual as plântulas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente em condições climáticas naturais ou de transição, como a casa-de-vegetação. Esta fase deve ocorrer progressivamente de forma que as plântulas sofram pouco estresse, evitando injúrias ou até mesmo a morte (Brainerd e Fuchigami, 1981). Há diversos fatores envolvidos na aclimatização de mudas micropropagadas e é a interação e o manejo adequado dos mesmos que irão condicionar o sucesso deste estágio (Hoffmann, 1999).

Segundo Read e Fellman (1985), um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos na propagação de plantas é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas da condição *in vitro* para a casa-de-vegetação e para o campo, devido à grande diferença entre as condições ambientais.

Pierik (1988) cita que o baixo rendimento alcançado na fase da aclimatização torna inviável a micropropagação de algumas espécies. Obtém-se grande número de plântulas em sala de crescimento, entretanto há perdas significativas quando estas são transferidas para outro ambiente. Dessa forma, poucas estarão em condições de serem levadas ao campo. Em virtude disso, cada planta apta para o plantio apresentará alto custo, que inevitavelmente será repassado para o consumidor final.

O sucesso dessa etapa depende da qualidade das plantas provenientes da fase anterior. Com relação à parte aérea, plantas que apresentam alguma toxidez causada por citocinina, auxina ou deficiência nutricional tendem a apresentar senescência foliar, comprometendo a sobrevivência (Grattapaglia e Machado, 1998).

No transplantio, o estresse hídrico das plântulas é, geralmente, o maior problema. Embora as plântulas sejam aparentemente perfeitas, apresentam uma

série de deficiências anatômicas, induzidas pela condição *in vitro*, que dificultam o controle da transpiração e ocasionam rápida perda de água. Entre essas deficiências estão: pobre formação de cera epicuticular (Sutter e Langhans, 1979; Fuchigami, Cheng e Soeldner, 1981; Sutter, 1988), deficiência no mecanismo de fechamento estomático (Brainerd e Fuchigami, 1981; Sutter, 1988; Shackel, Novello e Sutter, 1990), aumento na densidade estomática (Brainerd e Fuchigami, 1981; Lee, Wetzstein e Sommer, 1988), localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha (Lee, Wetzstein e Sommer, 1988; Capellades et al., 1990), presença de hidatódios (Donnelly e Skelton, 1987; Donnelly, Skelton e Nelles, 1987; Capellades et al., 1990), reduzida diferenciação do mesofilo das folhas e alta proporção de espaços intercelulares (Donnelly e Vidaver, 1984a; Lee, Wetzstein e Sommer, 1988; Capellades et al., 1990; Dimassi-Theriou e Bosabalidis, 1997) e deficiente conexão entre o sistema vascular do caule e raízes (Grout e Aston, 1977).

Segundo Serret (1996), os explantes apresentam estrutura e fisiologia modificadas devido a algumas condições peculiares 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*.

A alta umidade relativa do ar no interior dos recipientes e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das mudas em controlar as perdas de água (Preece e Sutter, 1991 e Sutter, 1988). A redução da umidade relativa aumenta a capacidade de resposta dos estômatos, a deposição de ceras epicuticulares e reduz o murchamento após a transferência para o solo (Sciutti e Morini, 1995).

Preece e Sutter (1991) citam que as técnicas de aclimatização podem ser iniciadas ainda durante o cultivo *in vitro*. A exposição das plântulas à umidade

relativa de 35% proporciona a formação de folhas com cera morfológicamente semelhante àquelas formadas em casa-de-vegetação (Sutter e Langhans, 1982). Outro método utilizado é destampar os recipientes por alguns dias antes de remover as plântulas. Quando os recipientes que continham plântulas de craveiro foram abertos e a umidade relativa mantida a 50-70%, houve aumento no desenvolvimento de cera epicuticular. Após nove dias de abertura dos recipientes, a taxa de sobrevivência aumentou de 75 para 90% (Ziv, 1986). Da mesma forma, vários autores sugerem esta técnica como viável na aclimatização de plântulas (Ripley e Preece, 1986; Miller, 1983; Pocock, 1983). Entretanto, Hoffmann (1999) constatou que a abertura antecipada dos frascos ou o selamento dos frascos com algodão desfavorecem a sobrevivência e o crescimento das mudas de macieira durante a aclimatização.

O enraizamento *in vitro* das plântulas é outro fator que pode favorecer a aclimatização, embora alguns autores citem que o sistema radicular formado *in vitro* é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares, o que dificulta a absorção de água e nutrientes durante a aclimatização, reduzindo a taxa de sobrevivência das mudas (Leite, 1995; Zimmerman, 1981; Grout e Aston, 1977). Porém, alguns autores comprovaram a eficiência do sistema radicular formado *in vitro* e o aumento da sobrevivência após transferência para condições *ex vitro* (Hicks, 1987; Sutter e Luza, 1993; Díaz-Pérez, Shackel e Sutter, 1995).

A manutenção inicial das plântulas após a transferência sob alta umidade relativa e posterior redução gradativa tem sido essencial para minimizar as perdas das plântulas (Deccetti, 2000). Para evitar o estresse causado pela luz, é importante o controle da intensidade luminosa através do sombreamento parcial, reduzindo em 50-90% a luminosidade, proporcionando ambiente semelhante ou pouco superior ao encontrado na sala de crescimento (George, 1996). Deccetti (2000) verificou 100% de sobrevivência das mudas de *Annona glabra* e Santos

(2001), de 80 a 90% em mudas de cafeeiro, controlando a umidade relativa nas primeiras semanas e reduzindo gradativamente a intensidade luminosa com a utilização de sombrite®.

Outro fator de elevada importância na aclimatização de mudas é o substrato, que como meio de enraizamento e crescimento inicial das mudas jovens, pode facilitar ou impedir o crescimento das plantas, conforme suas propriedades (Calvete, Kämpf e Daudt, 2000). Isto tem maior relevância quando se cultiva em recipientes cujo espaço disponível para o sistema radicular é limitado. Substratos hortícolas para a produção de mudas estão substituindo o uso de solo mineral, propiciando significativos aumentos na produção (Bellé e Kämpf, 1993).

O substrato exerce influência significativa na arquitetura do sistema radicular, no estado nutricional das plantas (Spurr e Barnes, 1973), assim como na translocação de água no sistema solo-planta-atmosfera (Orlander e Due, 1986). Deve então apresentar elevado espaço de aeração, elevada capacidade de retenção de água, alta capacidade de troca de cátions e baixo teor total de sais solúveis, entre outras características (Bellé e Kämpf, 1993).

Ao selecionar materiais para uso como substrato, deve-se ter em mente o objetivo que se busca, o tipo de planta a cultivar e a fase do seu desenvolvimento, o que está diretamente relacionado com o tamanho e o tipo de recipiente a ser utilizado. O recipiente determina limitações para o crescimento das raízes e o substrato precisa ser adequado para essas condições (Kämpf, 2000).

O substrato substitui o solo na produção vegetal em parte do ciclo da planta ou durante todo o ciclo, dependendo da finalidade. Possui a vantagem de poder ser transportado com maior facilidade, formulado com matérias-primas diversas e ser manuseado e melhorado de acordo com a finalidade. Na maior parte dos substratos comerciais, o adubo encontra-se em quantidade para dar o

suporte inicial ao crescimento das plantas. Pressupõe-se que o crescimento deva ser controlado pelo produtor, através de adubação criteriosa e balanceada, manipulando o crescimento das mudas (Minami, 2000).

Calvete, Kämpf e Daudt (2000) identificaram como melhores substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de morangueiro as misturas contendo casca de arroz carbonizada e turfa preta, que proporcionaram maior crescimento da parte aérea e raiz. Segundo Rodrigues e Fior (2000), os resultados mostraram que plântulas micropropagadas de *Persea venosa* apresentaram índice de sobrevivência significativamente maior quando aclimatizadas em substratos contendo maiores proporções de casca de arroz carbonizada esterilizada. Para a aclimatização de mudas micropropagadas de porta-enxerto de macieira, Hoffmann (1999) identificou como melhor substrato o Plantmax[®], seguido da mistura de solo + areia. Normah, Nor-Azza e Aliudin (1995) avaliaram o efeito de substratos na micropropagação de mangostanzeiro, verificando maior altura das mudas com areia + solo e areia + solo + material orgânico.

Existem poucos trabalhos que relatam o estudo do substrato na fase de transferência da planta desenvolvida *in vitro* para as condições *ex vitro*, sendo necessárias mais pesquisas nessa área.

2.3 Anatomia das plantas micropropagadas

Devido às características fisiológicas e anatômicas das plantas micropropagadas, torna-se necessária uma gradual aclimatização a fim de que as plântulas sobrevivam quando transferidas para diferente condição ambiental. As técnicas de aclimatização podem ser iniciadas ainda no cultivo *in vitro* e também durante a aclimatização em casa-de-vegetação. A redução da umidade relativa do ar, aumento da intensidade luminosa e crescimento autotrófico em ambiente

asséptico são relatados como as principais diferenças entre os ambientes de cultivo *in vitro* e *ex vitro* (Preece e Sutter, 1991).

Estudos histológicos demonstram que os órgãos vegetativos de plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam tecidos e estruturas pouco diferenciados se comparados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação (Brainerd e Fuchigami, 1981; Donnelly e Vidaver, 1984a; Fabbri, Sutter e Duston, 1986; Fidelis 1998; Santos, 2001).

Brainerd e Fuchigami (1981) verificaram apenas uma camada de células paliçádicas nas folhas de brotações de ameixeira micropropagada, ao invés de duas ou três comumente encontradas, e maiores espaços intercelulares no mesofilo quando comparadas com folhas de plantas desenvolvidas em casa-de-vegetação ou campo. Houve redução desses espaços quando as plântulas foram transferidas para a casa-de-vegetação. Entre outras espécies em que somente uma camada de células paliçádicas foi formada *in vitro* estão framboeseira (Donnelly e Vidaver, 1984a), morangueiro (Fabbri, Sutter e Duston, 1986) e cafeeiro (Santos, 2001), apresentando-se mais curtas e não alongadas conforme característica das células paliçádicas de plantas crescidas em casa-de-vegetação ou campo.

Tricomas filiformes foram encontrados na superfície abaxial das folhas de framboeseira cultivadas *in vitro*, porém em pequena quantidade se comparados aos daquelas cultivadas *in vivo* (Donnelly e Vidaver, 1984a). Fidelis (1998), comparando o cultivo *in vitro* e *in vivo* de *Brosimum guadichaudii*, identificou maior quantidade de tricomas simples e secretores na face adaxial das folhas de brotações micropropagadas.

Segundo observações de Fabbri, Sutter e Dunston (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 várias camadas paliçádicas e, com o aumento do tempo, as folhas jovens tornaram-se similares àquelas crescidas no campo.

Características foliares semelhantes foram observadas em diversas espécies durante a aclimatização, sendo que as folhas formadas ainda *in vitro* apresentaram características intermediárias com relação àquelas que cresceram em casa-de-vegetação ou campo. Somente as folhas que se formaram completamente após a remoção do cultivo *in vitro* assemelharam-se às folhas desenvolvidas em casa-de-vegetação (Grout e Aston, 1978; Wetzstein e Sommer, 1982; Donnelly, Vidaver e Lee, 1985).

Donnelly, Vidaver e Lee (1985) citam que caules de plântulas de framboeseira apresentavam menor diâmetro e tinham consideravelmente menor quantidade de colênquima e esclerênquima do que plantas crescidas no campo. Fidelis (1998) observou a numerosa presença de tricomas simples e secretores na epiderme do caule de plantas micropropagadas de mama-cadela, porém *in vivo* não foram observadas essas estruturas. A região cortical *in vitro* apresentou células parenquimáticas irregulares e sem agrupamento de esclerênquima e no caule *in vivo* foi observado maior número de camadas de tecido colenquimatoso.

Harbage, Stimart e Evert (1993) observaram que a iniciação radicular em macieira ocorre 24 horas após o tratamento de indução e torna-se completa após quatro dias, apresentando apenas floema parenquimatoso. As raízes de framboeseira *in vitro* mostraram-se mais finas, cobertas com pêlos radiculares e muito menos periderme do que as raízes desenvolvidas no campo (Donnelly, Vidaver e Lee, 1985). Fidelis (1998) constatou a existência de raízes adventícias *in vitro* com pouco parênquima cortical. A conexão entre raiz e parte aérea muitas vezes é incompleta e resulta em inadequada transferência de água entre os órgãos, tal como acontece em plântulas de couve-flor (Grout e Aston, 1977). Todavia, o xilema apresenta-se contínuo e funcional entre raiz e parte aérea de

brotações *in vitro* de *Prunus cerasus* (Marín, Gella e Herrero, 1988). Resultados semelhantes foram descritos por Hicks (1987); Sutter e Luza (1993); Díaz-Pérez, Shackel e Sutter (1995), indicando que as raízes de macieira são funcionais na absorção e transporte de água.

Plantas lenhosas micropropagadas são, freqüentemente, afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. Desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* têm sido descritas principalmente como vitrificação ou hiperidratação (Ziv, 1991), a qual, em plantas lenhosas, é causada por alta concentração de íons no meio de cultura (Gaspar et al., 1985). A desorganização no desenvolvimento de meristemas e folhas causada pela vitrificação resulta em plantas frágeis, translúcidas e hiperidratadas. As modificações manifestadas principalmente nas folhas afetam a fotossíntese e as trocas gasosas, sendo as desordens anatômicas menos extensas no caule e raízes. Estas modificações impedem o estabelecimento *ex vitro* de plantas micropropagadas (Debergh e Maene, 1984). O mesofilo apresenta-se não organizado e consiste de parênquima esponjoso, rico em espaços intercelulares (Fidelis, 1998). Em macieira, o parênquima esponjoso estava hiperdesenvolvido, com volume superior a cinco vezes quando comparado a folhas normais (Paques e Boxus, 1987). Em craveiro, o aumento dos espaços intercelulares foi devido à água extra protoplasmática (Kevers, Prat e Gaspar, 1987).

Em ameixeira, craveiro e framboeseira, o conteúdo de clorofila foi menor nas folhas vitrificadas em relação às folhas normais (Phan e Letouzé, 1983; Ziv, Meir e Halevy, 1983; Donnelly e Vidaver, 1984 a,b).

Em *Liquidambar styraciflua*, as folhas *in vitro* apresentaram menor conteúdo citoplasmático e muitos dos cloroplastos não apresentavam organização normal do grana dentro do estroma quando comparados com folhas desenvolvidas no campo. Quando o nível de luz foi elevado de 50 para 155 ou

$315\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, os cloroplastos desenvolveram um grana bem organizado (Wetzstein e Sommer, 1982; Lee, Wetzstein e Sommer, 1985). Dimassi-Theriou e Bosabalidis (1997) demonstraram que o aumento da intensidade luminosa *in vitro* resulta no aumento do tamanho das células do mesofilo e diminuição do número de cloroplastos em *Actinidia deliciosa*.

Além das alterações anatômicas nos tecidos das plantas micropropagadas, o número e formato dos estômatos também são afetados. Os estômatos são estruturas fundamentais para as plantas porque através deles ocorrem os processos de troca gasosa. Portanto, qualquer variação em número e/ou tamanho dos estômatos pode acarretar uma maior ou menor eficiência da planta quanto à taxa fotossintética (Sun et al., 1995).

Estudos indicam que a estrutura dos estômatos de plantas micropropagadas apresenta grande diferença em relação às plantas que cresceram em casa-de-vegetação ou campo (Preece e Sutter, 1991). Em algumas espécies, como framboeseira, macieira e roseira, os estômatos adquirem formato arredondado e são maiores se comparados ao formato elíptico normalmente observado nas plantas cultivadas *in vivo* (Donnelly e Vidaver, 1984a; Blanke e Belcher, 1989 e Capellades et al., 1990). Em outras espécies, como craveiro, os estômatos das plantas *in vitro* se assemelham aos das plantas em casa-de-vegetação (Sutter e Langhans, 1979). O número de estômatos por mm^2 foi maior em macieira (Blanke e Belcher, 1989) e roseira (Capellades et al., 1990), porém menor em ameixeira (Brainerd et al., 1981) se comparado às plantas em casa-de-vegetação.

A avaliação das diferenças morfológicas e anatômicas que ocorrem na formação das plantas micropropagadas e durante a aclimatização é um pré-requisito para a compreensão deste processo de adaptação e é necessária para a elaboração de um eficiente protocolo de micropropagação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi constituído de três experimentos relativos à fase de multiplicação de brotações, um relativo à aclimatização e outro relacionado ao estudo anatômico de *Ficus carica* 'Roxo de Valinhos'. Para sua realização, foram utilizados o laboratório de cultura de tecidos e a casa-de-vegetação do Departamento de Agricultura e o laboratório de anatomia vegetal do Departamento de Biologia da UFLA, em Lavras, MG.

3.1 Fase de multiplicação

No preparo dos meios foram utilizadas soluções estoque armazenadas em frascos de vidro escuro, a temperaturas próximas de 5°C. O pH do meio foi ajustado para 5,8, com NaOH 0,5 e 0,1 N ou HCl 0,1 N, antes da adição de 6 g.L⁻¹ de ágar. Os meios foram vertidos em tubos de ensaio com dimensões de 150 x 25 mm ou em frascos de vidro com capacidade para 250 cm³, vedados com tampas plásticas translúcidas e autoclavados à pressão de 1,5 atm e à temperatura de 120°C durante 20 minutos.

Para a instalação dos experimentos, foram utilizados segmentos nodais, com 1 a 2 cm e 2 gemas, de plântulas já estabelecidas *in vitro*. O manuseio do material vegetal ocorreu em câmara de fluxo laminar desinfestada com álcool (etanol) a 70%. Os instrumentos (pinças e bisturis) foram autoclavados e periodicamente flambados, durante o seu uso, com etanol 96° GL. Após o manuseio, os tubos ou frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 35 $\mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 27 \pm 1°C e fotoperíodo de 16 horas.

3.1.1 BAP e carvão ativado na multiplicação *in vitro*.

Os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM com 100% dos sais, inositol, vitaminas e 20 g.L⁻¹ de sacarose. Os tratamentos consistiram da combinação de cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L⁻¹) e cinco concentrações de carvão ativado (0, 1, 2, 3 e 4 g.L⁻¹).

3.1.2 Cinetina e GA₃ na multiplicação *in vitro*.

Os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM com 100% dos sais, inositol, vitaminas e 20 g.L⁻¹ de sacarose. Os tratamentos consistiram da combinação de cinco concentrações de cinetina (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L⁻¹) e cinco concentrações de GA₃ (0, 2, 4, 6 e 8 mg.L⁻¹).

3.1.3 Cinetina e meio de cultura WPM na multiplicação *in vitro*.

Os tratamentos consistiram da combinação de cinco concentrações de cinetina (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg.L⁻¹) e quatro concentrações do meio WPM (50, 100, 150 e 200% dos sais, inositol e vitaminas), mantendo-se 20 g.L⁻¹ de sacarose.

Após 60 dias, os experimentos foram avaliados em função das seguintes variáveis: número de brotos (NB), comprimento dos brotos (CB), peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea, número de raízes (NR), peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular e peso da matéria fresca (PMFC) e seca (PMSC) de calos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 5x5, com cinco repetições e quatro plântulas por parcela, ou 5x4, como no experimento 3.1.3.

Os fatores foram analisados por meio de regressão polinomial ou pelo teste de médias Skott-Knott, com o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

3.2 Fase de aclimatização

A aclimatização das mudas foi realizada em casa-de-vegetação com sistema de nebulização intermitente. As plântulas foram transplantadas para bandejas plásticas com 25 células de 150 cm³ cada e mantidas em bancada de tela metálica. A bancada ficou protegida na parte superior, acima da tubulação de nebulização, e nas laterais com tela de sombreamento 50% (sombrite®), durante o primeiro mês.

3.2.1 Tempo de permanência em meio de cultura e diferentes substratos na aclimatização da figueira.

Segmentos nodais foram inoculados em meio WPM com 100% dos sais, inositol, vitaminas e 20 g.L⁻¹ de sacarose, acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, durante dois meses, objetivando a multiplicação. Após esse período, as plântulas foram individualizadas e repicadas para o meio WPM sem reguladores de crescimento, onde permaneceram por 15, 30, 45 e 60 dias, possibilitando maior crescimento e redução do efeito residual do BAP. As plântulas de 0 dias foram transferidas diretamente do meio de multiplicação para as bandejas em casa-de-vegetação. Antes da transferência das mudas, os tubos de ensaio permaneceram abertos por 5 dias, na sala de crescimento, a fim de favorecer a aclimatização. As plântulas de 0, 15, 30, 45 e 60 dias possuíam média de 1, 1,5, 2, 4,5 e 7 cm

de comprimento, respectivamente, sendo que as de 0 e 15 dias não possuíam raízes.

Os tratamentos consistiram da combinação de cinco substratos (Plantmax[®]; Plantmax[®] + Vermiculita; Plantmax[®] + Húmus; Húmus + Vermiculita; Plantmax[®] + Húmus + Vermiculita) e dias em meio de cultura sem regulador de crescimento (0, 15, 30, 45 e 60). Utilizou-se o Plantmax[®] para hortaliças e a Vermiculita de granulometria média.

Após 80 dias, o experimento foi avaliado em função de: porcentagem de sobrevivência, altura das mudas, peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea e peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 5x5, com quatro repetições e cinco plantas por parcela. Os fatores foram analisados por meio do teste de médias Skott-Knott, pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000).

3.3 Estudo anatômico foliar

O material foi fixado em álcool 70° GL. O estudo anatômico baseou-se no exame microscópico de seções obtidas à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear. Estas foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período que variou de três a cinco minutos, em seguida lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50% com coloração.

Para a avaliação dos tecidos foliares (espessura da epiderme adaxial e abaxial e dos parênquimas paliádico e esponjoso) foram realizados cortes transversais, os quais foram corados com azul de astra-safranina seguindo os

métodos descritos por Kraus e Arduin (1997). A partir das seções transversais foram efetuadas 4 medições de 5 plantas, com o auxílio de ocular micrométrica, em microscópio de campo claro Carl Zeiss-Amjlival.

Para as avaliações relativas à caracterização dos estômatos (número médio por mm² e diâmetro polar e equatorial) foram realizados cortes paradérmicos na região mediana das folhas, na epiderme da face abaxial, os quais foram colocados sobre uma lâmina contendo safranina e água glicerinada. As observações foram realizadas com auxílio de câmara clara, em microscópio Olympus CBB, segundo técnica de Labouriau et al. (1961). Na região mediana da lâmina foliar foram observados 3 campos, totalizando 30 campos por tratamento.

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 60, utilizando filme ASA 400 colorido, no laboratório de citologia do Departamento de Biologia da UFLA.

3.3.1 Aspectos da anatomia foliar de plântulas micropropagadas, aclimatizadas e plantas adultas.

Para o estudo anatômico das folhas foram utilizadas plântulas mantidas por 45 dias em sala de crescimento, plantas com 20, 40 e 60 dias de aclimatização e plantas adultas cultivadas no campo.

O delineamento experimental utilizado para análise dos dados foi inteiramente ao acaso e a análise estatística realizada pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000), por meio do teste de médias Skott-Knott.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BAP e carvão ativado na multiplicação *in vitro*.

4.1.1 Explantes multiplicados

Não houve formação de raízes nesses explantes. Houve multiplicação dos brotos apenas nos tratamentos em que não havia carvão ativado. Dessa forma, estudou-se apenas a influência do BAP no número e comprimento de brotos e peso da matéria fresca e seca de calos (Tabela 1).

TABELA 1. Análise de variância para as características número de brotos (NB), comprimento (CB), peso da matéria fresca (PMFB) e seca (PMSB) dos brotos e peso da matéria fresca (PMFC) e seca (PMSC) de calos. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios					
		NB	CB	PMFB	PMSB	PMFC	PMSC
BAP	3	4,1488**	2,6972**	0,0321**	0,00011**	0,6127**	0,0013**
Erro	16	0,4636	0,0305	0,00004	0,000004	0,0103	0,000009
CV (%)		17,33	9,94	9,53	8,20	8,17	4,86

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

Na Figura 1 é apresentado o aspecto visual da cultura em função dos diferentes tratamentos (Tabela 2).

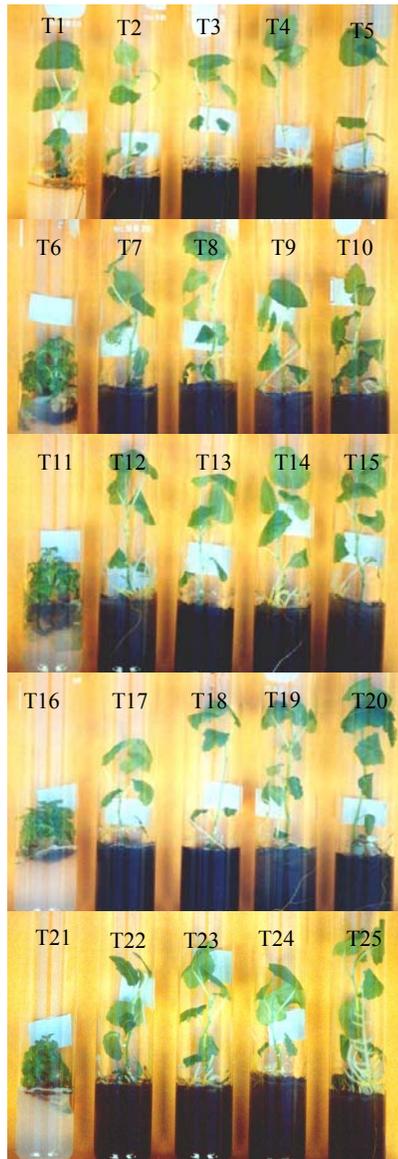


TABELA 2. Combinação entre concentrações de BAP e carvão ativado referentes ao experimento 3.1.1. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Tratamentos	BAP (mg.L ⁻¹)	Carvão Ativado (g.L ⁻¹)
1	0	0
2	0	1
3	0	2
4	0	3
5	0	4
6	0,5	0
7	0,5	1
8	0,5	2
9	0,5	3
10	0,5	4
11	1	0
12	1	1
13	1	2
14	1	3
15	1	4
16	2	0
17	2	1
18	2	2
19	2	3
20	2	4
21	4	0
22	4	1
23	4	2
24	4	3
25	4	4

FIGURA 1. Explantes de figueira em meio WPM adicionado de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG. 2002.

Número de brotos

A partir da análise de variância observa-se que o BAP foi significativo e possui efeito no número de brotos (Tabela 1). Maior número de brotos (5,05) foi verificado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, observando-se menores valores quando foram utilizadas concentrações mais altas do fitoregulador (Figura 2), devido, provavelmente, ao desbalanço hormonal, além das brotações apresentarem aspecto vitrificado. Esses resultados estão de acordo com os observados por Nobre et al. (1998) quanto à taxa de multiplicação da figueira ‘Berbera’ e ‘Lampa’ (5,3 brotos por explante) utilizando 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Kumar, Radha e Chitta (1998), utilizando meio MS suplementado com BAP 2 mg.L⁻¹ e ANA 0,2 mg.L⁻¹, verificaram indução múltipla de brotos em *Ficus carica* ‘Gular’. Brum (2001) cita que a associação de concentrações superiores a 2 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA induziu menor incremento no número total de brotos na variedade de figueira Roxo de Valinhos.

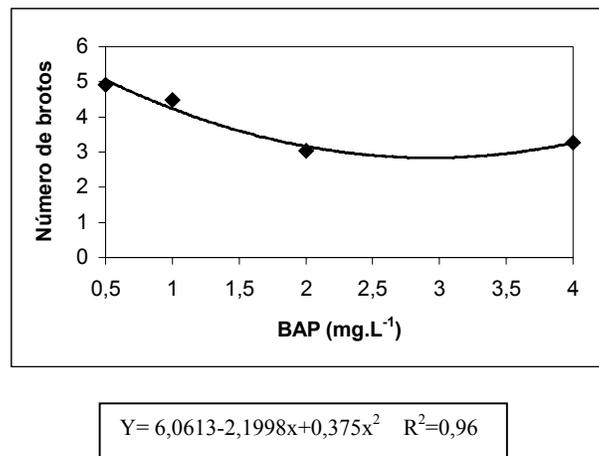


FIGURA 2. Número de brotos de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2002.

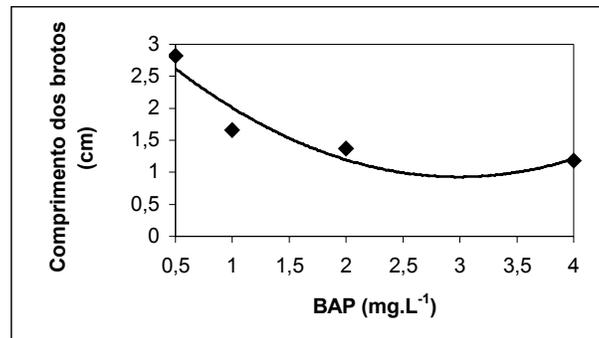
A inibição da proliferação das brotações observada no presente experimento, na presença do carvão ativado foi devida, provavelmente, à adsorção do regulador de crescimento, influenciando negativamente a divisão celular e o crescimento das gemas axilares, predominando a dominância apical. Entre os principais efeitos do carvão ativado está a adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo próprio meio ou explante, reguladores de crescimento e outros compostos orgânicos e a liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que beneficiam o crescimento *in vitro* das culturas (Pan e Staden, 1998).

Resultados semelhantes foram observados por Webb et al. (1988) na multiplicação de *Pinus strobus* e Ahuja (1985), além de verificarem aumento no tamanho das folhas de *Eucalyptus citriodora*. Kadota, Imizu e Irano (2001) verificaram, além dos mesmos resultados, que a adição de carvão ativado induziu a hiperidricidade das brotações de pereira. Arena e Pastur (2001) observaram maior índice de brotações utilizando baixas concentrações de BAP (0,13 a 0,25 mg.L⁻¹) e que a presença de carvão ativado proporcionou maior comprimento da parte aérea de *Berberis buxifolia*, porém reduziu a multiplicação. Ebert, Taylor e Blake (1993) relataram que a presença do carvão ativado reduziu a disponibilidade do BAP no meio de cultura.

Contudo, alguns autores constataram efeito favorável do carvão ativado na multiplicação de algumas espécies, entre elas o algodoeiro (Hazra et al., 2002) e *Dacryodes edulis* (Youmbi e Benbadis, 2001). Segundo Barbosa et al. (1992), no cultivo *in vitro* de *Ficus carica*, a adição de 3mg.L⁻¹ de carvão ativado proporcionou a melhoria na coloração das folhas. Tal diversidade de resultados está relacionada principalmente ao genótipo da espécie, meio de cultura e, possivelmente, à interferência na ação dos reguladores de crescimento.

Comprimento dos brotos

Verifica-se na Tabela 1 que o fator BAP foi significativo e o maior comprimento de brotos (2,62 cm) foi observado na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Com o aumento das concentrações até 2 mg.L⁻¹, houve queda acentuada no tamanho dos brotos, a partir da qual o comprimento tendeu à estabilização (Figura 3). É possível que tenha ocorrido um desbalanço hormonal em resposta à elevação das concentrações da citocinina. Além do reduzido tamanho, também se observou que com o aumento das concentrações as brotações se apresentavam vitrificadas e com folhas cloróticas. Pasqual (2001) cita que altas taxas de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais.



$$Y = 3,367 - 1,634x + 0,273x^2 \quad R^2 = 0,88$$

FIGURA 3. Comprimento dos brotos cultivados em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Pontikis e Melas (1986) observaram, após oito semanas de cultivo em meio de multiplicação contendo $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, brotações de *Ficus carica* ‘Kalamon’ com 2 a 4 cm de comprimento. Jona e Gribaudo (1987) relataram que a presença do BAP é essencial para a indução das gemas adventícias em *Ficus lyrata* e o alongamento é verificado em meio de cultura contendo $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 e 1/10 dos reguladores de crescimento utilizados na fase de multiplicação.

Embora o BAP apresente bons resultados para a maioria das espécies, não foi verificada essa resposta para a variedade de figueira ‘Roxo de Valinhos’. Provavelmente seja necessário utilizar outra citocinina com ação reduzida como, por exemplo, a cinetina, e que proporcione brotações maiores e bem formadas. Quando as brotações formadas são muito pequenas, é necessário maior tempo de permanência no meio de cultura sem citocinina para que ocorra o desenvolvimento adequado da parte aérea e do sistema radicular. A redução no tempo gasto no laboratório otimiza a produção e reduz os gastos.

Peso da matéria fresca e seca da parte aérea dos brotos

A partir da análise de variância (Tabela 1), observa-se que o fator BAP foi significativo e verifica-se $0,5 \text{ g}$ de matéria fresca e $0,031 \text{ g}$ de matéria seca dos brotos (Figura 4A e B) utilizando $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Com o aumento das concentrações de BAP, observa-se decréscimo no valor de ambas as variáveis, principalmente a partir da concentração de 2 mg.L^{-1} . Isto se deve, provavelmente, à formação de brotações vitrificadas que possuem grande quantidade de água, reduzindo principalmente o peso da matéria seca.

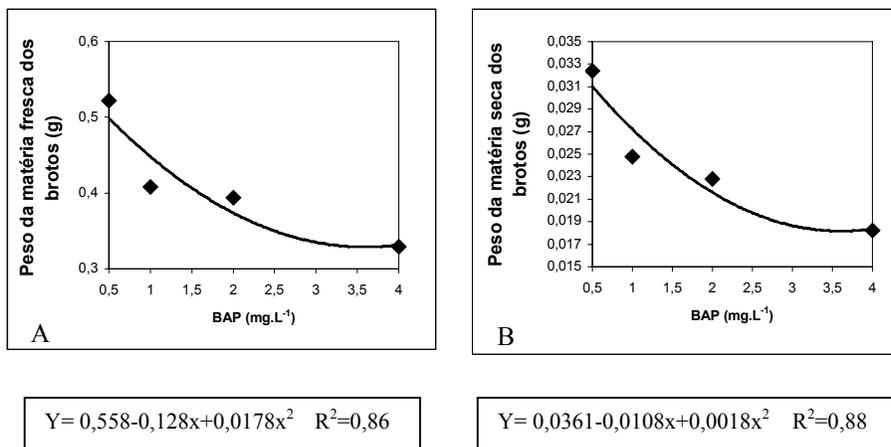


FIGURA 4. Peso da matéria fresca (A) e seca (B) dos brotos cultivados em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Peso da matéria fresca e seca de calos

A formação de calos foi observada nos tratamentos que não possuíam carvão ativado, porém na presença de BAP. Esse fitoregulador incrementou linearmente o peso da matéria fresca e seca de calos com o aumento de suas concentrações. Desta forma, o maior peso da matéria fresca (1,672g) e seca (0,85g) de calos foi observado com 4mg.L⁻¹ de BAP. Entretanto, na concentração de 0,5mg.L⁻¹ também se observaram valores altos, 0,964 g para peso da matéria fresca e 0,048 g para peso da matéria seca (Figura 5A e B). Bhansali (1993) também verificou o desenvolvimento de calos na base das brotações de *Tecomella undulata* utilizando o meio de cultura WPM e 1 mg.L⁻¹ de BAP.

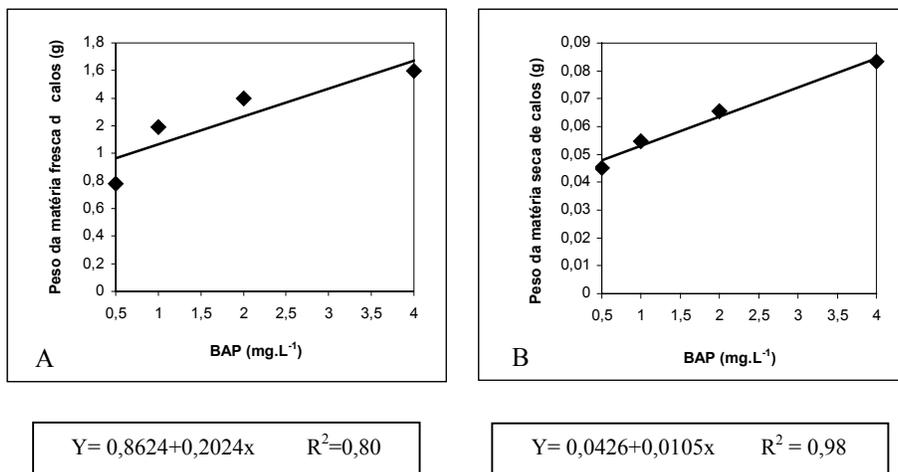


FIGURA 5. Peso da matéria fresca (A) e seca (B) de calos das brotações obtidos em diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras-MG, 2002.

A formação de calos não é desejada nesse caso, pois pode favorecer o surgimento de variação no genótipo. Provavelmente o BAP não seja a citocinina adequada para micropropagação da figueira 'Roxo de Valinhos', pois além de proporcionar brotações de tamanho reduzido e em sua maioria vitrificadas, também formou calo mesmo na concentração mínima utilizada. Observou-se também que mesmo durante o período em que as brotações estavam em meio de cultura sem reguladores de crescimento, visando a redução ou eliminação do efeito residual, a maioria continuava apresentando formação de calos.

4.1.2 Explantes não multiplicados

A adição de carvão ativado ao meio de cultura, nas concentrações utilizadas, inibiu a multiplicação de brotos, verificando-se apenas o crescimento da parte aérea e do sistema radicular do segmento nodal inicialmente inoculado. A formação de calos também não foi verificada. Para as variáveis comprimento e peso da matéria fresca e seca da parte aérea das plântulas, houve interação significativa entre BAP e carvão ativado, constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes (Tabela 3). Foi realizada outra análise estatística comparando o tratamento controle (ausência de BAP e carvão ativado) com os demais. Na Tabela 3 pode-se observar, por meio do teste F, que o tratamento controle difere estatisticamente de pelo menos um dos tratamentos abordados no esquema fatorial.

TABELA 3. Análise de variância para as características comprimento (CP) e peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea das plântulas. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios		
		CP	PMFPA	PMSPA
BAP	4	3,4159**	0,01660*	0,0001312**
Carvão Ativado	3	1,570*	0,00252 ^{ns}	0,0000133 ^{ns}
BAP*Carvão Ativado	12	0,86467*	0,00633**	0,0000809**
BAP*Carvão Ativado vs Adicional	1	2,0411*	0,00627*	0,0000716*
Erro	84	0,421	0,00145	0,0000145
CV (%)		7,72	18,50	19,84

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

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

ns – não significativo

Houve formação de raízes em todos os tratamentos em que havia carvão ativado, independente da concentração de BAP, e no tratamento controle (ausência de BAP e carvão ativado). Portanto, foi realizada outra análise estatística comparando o tratamento controle com os demais que apresentavam carvão ativado, combinado com diferentes concentrações de BAP (Tabela 4).

TABELA 4. Análise de variância para as características número de raízes (NR) e peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular das plântulas. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios		
		NR	PMFR	PMSR
BAP	4	8,5141**	0,00606**	0,00016**
Carvão Ativado	3	0,6650**	0,00022**	0,00002**
BAP*Carvão Ativado	12	0,6125**	0,00006**	0,00001**
BAP*Carvão Ativado vs Adicional	1	287,89**	0,0252**	0,00068**
Erro	84	11,456	0,000021	0,0000016
CV (%)		12,27	4,44	12,08

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

Comprimento das plântulas

Em função da análise de variância para o comprimento das plântulas, verifica-se a interação entre os fatores BAP e carvão ativado (Tabela 3). Entretanto, por meio do teste F, verificou-se resultado significativo em relação às concentrações de carvão ativado apenas na ausência de BAP. Sendo assim, torna-se necessário estudar apenas o comportamento do carvão ativado na ausência de BAP.

O maior comprimento dos brotos (8,59cm) foi observado com 4g.L⁻¹ de carvão, porém, a diferença observada nos outros níveis de carvão é muito

pequena, ou seja, mesmo utilizando 1 g.L⁻¹ de carvão, observam-se 7,43 cm de comprimento (Figura 6). Comparando o comprimento (7,7 cm) verificado no tratamento controle (ausência de BAP e carvão ativado) (Tabela 5) com o maior comprimento observado com 4 g.L⁻¹, nota-se pequena diferença (0,89 cm), o que não justifica a utilização do carvão ativado nesse caso.

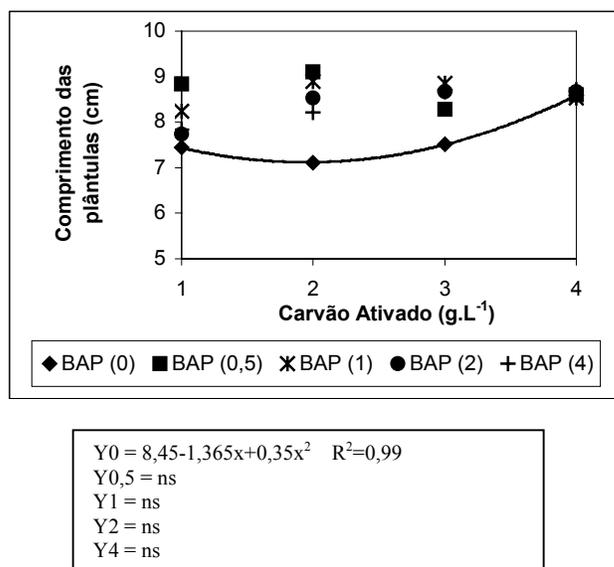


FIGURA 6. Comprimento de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Vários autores relatam o efeito do carvão ativado no alongamento das brotações em diversas espécies. Kowalski e Staden (2001) citam que a utilização de 2 g.L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura WPM proporcionou melhor crescimento das brotações de *Podocarpus henkelii*. De forma semelhante, Mohamed-Yasseen (2001) verificou aumento no comprimento das brotações de plântulas de milho com a adição de carvão ativado ao meio de cultura.

No presente trabalho, apesar do carvão ter proporcionado os maiores comprimentos de parte aérea, verificou-se, no tratamento controle, que as plântulas se desenvolveram de forma semelhante. Embora o carvão ativado não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a sua redução é economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas. Além disso, a presença do carvão ativado inibiu a multiplicação, mesmo nas concentrações mais altas do BAP. Segundo Fidelis (1998), algumas espécies possuem hábito de crescimento *in vitro* no qual a gema apical é persistente e não ramifica, principalmente quando se utilizam citocininas mais comuns como o BAP.

TABELA 5. Teste de médias para as variáveis comprimento (CP) e peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea das plântulas. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Tratamentos*	Médias dos tratamentos		
	CP (cm)	PMFPA (g)	PMSPA (g)
BAP 0 e Carvão 0 (Controle)	7,700 a	0,2338 a	0,0156 a
BAP 0 e Carvão 1	7,440 a	0,1602 b	0,0202 a
BAP 0 e Carvão 2	7,104 a	0,1370 b	0,0148 a
BAP 0 e Carvão 3	7,520 a	0,1710 a	0,0152 a
BAP 0 e Carvão 4	8,584 a	0,1214 b	0,0134 a
BAP 0,5 e Carvão 1	8,834 a	0,2010 a	0,0198 a
BAP 0,5 e Carvão 2	9,100 b	0,2320 a	0,0202 a
BAP 0,5 e Carvão 3	8,280 a	0,2220 a	0,0162 a
BAP 0,5 e Carvão 4	8,600 a	0,2150 a	0,0192 a
BAP 1 e Carvão 1	8,240 a	0,2070 a	0,0188 a
BAP 1 e Carvão 2	8,900 a	0,2550 a	0,0286 b
BAP 1 e Carvão 3	8,860 a	0,2298 a	0,0242 b
BAP 1 e Carvão 4	8,540 a	0,1692 a	0,0202 a
BAP 2 e Carvão 1	7,740 a	0,1554 b	0,0130 a
BAP 2 e Carvão 2	8,540 a	0,1788 a	0,0190 a
BAP 2 e Carvão 3	8,680 a	0,2270 a	0,0244 b
BAP 2 e Carvão 4	8,680 a	0,2660 a	0,0254 b
BAP 4 e Carvão 1	7,840 a	0,2442 a	0,0212 a
BAP 4 e Carvão 2	8,210 a	0,1768 a	0,0178 a
BAP 4 e Carvão 3	8,680 a	0,2096 a	0,0204 a
BAP 4 e Carvão 4	8,720 a	0,1716 a	0,0176 a

Médias seguidas por letras distintas diferem do tratamento controle ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.

* BAP=mg.L⁻¹ e Carvão ativado=g.L⁻¹

Peso da matéria fresca da parte aérea das plântulas

Houve interação entre os fatores BAP e carvão ativado de acordo com a Tabela 3. Porém, por meio do teste F, verificou-se que apenas as concentrações de 1, 2 e 4 mg.L⁻¹ BAP foram significativas em relação às concentrações de carvão ativado.

Os maiores pesos (0,25 e 0,26 g) foram observados com BAP 1 mg.L⁻¹ combinado com carvão 2,25 g.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹ de BAP e 4 g.L⁻¹ de carvão, respectivamente (Figura 7). Embora o nível 0,5 mg.L⁻¹ de BAP não tenha sido significativo, registrou-se 0,23 g quando combinado com 2,63 g.L⁻¹ de carvão. Na ausência de BAP, embora tenham sido registrados os maiores comprimentos, verificou-se que as brotações eram mais finas, resultando em menor peso de matéria fresca. Houve decréscimo no peso da matéria fresca com o aumento das concentrações de carvão combinado com 4 mg.L⁻¹ de BAP. Comparando o resultado do tratamento controle (0,23 g) (Tabela 5) com o observado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, verifica-se que não há diferença, constatando-se ser desnecessária a adição de BAP e carvão ativado para o incremento do peso da matéria fresca da parte aérea.

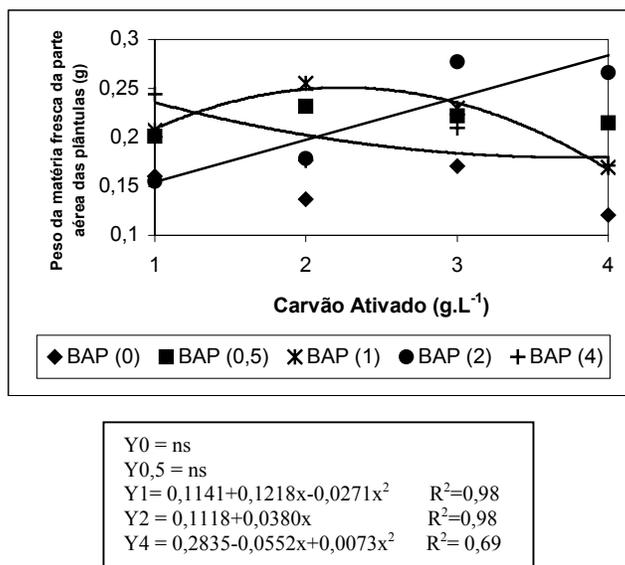


FIGURA 7. Peso da matéria fresca de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2002.

O excesso do regulador de crescimento pode ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea, mesmo utilizando-se a maior concentração do carvão ativado, resultando em menor peso da matéria fresca da parte aérea. Apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e pode resultar, entre outros efeitos, na redução do tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós (Leshem, Werker e Shalev, 1988).

Peso da matéria seca da parte aérea das plântulas

A partir da análise de variância, verifica-se que apenas a interação entre carvão e os níveis 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP foi significativa.

De forma semelhante ao peso da matéria fresca da parte aérea, os melhores resultados para peso da matéria seca (0,027 e 0,026 g) foram observados com 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP combinados com 2,53 e 4 g.L⁻¹ de carvão ativado, respectivamente (Figura 8). A diferença entre o maior valor observado para peso da matéria seca e o tratamento controle (Tabela 5), embora seja um pouco maior se comparado ao peso fresco, não torna necessária a adição do BAP e do carvão.

Kadota, Imizu e Irano (2001) citam que a adição de carvão ativado reduziu a biomassa de pereira micropropagada. O efeito não-seletivo do carvão ativado pode proporcionar resultados negativos na micropropagação (Pan e Staden, 1998).

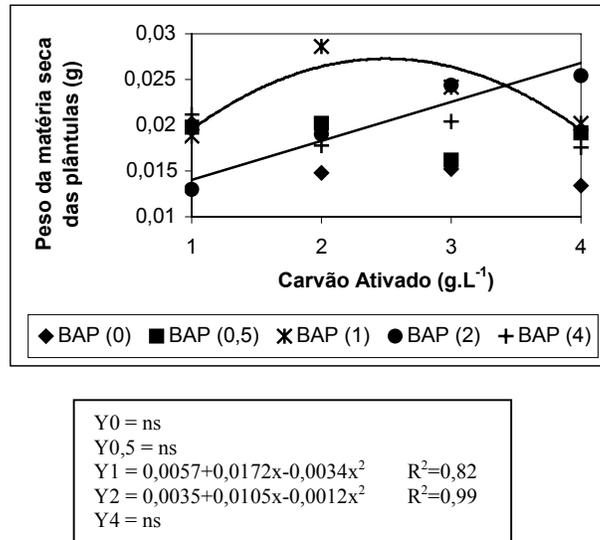


FIGURA 8. Peso da matéria seca de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Número de raízes

Houve formação de raízes em todos os tratamentos que continham carvão ativado combinado com diferentes concentrações de BAP e também no tratamento controle. Brum (2001) observou apenas 23% de enraizamento de plântulas de figueira utilizando meio WPM na ausência de sais e com 2 mg.L⁻¹ de AIB.

Em função da análise de variância, verificou-se interação entre os fatores BAP e carvão ativado (Tabela 4). Entretanto, por meio do teste F, constatou-se que apenas o nível 0 mg.L⁻¹ de BAP foi significativo em relação às concentrações de carvão ativado.

O maior número de raízes (4,34) foi observado com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, verificando-se decréscimo no número de raízes formadas até a

concentração de 2 g.L⁻¹ de carvão, tendendo à estabilidade a partir desse nível (Figura 9).

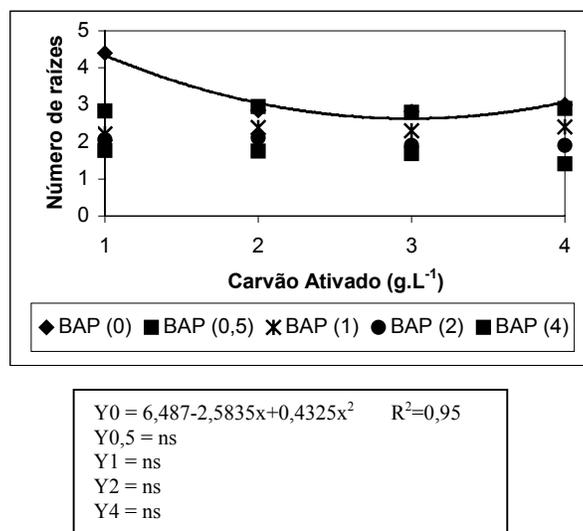


FIGURA 9. Número de raízes de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Porém, esse resultado é bastante inferior ao do tratamento controle (10,2 raízes) (Tabela 6), mostrando efeito negativo do carvão no número de raízes formadas em brotações de figueira ‘Roxo de Valinhos’. Esses resultados divergem dos observados por Barbosa et al. (1992) quando citam que a adição de 3 mg.L⁻¹ de carvão aumentou a qualidade e quantidade de raízes formadas na mesma cultivar de figueira, porém utilizando o meio MS. Entretanto, os resultados estão de acordo com os verificados por Rosati, Marino e Swierczewski (1980) quando relatam que a adição de carvão ativado promoveu efeito negativo na porcentagem de brotos enraizados, clorose e abscisão de

folhas de *Prunus salicina*. Webb, Flinn e Georgis (1988) também verificaram inibição da risogênese de *Pinus strobus*. Boggetti, Jasik e Mantell (2001) não verificaram efeito do carvão no enraizamento de *Anacardium occidentale*.

TABELA 6. Teste de médias para as variáveis número de raízes (NR) e peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular das plântulas. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Tratamentos*	Médias dos tratamentos		
	NR	PMFR (g)	PMSR (g)
BAP 0 e Carvão 0 (Controle)	10,2 a	0,175 a	0,0226 a
BAP 0 e Carvão 1	4,40 b	0,125 b	0,0198 a
BAP 0 e Carvão 2	2,86 b	0,118 b	0,0150 b
BAP 0 e Carvão 3	2,82 b	0,116 b	0,0142 b
BAP 0 e Carvão 4	3,01 b	0,117 b	0,0128 b
BAP 0,5 e Carvão 1	2,84 b	0,118 b	0,0138 b
BAP 0,5 e Carvão 2	2,95 b	0,117 b	0,0136 b
BAP 0,5 e Carvão 3	2,80 b	0,116 b	0,0140 b
BAP 0,5 e Carvão 4	2,90 b	0,118 b	0,0142 b
BAP 1 e Carvão 1	2,22 b	0,104 b	0,0120 b
BAP 1 e Carvão 2	2,39 b	0,102 b	0,0122 b
BAP 1 e Carvão 3	2,30 b	0,103 b	0,0122 b
BAP 1 e Carvão 4	2,40 b	0,102 b	0,0122 b
BAP 2 e Carvão 1	2,07 b	0,102 b	0,0120 b
BAP 2 e Carvão 2	2,12 b	0,103 b	0,0124 b
BAP 2 e Carvão 3	1,90 b	0,102 b	0,0092 b
BAP 2 e Carvão 4	1,90 b	0,087 b	0,0086 b
BAP 4 e Carvão 1	1,77 b	0,081 b	0,0086 b
BAP 4 e Carvão 2	1,75 b	0,077 b	0,0078 b
BAP 4 e Carvão 3	1,69 b	0,077 b	0,0084 b
BAP 4 e Carvão 4	1,42 b	0,069 b	0,0072 b

Médias seguidas por letras distintas diferem do tratamento controle ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnet.

* BAP=mg.L⁻¹ e Carvão ativado=g.L⁻¹

Todavia, para muitas espécies verifica-se efeito favorável no enraizamento quando se adiciona carvão ativado ao meio de cultura. Figueiredo, Albarello e Viana (2001) citam que a indução das raízes foi observada quando as brotações foram pré-tratadas com carvão ativado por sete dias, no escuro, antes de serem inoculadas em meio contendo AIB. Hazra et al. (2002) relataram o efeito sinérgico do carvão ativado na multiplicação e enraizamento de brotações de algodoeiro. Takayama e Misawa (1980) verificaram que a formação e o crescimento das raízes de *Lilium* eram inibidos por altas concentrações de BAP, mas essa inibição era completamente revertida pela adição de carvão ativado.

Segundo Pan e Staden (1998), a presença de carvão ativado pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizado. Seguindo os resultados observados nas variáveis anteriores, torna-se desnecessário o carvão na micropropagação da figueira ‘Roxo de Valinhos’, principalmente porque reduz consideravelmente o número de raízes formadas. Em testes previamente realizados em casa-de-vegetação, constatou-se a necessidade da presença de raízes para que se obtenha alta porcentagem de sobrevivência das plântulas durante a aclimatização. Brum (2001) concluiu que não é necessária a utilização do regulador de crescimento AIB (ácido indolbutírico) no enraizamento *in vitro* da figueira ‘Roxo de Valinhos’. Decetti (2000) também verificou o mesmo resultado para *Annona glabra*, porém com a utilização de 4 g.L⁻¹ de carvão ativado. Santos (2001) registrou 67% de enraizamento na cultivar Rubi de cafeeiro sem a adição de AIB, mas esse valor aumentava para 100% quando o regulador de crescimento estava presente.

Peso da matéria fresca do sistema radicular

Houve interação significativa entre os fatores BAP e carvão ativado, mas pelo teste F verificou-se que somente os níveis 0, 2 e 4 mg.L⁻¹ de BAP foram significativos com relação ao carvão ativado.

Analisando a Figura 10, verifica-se que o maior peso (0,125 g) ocorre na ausência de BAP e na concentração mínima de carvão ativado. Esse resultado é inferior ao observado no tratamento controle (0,175 g) (Tabela 6), salientando mais uma vez que não é necessária a adição do carvão na micropropagação da figueira. As concentrações de 2 e 4 mg.L⁻¹ de BAP proporcionaram resultados inferiores, os quais decresceram com o aumento das concentrações de carvão ativado.

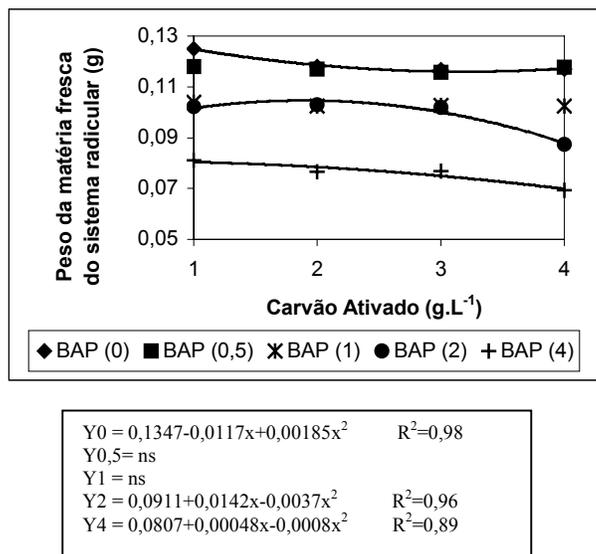


FIGURA 10. Peso da matéria fresca do sistema radicular de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Peso da matéria seca do sistema radicular

Na análise de variância, verifica-se que apenas a interação entre carvão e os níveis 1 e 2 mg.L⁻¹ de BAP foi significativa. Verifica-se, na Figura 11, que o maior peso da matéria seca do sistema radicular (0,0195 g) ocorre na ausência de BAP e com 1 g.L⁻¹ de carvão ativado e se comparado ao tratamento adicional (0,0226 g) (Tabela 6) observa-se aumento do peso na ausência de carvão. Com o aumento das concentrações de carvão, verifica-se queda no peso da matéria seca das raízes.

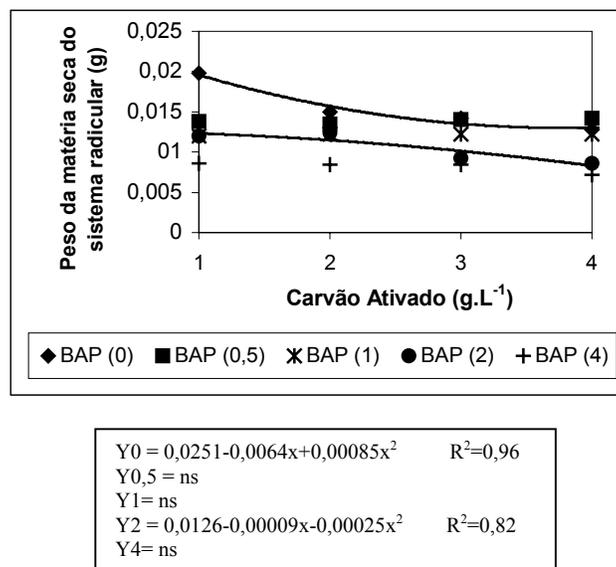


FIGURA 11. Peso da matéria seca do sistema radicular de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de BAP e carvão ativado. UFLA, Lavras-MG, 2002.

4.2 Cinetina e GA₃ na multiplicação *in vitro*.

A multiplicação de brotos e a formação calos ocorreram apenas nos tratamentos que continham cinetina na presença ou ausência de GA₃. Através da análise de variância, verifica-se que houve interação significativa entre cinetina e GA₃ para número de brotos, evidenciando o efeito correlacionado dos reguladores de crescimento. Observa-se que, para peso da matéria fresca e seca de calos, os fatores não são dependentes e apenas a utilização de cinetina foi significativa (Tabela 7).

TABELA 7. Análise de variância para as características número (NB) e peso da matéria fresca (PMFC) e seca (PMSC) de calos. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NB	PMFC	PMSC
Cinetina	3	2,400**	3,5227**	0,0136**
GA ₃	4	1,225**	0,0033 ^{ns}	0,000012 ^{ns}
Cinetina*GA ₃	12	0,4339**	0,0026 ^{ns}	0,000006 ^{ns}
Erro	80	0,1698	0,1698	0,000015
CV (%)		12,44	4,34	7,76

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

ns – não significativo

Em relação ao comprimento dos brotos e ao peso da matéria fresca e seca da parte aérea das brotações observa-se, segundo análise de variância, que existe interação entre os fatores estudados (Tabela 8).

TABELA 8. Análise de variância para as características comprimento de brotos (CB) e peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea das brotações. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		CB	PMFPA	PMSPA
Cinetina	4	86,685**	0,1018**	0,00029**
GA ₃	4	31,532**	0,0903**	0,00068**
Cinetina*GA ₃	16	3,2321**	0,0666**	0,00017**
Erro	100	0,3757	0,00022	0,000004
CV (%)		10,17	5,46	10,55

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

Houve formação do sistema radicular apenas nos tratamentos que não continham cinetina. Dessa forma, foi necessário estudar apenas a influência do GA₃ no sistema radicular. Na Tabela 9 nota-se que o GA₃ foi significativo para número de raízes e peso da matéria fresca e seca do sistema radicular.

TABELA 9. Análise de variância para as características número de raízes (NR) e peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NR	PMFR	PMSR
GA ₃	4	5,1259**	0,0144**	0,00023**
Erro	20	0,0969	0,00010	0,000002
CV (%)		17,35	10,9	12,54

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

Número de brotos

Não houve multiplicação de brotos na ausência de cinetina, verificando apenas o desenvolvimento e crescimento da parte aérea dos segmentos nodais. Maior número de brotos (4,25) foi observado com 2,45 mg.L⁻¹ de cinetina na ausência de GA₃ (Figura 12). Porém, a partir de 2 mg.L⁻¹ de cinetina, observou-se a formação de brotos pequenos e vitrificados. Provavelmente essa variedade requer baixa concentração de citocinina para sua multiplicação devido às altas concentrações causarem desordens morfológicas e fisiológicas, tais como vitrificação. Com a utilização de 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina na ausência de GA₃, registraram-se 3,36 brotos. Embora o número seja inferior, a qualidade dos brotos foi visualmente melhor, ou seja, possuíam maior comprimento, não havia vitrificação e apresentavam formação de raízes. Resultado semelhante (3,75 brotos) foi observado com 1 mg.L⁻¹ de cinetina, porém sem a formação de raízes.

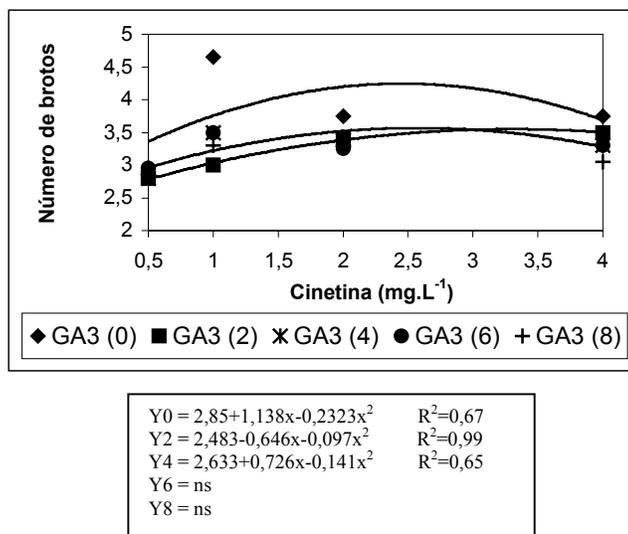


FIGURA 12. Número de brotos de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2002.

A presença do GA₃ reduziu o número de brotos e as folhas formadas eram alongadas e cloróticas. Nas concentrações de 6 e 8 mg.L⁻¹ de GA₃ na presença de cinetina, observou-se maior número de brotos vitrificados. A hiperidricidade das células em folhas vitrificadas tem sido atribuída à má formação ou falta de lignina (Phan e Letouzé, 1983). As alterações morfológicas foliares podem, muitas vezes, influenciar os processos metabólicos e fisiológicos associados principalmente à fotossíntese e transpiração (Ziv, 1991).

Yui et al. (1993) verificaram que a adição de giberelina ao meio MS, em concentrações que variam entre 0,1 e 1 mg.L⁻¹, não apresenta efeitos significativos sobre a proliferação de brotações em porta-enxertos e cultivares de macieira.

A interação entre esses reguladores de crescimento não foi adequada para a multiplicação da variedade 'Roxo de Valinhos', sendo necessária apenas a

utilização da cinetina. De acordo com George (1996), o efeito do GA₃ na proliferação de brotações varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo também da espécie que está sendo micropropagada.

A utilização de cinetina na multiplicação de diversas espécies tem sido relatada por vários autores. Pereira et al. (2000), utilizando 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina, observaram aumento na produção de brotos de *Salix humboldtiana*. A utilização de 0,4 mg.L⁻¹ de cinetina estimulou a formação de brotos e o número de folhas por explante de *Emblica officinalis* (Mishra et al., 1999).

Comprimento dos brotos

Pelo teste F, verifica-se interação significativa entre cinetina e GA₃ para o comprimento dos brotos. É importante ressaltar que enquanto o GA₃ aumenta o tamanho dos brotos, a cinetina aumenta o seu número, porém com menor tamanho. De acordo com a Figura 13, observa-se que com o aumento das concentrações de cinetina há decréscimo no comprimento dos brotos principalmente na ausência de GA₃. Quando se utilizou as concentrações de 2, 4, 6 e 8 mg.L⁻¹ de GA₃, a redução no comprimento foi menor. O maior comprimento (9,14 cm) foi verificado com 6 mg.L⁻¹ de GA₃ na ausência de cinetina, embora as outras concentrações de GA₃ não mostrem grande diferença. Porém, esse maior comprimento observado na presença de GA₃ foi devido ao excessivo estiolamento das brotações, o que não é desejado, além das brotações apresentarem-se vitrificadas, com folhas cloróticas e alongadas e com necrose apical.

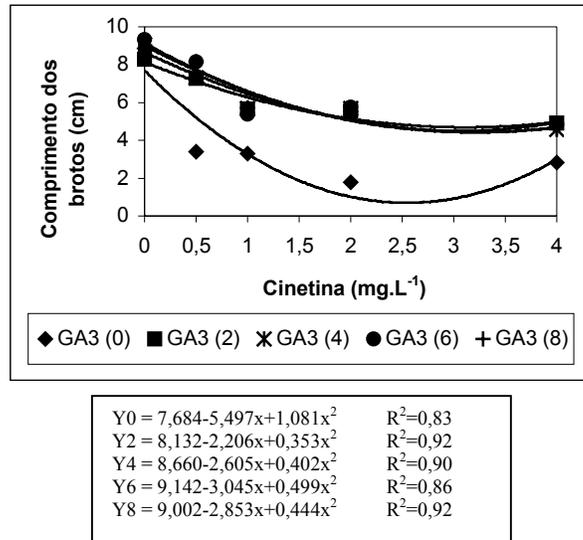


FIGURA 13. Comprimento dos brotos de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Munhoz et al. (1999) relatam que a necrose apical e a abscisão foliar são desordens fisiológicas observadas freqüentemente em condições normais de microcultivo e têm sido associadas à deficiência de cálcio (Sha, McCown e Peterson, 1985) e ao acúmulo de gases como o etileno (Lemos e Blake, 1996). Como o cálcio depende da transpiração da planta para seu transporte no xilema, as condições de alta umidade do ar que se estabelecem *in vitro*, aliadas ao excessivo tamanho das plântulas estioladas, podem induzir sua deficiência em partes aéreas de plântulas micropropagadas.

Resultados semelhantes foram observados por De Fossard et al. (1978), que constataram efeito deletério desse fitoregulador no cultivo de *Eucalyptus ficifolia*, provocando alongamento excessivo e deformações foliares. Biasi, Koller e Kämpf (1994) verificaram, na micropropagação do abacateiro, que a

adição de GA₃ ao meio de cultura aumenta a porcentagem de brotações anormais, com folhas alongadas, retorcidas, cloróticas, quebradiças e de fácil abscisão. Mishra et al. (1999) descreveram o alongamento dos internódios de *Embllica officinalis* quando utilizaram 1 mg.L⁻¹ de GA₃, enquanto 3 mg.L⁻¹ causaram desfolhamento de alguns explantes. Deccetti (2000) relatou o efeito prejudicial do GA₃ no desenvolvimento de brotações de *Annona glabra*, além da ocorrência de necrose apical e abscisão foliar. Porém, Figueiredo, Albarello e Viana (2001) relataram a necessidade do GA₃ para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa*.

Quando se utilizou 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina na ausência de GA₃, verificaram-se 5,2 cm de comprimento e não foi observada má formação dos brotos. A obtenção de brotações bem formadas e de maior tamanho proporciona rápido crescimento das plântulas e diminuição no tempo de permanência no laboratório, otimizando a produção de mudas e reduzindo o custo. Normalmente o BAP é a citocinina mais utilizada por proporcionar maior número de brotos. Porém, a qualidade dos brotos nem sempre é alcançada principalmente devido a vitrificação, além de possuírem reduzido tamanho, necessitando de maior tempo no laboratório para que as plântulas atinjam tamanho ideal para a aclimatização.

Peso da matéria fresca e seca da parte aérea

Verifica-se, pelo teste F, a interação significativa entre os fatores para peso da matéria fresca e seca da parte aérea. Observa-se, nas Figuras 14A e B, que o maior peso ocorreu na ausência de GA₃ e cinetina e que, quando se utilizou as concentrações 2, 4, 6 e 8 mg.L⁻¹ de GA₃, houve aumento de peso até a concentração de 2 mg.L⁻¹ de cinetina. Verifica-se que a partir de 2 mg.L⁻¹ de

cinetina houve decréscimo no peso da matéria fresca e seca devido à redução do tamanho das plântulas.

O maior peso da matéria fresca (0,601 g) e seca (0,041 g) ocorreu na ausência de ambos reguladores de crescimento, mas nessa condição houve apenas o crescimento e desenvolvimento do segmento nodal inicialmente inoculado, não havendo multiplicação. Nos tratamentos em que se observou a multiplicação, os melhores resultados foram verificados com 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina na ausência do GA₃, registrando-se 0,437 g para peso da matéria fresca e 0,032 g para peso da matéria seca da parte aérea dos brotos multiplicados.

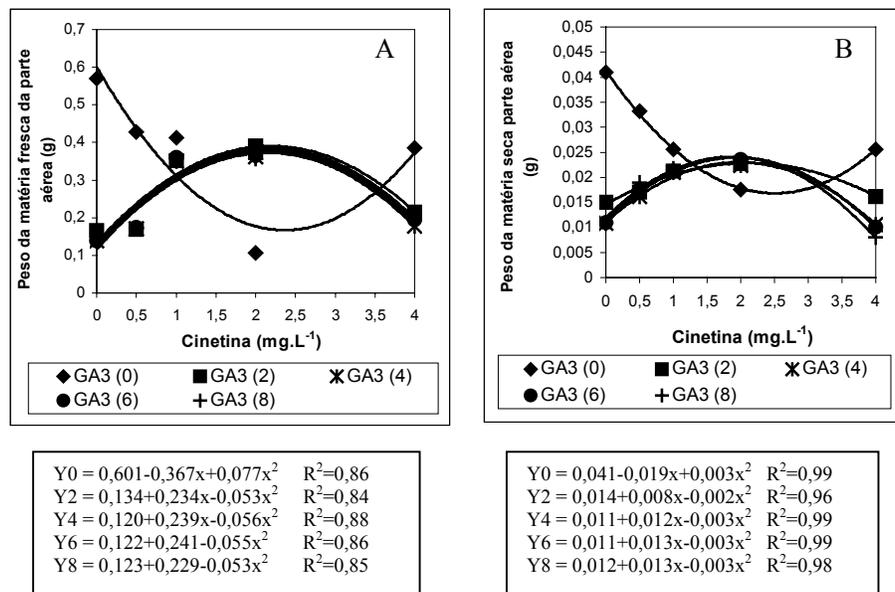


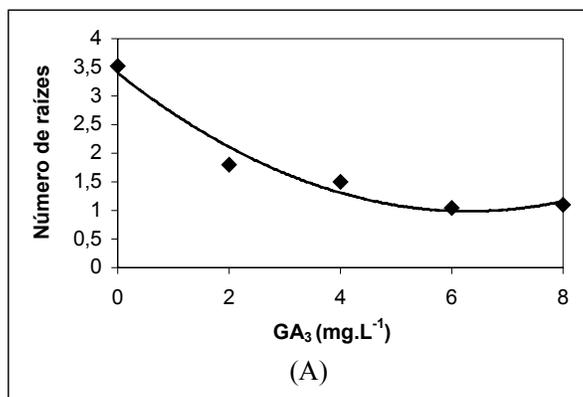
FIGURA 14. Peso da matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea dos brotos de plântulas cultivadas em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Número de raízes e peso da matéria fresca e seca do sistema radicular

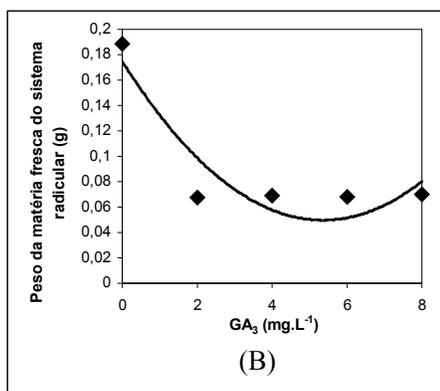
A formação radicular foi observada nos tratamentos que não continham cinetina, embora na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, na ausência de GA_3 , também se tenha verificado média de 2,2 raízes. Nas Figuras 15A, B e C verifica-se que com o aumento das concentrações de GA_3 houve menor formação de raízes e menor peso da matéria fresca e seca do sistema radicular. Observa-se queda acentuada das características avaliadas até a concentração de 4 mg.L^{-1} , tendendo à estabilização nas concentrações superiores.

Maior número de raízes (3,39) e peso da matéria fresca (0,174 g) e seca (0,0218 g) do sistema radicular foram observados na ausência de GA_3 . Possivelmente, as concentrações utilizadas foram elevadas para a espécie em estudo, o que prejudicou o enraizamento e leva a crer que o conteúdo endógeno do explante seja suficiente para promover o enraizamento. Kochba et al. (1974) citam que a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. Todavia, quando aplicado em concentrações relativamente elevadas, impede a formação de raízes.

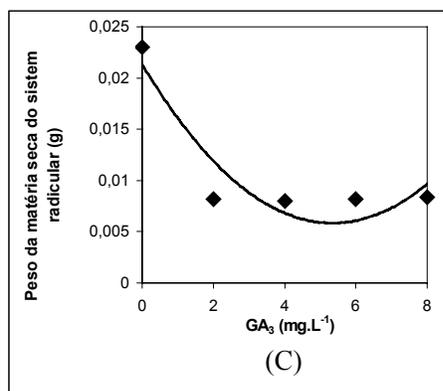
Brum (2001) concluiu que não é necessário utilizar reguladores de crescimento para o enraizamento de brotações de *Ficus carica* 'Roxo de Valinhos'. De modo semelhante, Deccetti (2000) observou alto percentual de enraizamento e maior número de raízes em *Annona glabra* na ausência de regulador de crescimento.



$$Y = 3,396 - 0,763x + 0,0605x^2 \quad R^2 = 0,96$$



$$Y = 0,174 - 0,046x + 0,0043x^2 \quad R^2 = 0,85$$



$$Y = 0,0218 - 0,006x + 0,00056x^2 \quad R^2 = 0,86$$

FIGURA 15. Número de raízes (A) e peso da matéria fresca (B) e seca (C) do sistema radicular dos brotos cultivados em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Peso da matéria fresca e seca de calos

O peso da matéria fresca e seca de calo foi afetado apenas pela cinetina, não sendo observada formação de calos na sua ausência. O peso da matéria fresca e seca de calo aumentou linearmente com o aumento das concentrações de cinetina (Figura 16A e B). Dessa forma, observou-se maior peso da matéria fresca (1,331 g) e seca (0,08 g) de calos com 4 g.L⁻¹ de cinetina. Quando se adicionou 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina ao meio de cultura, menor peso da matéria fresca (0,555 g) e seca (0,028 g) de calos foi observado. Embora não seja desejada a formação de calos nesse caso, registraram-se valores menores em relação àqueles observados com BAP, evidenciando que a cinetina é mais adequada para a multiplicação da figueira ‘Roxo de Valinhos’. Resultados semelhantes foram relatados por Jordan e Iturriaga (1980) quando verificaram que a utilização da cinetina como único regulador de crescimento no meio de cultura diminuiu a formação de calos em *Ficus carica*.

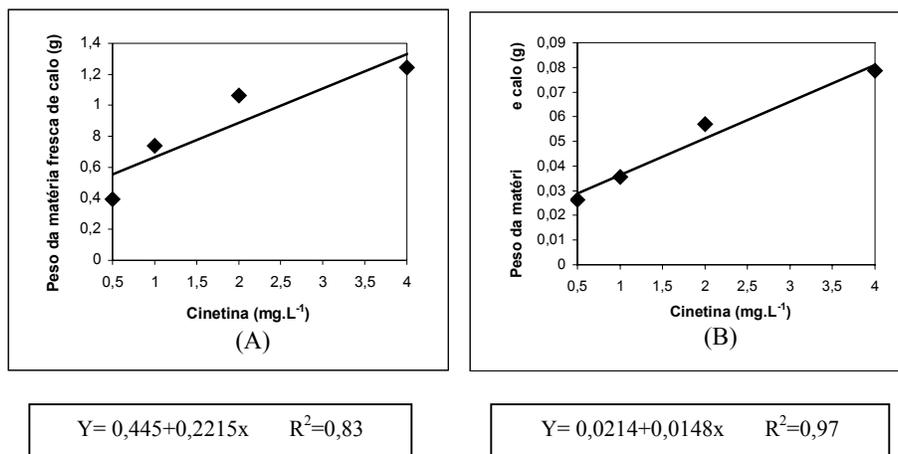


FIGURA 16. Peso da matéria fresca (A) e seca (B) de calos dos brotos cultivados em meio de cultura WPM em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras-MG, 2002.

4.3 Cinetina e meio de cultura WPM na multiplicação *in vitro*.

A multiplicação de brotos e formação de calos ocorreu nos tratamentos que continham cinetina combinada com as diferentes concentrações do meio de cultura WPM. Na análise de variância observa-se que houve interação significativa entre as concentrações de cinetina e WPM, constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes (Tabela 10).

TABELA 10. Análise de variância para as características número (NB) e peso da matéria fresca (PMFC) e seca (PMSC) de calos. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NB	PMFC	PMSC
Cinetina	3	1,355**	1,720**	0,0057**
WPM	3	12,427**	2,587**	0,0079**
Cinetina*WPM	9	0,981**	0,194**	0,0006**
Erro	64	0,133	0,0001	0,000005
CV (%)		13,15	1,49	5,29

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

Para comprimento dos brotos e peso da matéria fresca e seca da parte aérea houve interação significativa entre os fatores estudados, conforme se observa na Tabela 11. Para a avaliação dessas variáveis foi incluída a concentração 0 mg.L⁻¹ de cinetina, embora tenha ocorrido apenas o desenvolvimento dos segmentos nodais, não havendo, portanto, a multiplicação dos explantes.

TABELA 11. Análise de variância para as características comprimento de brotos (CB) e peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea das brotações. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		CB	PMFPA	PMSPA
Cinetina	4	77,109**	0,0949**	0,00057**
WPM	3	13,627**	0,1844**	0,00055**
Cinetina*WPM	12	3,481**	0,0283**	0,000089**
Erro	80	0,088	0,0002	0,000001
CV (%)		10,52	6,56	6,43

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

Houve formação do sistema radicular apenas nos tratamentos que não continham cinetina, sendo necessário estudar apenas a influência do WPM no sistema radicular. Na Tabela 12 nota-se que o WPM foi significativo para número de raízes e peso da matéria fresca e seca do sistema radicular.

TABELA 12. Análise de variância para as características número de raízes (NR) e peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios		
		NR	PMFR	PMSR
WPM	3	2,2890**	0,0190**	0,00031**
Erro	16	0,2070	0,00018	0,000000085
CV (%)		14,68	11,39	5,80

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

Número de brotos

Maior número de brotos foi observado nas concentrações de 100 (3,78) e 150% (3,73) do meio de cultura WPM nas concentrações de 2,6 e 2,4 mg.L⁻¹ de cinetina, respectivamente (Figura 17). Porém, pouca diferença foi observada quando se utilizou 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina e 100% do meio WPM (3,17 brotos), além dessas brotações possuírem melhor coloração das folhas e não apresentarem vitrificação. Observou-se que na concentração de 150% do meio WPM as brotações já apresentavam algumas folhas vitrificadas, o que intensificou na concentração de 200%.

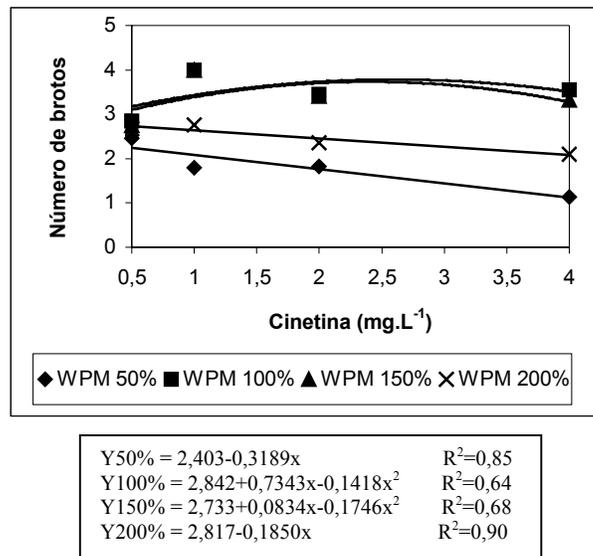


FIGURA 17. Número de brotos de plântulas cultivadas em diferentes concentrações do meio de cultura WPM e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Menor número de brotos foi observado nas concentrações de 50 e 200% do meio de cultura WPM, havendo decréscimo com o aumento das concentrações de cinetina (Figura 17). Possivelmente, a baixa concentração de nutrientes resultante da redução de 50% da concentração padrão do meio WPM dificultou a multiplicação dos brotos, pois o meio WPM já possui concentrações inferiores às observadas em outros meios de cultura normalmente utilizados como, por exemplo, o MS. Porém, quando a concentração dos componentes do meio WPM foi aumentada para 200%, também não foram observados bons resultados. Provavelmente, essa variedade de *Ficus carica* requer concentrações inferiores de nutrientes para a multiplicação, o que é verificado na concentração de 100% do meio de cultura WPM. Plantas lenhosas micropropagadas são, freqüentemente, afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. Desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* têm sido descritas principalmente como vitrificação ou hiperidratação (Ziv, 1991) e afetam a fotossíntese e as trocas gasosas, impedindo o estabelecimento *ex vitro* de plantas micropropagadas (Debergh e Maene, 1984). Segundo Gaspar et al. (1985), em plantas lenhosas, a alta concentração de íons no meio de cultura pode induzir a vitrificação da parte aérea de algumas espécies, podendo, em casos mais drásticos, conduzir à morte da cultura.

Comprimento dos brotos

Pelo teste F verifica-se interação significativa entre cinetina e WPM para o comprimento dos brotos. Na Figura 18, observa-se que com o aumento das concentrações de cinetina há decréscimo no comprimento dos brotos, independentemente da concentração do meio WPM utilizada. É possível que

essa redução no tamanho dos brotos seja devido ao efeito tóxico causado pelo excesso de citocinina nos explantes. Leshem, Werker e Shalev (1988) citam que apesar da utilização de citocinina ser necessária à multiplicação dos brotos, o seu excesso é tóxico e algumas das características observadas são a falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós.

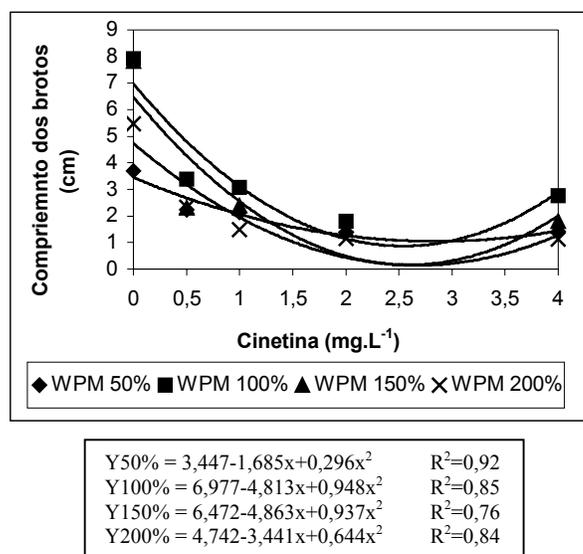


FIGURA 18. Comprimento dos brotos de plântulas cultivadas em diferentes concentrações de meio de cultura WPM e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Os maiores valores para comprimento dos brotos foram observados na ausência de cinetina e com 100% (6,98 cm) e 150% (6,47 cm) do meio, porém verificou-se apenas crescimento e desenvolvimento da parte aérea, não havendo multiplicação. Com relação aos brotos multiplicados, maior comprimento foi observado com 100% (4,80 cm) e 150% (4,06 cm) do meio WPM e 0,5 mg.L⁻¹

de cinetina, sugerindo que a concentração padrão do meio WPM é ideal para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea de plântulas de figueira 'Roxo de Valinhos'.

Peso da matéria fresca e seca da parte aérea

Observa-se nas Figuras 19A e B que o maior peso da matéria fresca e seca ocorreu na ausência de cinetina e em meio de cultura nas concentrações de 100 e 150%. Entretanto, esse resultado se deve ao fato de que os explantes não se multiplicaram e as plântulas formadas cresceram e se desenvolveram normalmente, propiciando maior peso. Maior peso da matéria fresca (0,398 g) e seca (0,028 g) dos brotos multiplicados foi observado com 100% do meio WPM, seguido de 150% combinado com 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina. Esse maior valor se deve ao melhor desenvolvimento da parte aérea, visto que as folhas eram maiores e o caule mais espesso em relação aos demais tratamentos.

Os menores pesos foram observados com 50 e 200% do meio de cultura, porém pouca variação foi observada com 50% do meio nas diferentes concentrações de cinetina. Tanto a redução como o excesso de nutrientes e componentes do meio influenciaram negativamente o crescimento dos brotos, reduzindo o peso médio.

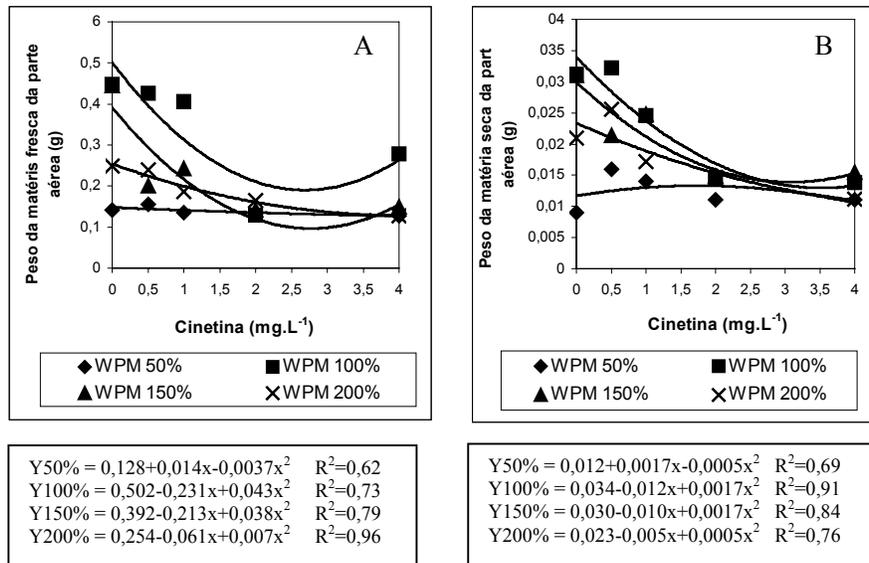


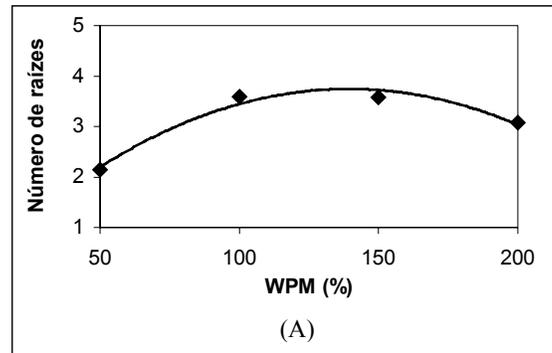
FIGURA 19. Peso da matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea dos brotos de plântulas cultivadas em diferentes concentrações de meio de cultura WPM e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Número de raízes e peso da matéria fresca e seca do sistema radicular

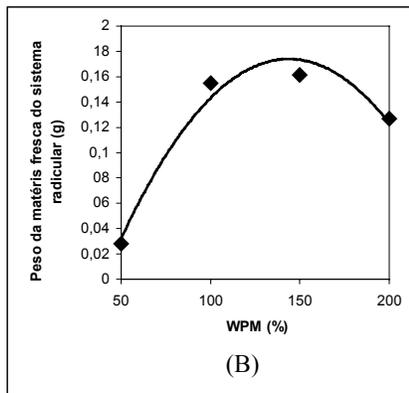
Verificou-se a formação do sistema radicular apenas nos tratamentos que não continham cinetina; porém, com 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina nas concentrações de 100, 150 e 200% do meio observaram-se médias de 2,3; 2,1 e 1,9 raízes, respectivamente.

Observou-se maior número de raízes (3,82) na concentração de 142% do meio de cultura WPM, porém resultado semelhante (3,48 raízes) é verificado com 100% do meio (Figura 20A). O maior peso da matéria fresca (0,172 g) é obtido com 143,7% do meio WPM e o maior peso da matéria seca (0,024 g),

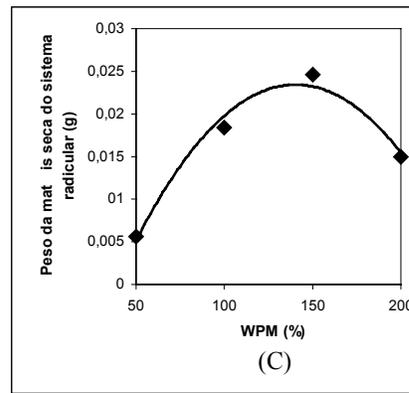
com 150%. Entretanto, existe pouca diferença no peso da matéria fresca (0,141 g) e seca (0,019 g) quando se utilizam 100% do meio WPM (Figura 20B e C).



$$Y = -0,02 + 0,054x - 0,00019x^2 \quad R^2 = 0,97$$



$$Y = -0,159 + 0,0046x - 0,000016x^2 \quad R^2 = 0,97$$



$$Y = -0,021 + 0,0006x - 0,000002x^2 \quad R^2 = 0,98$$

FIGURA 20. Número de raízes (A) e peso da matéria fresca (B) e seca (C) do sistema radicular dos brotos cultivados em diferentes concentrações de meio de cultura WPM e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2002.

A partir da concentração de 150% do meio verifica-se queda no número de raízes formadas e no peso da matéria fresca e seca do sistema radicular, sugerindo que altas concentrações do meio de cultura dificultam o enraizamento das brotações. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), os componentes que inibem o enraizamento quando em excesso são os macronutrientes, porém, diluições excessivas desses nutrientes podem levar a deficiências minerais na parte aérea enraizada. Os micronutrientes, devido às suas baixas concentrações, geralmente não requerem diluição, o que pode ser prejudicial, causando deficiência para o crescimento das raízes.

Peso da matéria fresca e seca de calos

A formação de calos ocorreu nos diferentes tratamentos que continham cinetina, independentemente da concentração do meio de cultura. Não houve efeito da cinetina quando se utilizaram 50% do meio de cultura para peso da matéria fresca e seca de calos. Possivelmente, a concentração de nutrientes presente em 50% do meio não é suficiente para que o calo se desenvolva como nos outros tratamentos, pois foram verificados valores máximos de 0,156 e 0,013 g de peso fresco e seco, respectivamente. Observa-se nas Figuras 21A e B, que o peso da matéria fresca e seca de calos aumenta linearmente com o aumento das concentrações de cinetina para as concentrações de 100, 150 e 200% do meio de cultura. O maior peso de matéria fresca (1,425 g) e seca (0,09 g) foi constatado quando se utilizaram 4 mg.L⁻¹ de cinetina combinados com 200% do meio WPM, embora a diferença observada entre os outros seja muito pequena. Porém, quando se utilizou 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina e 100% do meio, verificaram-se os menores valores para peso fresco (0,521 g) e seco (0,028 g) de calos, evidenciando que essa concentração é a mais adequada para a

multiplicação da 'Roxo de Valinhos'. Jordan e Iturriaga (1980) citam que a utilização de cinetina no meio de cultura diminuiu a formação de calos em *Ficus carica*.

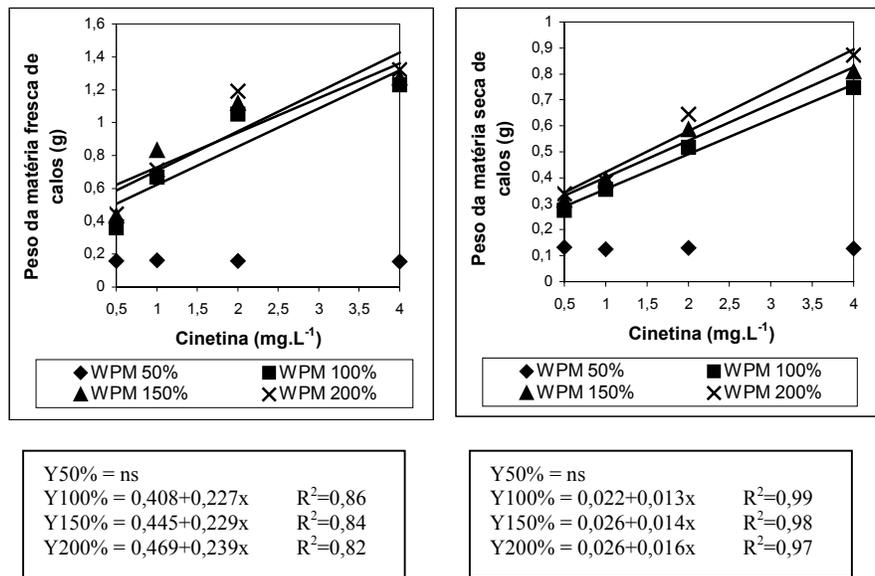


FIGURA 21. Peso da matéria fresca (A) e seca (B) de calos dos brotos cultivados em diferentes concentrações de meio de cultura WPM e cinetina. UFLA, Lavras-MG, 2002.

4.3 Tempo de permanência em meio de cultura e diferentes substratos na aclimatização da figueira.

Verifica-se, através da análise de variância, que houve interação significativa para todas as variáveis analisadas pelo teste de Scott-Knott, constatando-se o efeito correlacionado entre os dias de permanência em meio de cultura isento de reguladores de crescimento e o tipo de substrato (Tabela 13). As brotações imediatamente transferidas do meio de cultura para a casa-de-vegetação (0 dias) não sobreviveram a nenhum substrato, provavelmente pelo reduzido tamanho (1 cm).

TABELA 13. Análise de variância para as características sobrevivência, altura, peso da matéria fresca (PMFPA) e seca (PMSPA) da parte aérea e peso da matéria fresca (PMFR) e seca (PMSR) do sistema radicular. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		Sobrevivência	Altura	PMFPA	PMSPA	PMFR	PMSR
Substrato	4	12032,50**	19,508**	1,685**	0,064**	0,595**	0,013**
Dias	3	751,666**	59,063**	2,058**	0,095**	1,747**	0,051**
Substrato*Dias	12	789,166**	2,258**	0,114**	0,013**	0,100**	0,004**
Erro	60	98,333	0,201	0,011	0,0006	0,018	0,00025
CV (%)		16,06	8,05	9,34	10,81	10,64	11,06

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

Sobrevivência

As plântulas que permaneceram por 15, 30, 45 e 60 dias em meio de cultura isento de reguladores e foram transferidas para casa-de-vegetação, apresentaram maiores percentuais quando plantadas em Plantmax[®] e Plantmax[®] + Vermiculita (Figura 22).

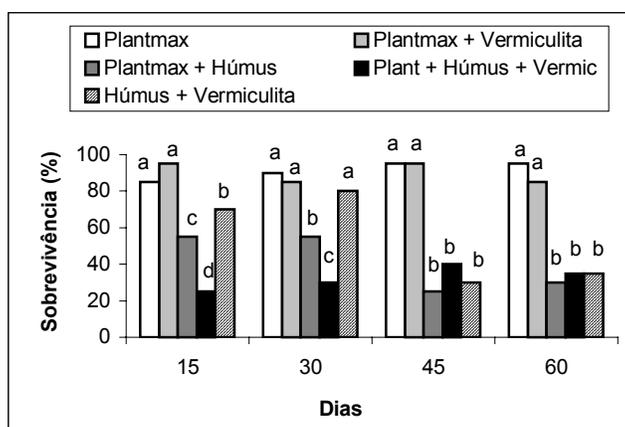


FIGURA 22. Sobrevivência de mudas de figueira em casa-de-vegetação em função de diferentes substratos e dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras, UFLA, 2002.

A taxa de sobrevivência das plântulas com 15 dias foi superior no substrato Plantmax[®] + Vermiculita (95%), enquanto o Plantmax[®] proporcionou 85% de sobrevivência. Observou-se o crescimento de brotações laterais na maioria das plântulas durante a aclimatização, demonstrando que 15 dias de permanência em meio sem reguladores não são suficientes para eliminar o efeito residual do BAP. O percentual de sobrevivência foi maior para as plântulas de 30 (90%), 45 e 60 dias (95%) com a utilização do Plantmax[®], sendo que a

mistura Plantmax[®] + Vermiculita também proporcionou bons resultados, os quais não diferiram estatisticamente daqueles observados com Plantmax[®]. Os melhores resultados obtidos com o Plantmax[®] se deve, provavelmente, ao fato deste substrato possuir os nutrientes na quantidade adequada para o período inicial de desenvolvimento das mudas, conferindo maior taxa de sobrevivência.

Outro fator que pode ter contribuído para elevada taxa de sobrevivência foi a pré-aclimatização, realizada através da abertura dos tubos de ensaio por cinco dias antes da aclimatização. Apesar de pouco, o tempo foi suficiente para que as plântulas não murchassem durante e após o transplântio. Ziv (1986) relata que quando os recipientes que continham plântulas de craveiro foram abertos e a umidade relativa mantida a 50-70%, houve aumento no desenvolvimento de cera epicuticular e, após nove dias de abertura dos recipientes, a taxa de sobrevivência aumentou de 75 para 90%. Entretanto, Hoffmann (1999) constatou que a abertura antecipada dos frascos ou o selamento dos frascos com algodão desfavoreciam a sobrevivência e o crescimento das mudas de macieira durante a aclimatização.

O controle da luminosidade realizado através do sombrite[®] 50% no primeiro mês provavelmente também favoreceu a sobrevivência das mudas, reduzindo o estresse causado pela luz. Para evitá-lo, é importante o controle da intensidade luminosa através do sombreamento parcial, reduzindo de 50 a 90% a luminosidade, proporcionando ambiente semelhante ou pouco superior ao encontrado na sala de crescimento (George, 1996). Deccetti (2000) observou 100% de sobrevivência das mudas de *Annona glabra* e Santos (2001), de 80 a 90% em mudas de cafeeiro, controlando a umidade relativa nas primeiras semanas e reduzindo gradativamente a intensidade luminosa utilizando sombrite[®].

As menores taxas de sobrevivência foram observadas nos tratamentos que continham húmus, principalmente com a mistura Plantmax[®] + Húmus +

Vermiculita, possivelmente pelo excesso de nutrientes fornecido na fase inicial de crescimento e desenvolvimento. Essa redução foi maior para as plântulas de 45 e 60 dias devido, provavelmente, à compactação do substrato causada pelo húmus, dificultando maior 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. Avanzatto e Cherubini (1993) testaram 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 e 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.

Rodrigues e Fior (2000) observaram melhores resultados na aclimatização de *Persea venosa* utilizando substratos que continham casca de arroz carbonizada. Hoffmann (1999) identificou como melhor substrato o Plantmax[®], seguido da mistura de solo + areia na aclimatização de macieira. Resultados contrários foram obtidos por Calvete, Kämpf e Daudt (2000) ao concluírem que os substratos que apresentaram maior retenção de água e menor espaço de aeração proporcionaram maior sobrevivência, crescimento e qualidade das mudas de morangueiro, sugerindo que esses resultados se devem às características específicas da planta.

Resultados satisfatórios também foram obtidos por vários autores. Pontikis e Melas (1986) aclimatizaram plântulas enraizadas de *Ficus carica* ‘Kalamon’ utilizando turfa e vermiculita. Barbosa et al. (1992) relataram que a aclimatização da figueira ‘Roxo de Valinhos’ foi realizada a partir de plântulas enraizadas e o substrato utilizado foi a mistura de vermiculita, areia e solo, irrigado com solução nutritiva MS 1:10. Os mesmos autores citam que as 10-12

folhas iniciais apresentaram-se codiformes e as restantes, lobadas normais. Essas mesmas características foram observadas no presente experimento. Demiralay et al. (1998) verificaram uma taxa de 90% de sobrevivência para *Ficus carica* ‘Bursa Siyahi’ utilizando turfa e perlita como substrato. Nobre et al. (1998) citam que plântulas de figueira ‘Berbera’ e ‘Lampa’ permaneceram por três meses em casa-de-vegetação, após os quais foram transferidas para o campo, obtendo a primeira colheita após dois anos. Kumar, Radha e Chitta (1998) aclimatizaram satisfatoriamente as plântulas de figueira ‘Gular’ utilizando inicialmente substrato artificial esterilizado por, aproximadamente, um mês e posteriormente, transferindo-as para solo natural, em que permaneceram por mais duas semanas até o transplântio para o campo.

Altura das mudas

Maior altura das mudas foi obtida com plântulas que permaneceram em meio de cultura sem reguladores de crescimento por 60 dias antes do transplântio para casa-de-vegetação e no substrato Plantmax[®] + Húmus (8,92 cm) ou Plantmax[®] (8,6 cm) (Figura 23). Embora a presença de húmus tenha reduzido a sobrevivência das plântulas de 60 dias, as que sobreviveram tiveram melhor desenvolvimento em relação às outras, provavelmente pela maior quantidade de nutrientes. Com os substratos Plantmax[®] + Vermiculita, Plantmax[®] + Húmus + Vermiculita e Húmus + Vermiculita verificou-se médias de 6,77, 6,87 e 6,97 cm, respectivamente, as quais não diferiram estatisticamente. Para as plântulas de 15, 30 e 45 dias, o substrato que proporcionou os melhores resultados foi o Plantmax[®], observando-se médias de 5,75; 7,85 e 7,8 cm, respectivamente.

De forma semelhante, Hoffmann (1999) observou maior altura das mudas de macieira (10,62 cm) utilizando o substrato Plantmax[®]. Calvete, Kämpf e Daudt (2000) relataram que a mistura de turfa + casca de arroz queimada + vermiculita + casca de acácia proporcionou 7,01 cm de altura após 40 dias de aclimatização de morangueiro.

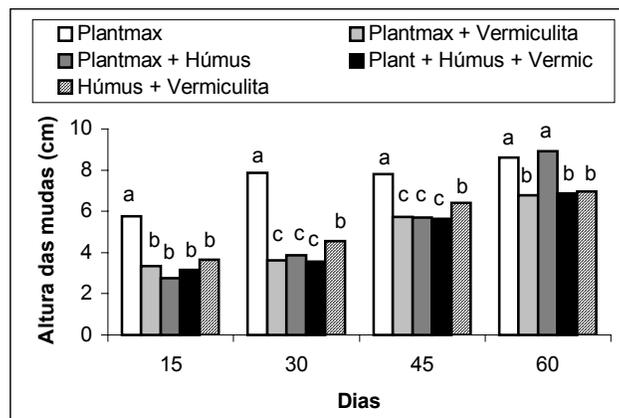


FIGURA 23. Altura de mudas de figueira em casa-de-vegetação em função de diferentes substratos e dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras, UFLA, 2002.

Peso da matéria fresca e seca da parte aérea

Os melhores resultados para peso de matéria fresca da parte aérea foram obtidos com plântulas de 30 (1,852 g), 45 (1,838 g) e 60 (1,816 g) dias de permanência em meio sem regulador de crescimento e com o substrato Plantmax[®] (Figura 24). De forma semelhante, os maiores pesos de matéria seca foram obtidos com plântulas de 30 (0,393 g), 45 (0,348 g) e 60 (0,358 g) dias e com o Plantmax[®] (Figura 25). Devido às boas características químicas e físicas do Plantmax[®], as plantas se desenvolveram adequadamente, resultando em

maior matéria fresca e seca da parte aérea. Segundo Hoffmann (1999), o Plantmax[®] apresenta características que favorecem o crescimento das mudas após emissão das raízes adventícias: as propriedades físicas (porosidade, textura, drenagem e baixa compactação) e químicas (presença de nutrientes e pH adequado ao desenvolvimento da muda).

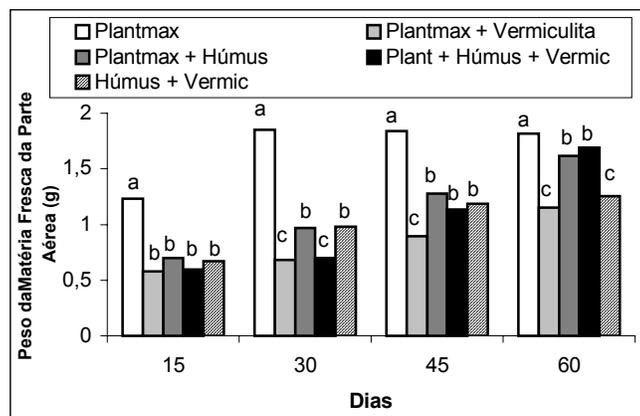


FIGURA 24. Peso da matéria fresca da parte aérea de figueira em casa-de-vegetação em função de diferentes substratos e dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras, UFLA, 2002.

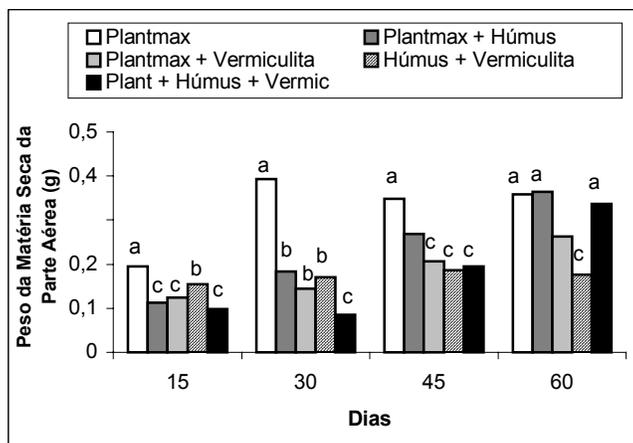


FIGURA 25. Peso da matéria seca da parte aérea de figueira em casa-de-vegetação em função de diferentes substratos e dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras, UFLA, 2002.

Os menores valores de matéria fresca e seca foram observados nas plântulas de 15 e 30 dias quando se utilizou húmus no preparo do substrato. É possível que a quantidade de nutrientes presente no húmus tenha sido elevada para desenvolvimento inicial devido ao reduzido tamanho dessas plântulas.

Calvete, Kämpf e Daudt (2000), testando diversos substratos, verificaram que o maior peso de matéria fresca (1,38 g) e seca (0,190 g) da parte aérea foi obtido com a mistura de turfa + casca de arroz queimada + vermiculita + casca de acácia.

Peso da matéria fresca e seca do sistema radicular

Para peso da matéria fresca do sistema radicular, a combinação de Plantmax® e plântulas que permaneceram por 30 dias em meio de cultura sem

reguladores de crescimento mostrou-se melhor, obtendo-se raízes com 1,738 g. Bons resultados também foram obtidos com o Plantmax[®] e plântulas de 45 (1,591 g) e 60 (1,596 g) dias (Figura 26).

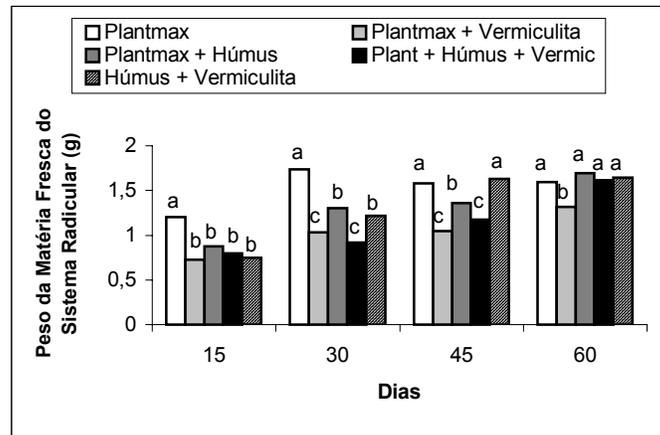


FIGURA 26. Peso da matéria fresca do sistema radicular de figueira em casa-de-vegetação em função de diferentes substratos e dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras, UFLA, 2002.

O maior peso de matéria seca do sistema radicular foi observado com plântulas de 45 dias e com o substrato Plantmax[®] + Húmus (0,224 g), porém não diferindo estatisticamente do Plantmax[®], que resultou em 0,213 g de raízes. Plântulas de 30 e 60 dias com o substrato Plantmax[®] também proporcionaram bons resultados, 0,219 e 0,186 g, respectivamente (Figura 27). Tais resultados comprovam a eficiência desse substrato para a formação inicial do sistema radicular e, conseqüentemente, da parte aérea das plantas.

Os menores valores observados com as plântulas de 15 dias se justificam uma vez que elas não apresentavam sistema radicular quando transplantadas

para os substratos, o que não ocorreu com as demais, embora as de 30 dias tivessem apresentado poucas raízes.

Calvete, Kämpf e Daudt (2000) citam que não houve efeito dos diferentes substratos no peso da matéria seca da raiz de morangueiro.

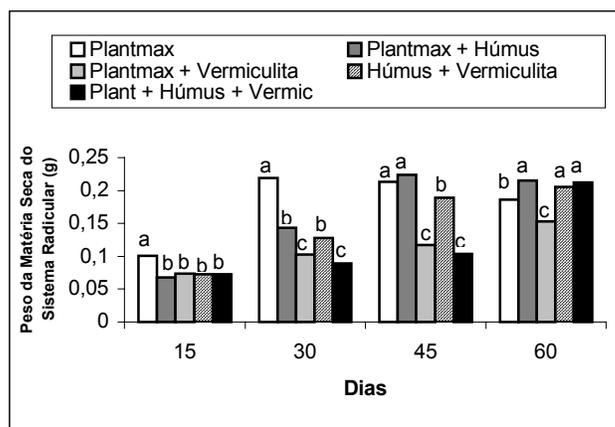


FIGURA 27. Peso da matéria seca do sistema radicular de figueira em casa-de-vegetação em função de diferentes substratos e dias de permanência das plântulas em meio de cultura sem regulador de crescimento. Lavras, UFLA, 2002.

Para todas as variáveis, observou-se que as plântulas cultivadas por 30 dias em meio de cultura WPM isento de reguladores de crescimento já apresentavam bons resultados na aclimatização em relação às plântulas com 45 e 60 dias. O substrato Plantmax[®] apresentou bons resultados, embora alguns outros não tenham diferido estatisticamente deste. Porém, a facilidade de aquisição e a redução dos custos são fatores preponderantes na escolha do Plantmax[®] como substrato para aclimatização da figueira.

4.5 Aspectos da anatomia foliar de plântulas micropropagadas, aclimatizadas e plantas adultas.

A partir de seções transversais das folhas de plantas estabelecidas no campo, observa-se que a lâmina foliar de *Ficus carica* possui organização dorsiventral, é hipostomática e apresenta tricomas glandulares e tectores, distribuídos por toda a epiderme em ambas as faces. Como estrutura geral, em vista frontal, a epiderme adaxial e abaxial apresentam uma camada de células com parede sinuosas espessadas. O parênquima paliçádico é bisseriado e constituído por células de formato alongado e o parênquima esponjoso possui de 5 a 6 camadas.

Verifica-se que existem diferenças anatômicas entre as plântulas cultivadas nos diferentes ambientes. As dimensões dos tecidos foliares, o número de estômatos e seu diâmetro polar e equatorial foram influenciados pelos diferentes tratamentos (Tabelas 14 e 15).

TABELA 14. Análise de variância para espessura da epiderme adaxial (EAD) e abaxial (EAB), parênquima paliçádico (PP) e esponjoso (PE) e limbo (EL) foliar de *Ficus carica*. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios				
		EAD	EAB	PP	PE	EL
Tratamentos	4	259,046**	21,696**	5948,22**	1325,99**	17801,112**
Erro	20	1,9359	0,1483	1,3281	3,672	8,6681
CV (%)		6,53	3,31	2,98	5,16	2,71

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

TABELA 15. Análise de variância para número de estômatos (NE), diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) de folhas de *Ficus carica*. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		NE	DP	DE
Tratamentos	4	79913,76**	65,578**	33,318**
Erro	45	826,246	2,881	2,416
CV (%)		14,68	6,89	8,94

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

Observa-se, na Tabela 16, que os resultados de espessura da epiderme adaxial e abaxial variam de acordo com os tratamentos. Verifica-se que até os 20 dias de aclimatização não há diferença estatística na epiderme adaxial em relação às plântulas *in vitro*. Aos 40 dias de aclimatização observa-se aumento na espessura, porém não diferindo das plantas com 60 dias. A epiderme abaxial é menos espessa nas plântulas *in vitro* e não difere estatisticamente aos 20 e 40 dias de aclimatização, mas aos 60 dias a espessura está próxima da observada no campo (Figuras 28A, B, C, D e E).

TABELA 16. Espessura média (μm) dos tecidos epidérmicos, parênquima paliçádico e esponjoso e do limbo foliar de *Ficus carica* nos diferentes tratamentos. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Tratamentos	Epiderme	Epiderme	Parênquima	Parênquima	Espessura do limbo
	Adaxial	Abaxial	paliçádico	esponjoso	
<i>In vitro</i>	15,375 c	10,000 d	15,250 d	21,500 d	62,125 e
20 dias	16,375 c	10,375 c	23,625 c	32,125 c	82,500 d
40 dias	19,875 b	10,750 c	26,875 b	32,125 c	89,625 c
60 dias	21,498 b	12,001 b	28,000 b	35,249 b	96,745 b
Campo	33,375 a	15,125 a	99,750 a	64,750 a	213,00 a

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

A excessiva perda de água, que contribui para dessecação das mudas após a transferência para a casa-de-vegetação, tem sido atribuída a diversas características induzidas pelas condições *in vitro*, como a pobre formação de ceras epicuticulares, aliada à alteração na composição química das mesmas. Nota-se, na Figura 28D, que aos 60 dias as folhas formadas *ex vitro* possuem anatomia de transição e cutícula mais espessada, podendo refletir em maior eficiência fotossintética. Este incremento na espessura, observado com o aumento dos dias de aclimatização, pode ser útil para evitar a perda excessiva de água, que contribui para a dessecação das plântulas após a transferência para o campo.

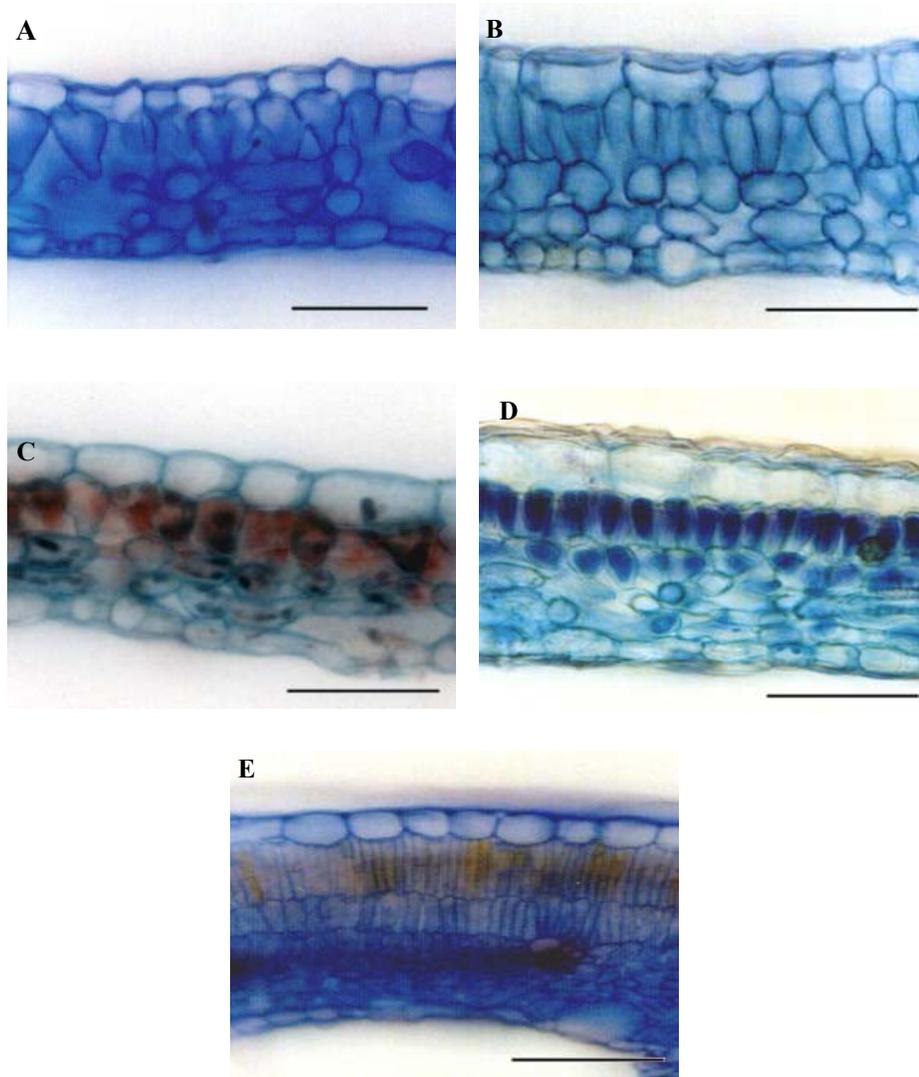


FIGURA 28. Secções transversais da folha de *Ficus carica* 'Roxo de Valinhos' de plantas *in vitro* (A), com 20 (B), 40 (C) e 60 (D) dias de aclimatização e cultivadas no campo (E). As barras nas figuras correspondem a 50 μm . UFLA, Lavras-MG, 2002.

As plantas já estabelecidas no campo apresentam ambas epidermes mais espessas, provavelmente por estarem mais expostas às condições climáticas, principalmente à maior intensidade luminosa, o que pode ser útil para refletir a irradiância excessiva. A espessura do limbo foliar também foi maior nas plantas cultivadas no campo (Tabela 16). Segundo Nobel (1977), o aumento no nível de luz proporciona aumentos na espessura das folhas.

Observou-se em todos os tratamentos, a presença de tricomas glandulares e tectores por toda a extensão da epiderme, em ambas faces. Resultado semelhante foi registrado por Fidelis (1998) com *Brosimum guadichaudii*, comparando o cultivo *in vitro* e *in vivo*, porém a quantidade de tricomas foi maior *in vitro*.

No estudo da epiderme abaxial em vista frontal, observam-se suas características nos diferentes ambientes (Figura 29A, B, C, D e E). Nota-se que, *in vitro* e aos 20, 40 e 60 dias de aclimatização, as células possuem paredes sinuosas mais acentuadas que das plantas cultivadas no campo.

O número de estômatos variou de acordo com os diferentes tratamentos (Tabela 17).

TABELA 17. Número médio de estômatos/mm² e diâmetro polar e equatorial (µm) de folhas de *Ficus carica* nos diferentes tratamentos. UFLA, Lavras-MG, 2002.

Tratamentos	Número de estômatos	Diâmetro polar	Diâmetro equatorial
<i>In vitro</i>	206,706 b	22,328 b	17,991 a
20 dias	197,826 b	22,812 b	18,473 a
40 dias	130,239 c	27,390 a	18,152 a
60 dias	107,703 c	23,213 b	14,135 b
Campo	336,453 a	27,459 a	18,176 a

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

No estudo da epiderme abaxial, verifica-se número máximo de estômatos nas plantas propagadas no campo (Figura 29E), seguido das plântulas *in vitro* e com 20 dias de aclimatização. As plantas estabelecidas no campo realizam maior fotossíntese em relação às plantas em aclimatização e *in vitro*. Dessa forma, é necessário maior número de estômatos para que ocorram as trocas gasosas adequadamente. 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.

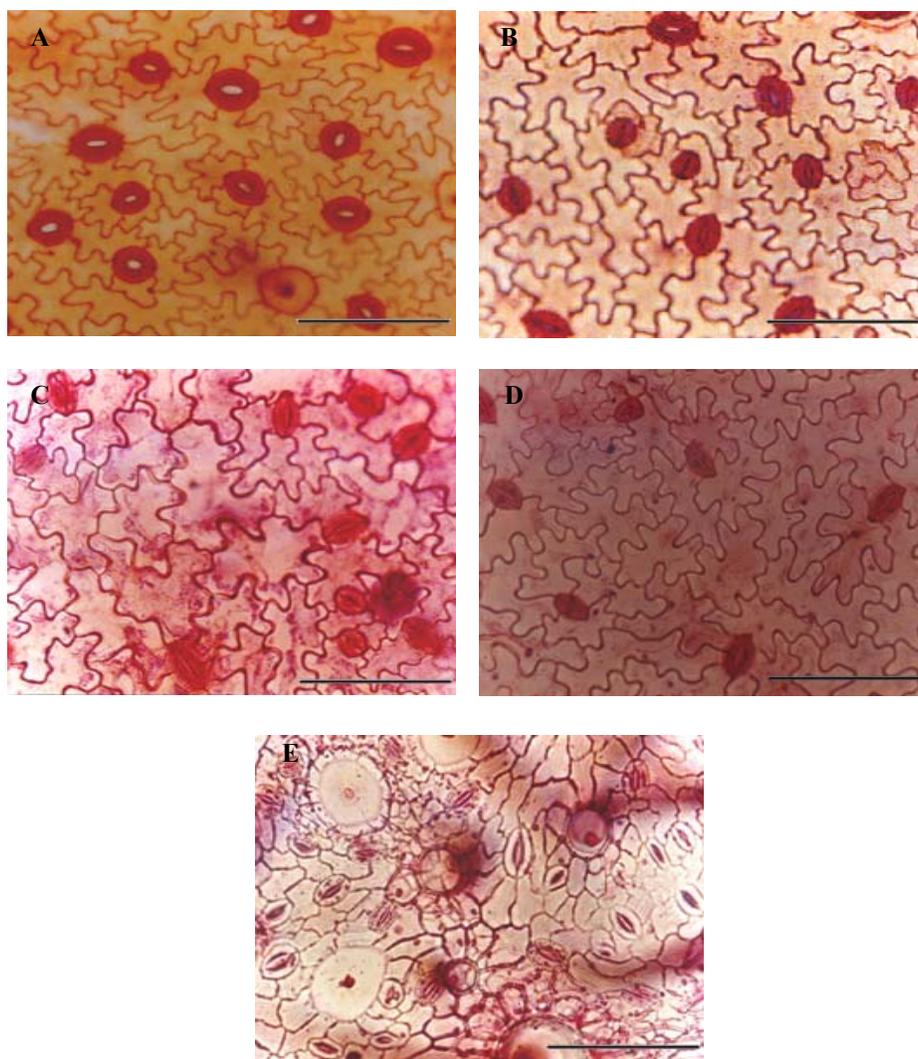


FIGURA 29. Secções paradérmicas da epiderme da face abaxial da folha de *Ficus carica* 'Roxo de Valinhos' de plantas *in vitro* (A), com 20 (B), 40 (C) e 60 (D) dias de aclimatização e cultivadas no campo (E). As barras nas figuras correspondem a 50 μ m. UFLA, Lavras-MG, 2002.

É possível que o grande número de estômatos observado em plântulas *in vitro* (Figura 29A) seja provocado pelo ambiente existente nos recipientes. Como a intensidade luminosa e as trocas gasosas são baixas, os numerosos estômatos abertos provavelmente facilitam as trocas e aumentam a eficiência fotossintética. Porém, durante a aclimatização dessas plantas, o grande número de estômatos favorece o excesso de transpiração porque, em muitas espécies, ainda não possuem a capacidade de abertura e fechamento regulados, requerendo maiores cuidados na fase inicial desta etapa. De acordo com Capellades et al. (1990), o período de aclimatização *ex vitro* permite a redução na frequência de estômatos, altera o formato e a topografia destes e, de maneira geral, favorece os diversos parâmetros foliares. Os mesmos autores conseguiram reduzir o número de estômatos reduzindo a umidade relativa e aumentando a intensidade luminosa durante o cultivo *in vitro*. O aumento na frequência de estômatos, a sua localização mais superficial na epiderme das folhas e a deficiência no mecanismo de fechamento estomático das plântulas *in vitro* podem aumentar a perda de água, o que contribui para a dessecação das mudas após a transferência para a casa-de-vegetação.

Houve redução no número de estômatos nas plantas durante a aclimatização (Figuras 29B, C e D). No transplântio, o estresse hídrico das plântulas é, geralmente, o maior problema. Embora as plântulas sejam aparentemente perfeitas, apresentam uma série de deficiências anatômicas induzidas pela condição *in vitro*, o que dificulta o controle da transpiração, permitindo rápida perda de água. Provavelmente, a redução do número de estômatos está relacionada com a redução da perda de água para que as plantas consigam se adaptar e se desenvolver nas novas condições ambientais.

Resultados divergentes foram observados por vários autores com diferentes espécies. O número de estômatos por mm² foi maior em plântulas de macieira (Blanke e Belcher, 1989) e roseira (Capellades et al., 1990), porém

menor em ameixeira (Brainerd et al., 1981), se comparado ao das plantas em casa-de-vegetação. Conner e 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.

Observa-se, na Tabela 17, que os maiores diâmetros polares foram verificados nas plantas cultivadas no campo (Figura 29E) e com 40 dias de aclimatização (Figura 29C), seguidas das plântulas *in vitro* (Figura 29A) com 20 e 60 dias de aclimatização (Figuras 29B e D, respectivamente). Para diâmetro equatorial, apenas as plantas com 60 dias de aclimatização diferiram estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando menor média. Resultados semelhantes foram observados por Sutter e Langhans (1979) ao observarem que os estômatos das plantas *in vitro* de craveiro se assemelham aos das plantas em casa-de-vegetação. Porém, para espécies de framboeseira, macieira e roseira micropropagadas, os estômatos adquiriram formato arredondado e são maiores se comparados ao formato elíptico normalmente observado nas plantas cultivadas *in vivo* (Donnelly e Vidaver, 1984a; Blanke e Belcher, 1989 e Capellades et al., 1990). Entretanto, Capellades et al. (1990) observaram que os estômatos apresentavam formato elíptico semelhante ao observado em plantas propagadas convencionalmente ao reduzirem a umidade relativa para 75% e aumentarem a intensidade luminosa para $80 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

As plântulas *in vitro* apresentam pouca diferenciação do mesofilo foliar e alta proporção de espaços intercelulares em relação às demais plantas (Tabela 16) (Figura 28A), podendo contribuir para excessiva perda de água. Apenas as plantas já estabelecidas no campo apresentam duas camadas de parênquima paliçádico (Figura 28E). A adição ou alongamento das células do parênquima paliçádico é proporcionada pelo aumento do nível de luz e está relacionada à redução na resistência do mesofilo ao dióxido de carbono (Nobel, 1977). Nas plantas aclimatizadas, observa-se que este tecido já se encontra mais desenvolvido em relação às plântulas *in vitro*, principalmente as de 60 dias, em que a segunda camada começa a ser formada (Figuras 28B, C e D), embora ao compará-las às plantas do campo perceba-se grande diferença nos tecidos estudados. As plantas com 40 e 60 dias de aclimatização não diferiram entre si quanto à espessura deste tecido.

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. Brainerd e Fuchigami (1981) verificaram apenas uma camada de células paliçádicas nas folhas de brotações de ameixeira micropropagada, ao invés 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, Sutter e Dunston (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 várias camadas de parênquima paliçádico e, com o aumento do tempo, as folhas jovens tornaram-se

similares àquelas crescidas no campo. Entre outras espécies em que somente uma camada de células paliçádicas foi formada *in vitro* estão framboeseira (Donnelly e Vidaver, 1984a), morangueiro (Fabbri, Sutter e Duston, 1986) e cafeeiro (Santos, 2001), apresentando-se mais curtas e não alongadas conforme característica das células paliçádicas de plantas crescidas na casa-de-vegetação ou campo. Fidelis (1998) observou que o mesofilo *in vitro* de *Brosimum guadichaudii* é formado de três a quatro estratos de células, mas sem diferenciação no formato.

In vitro observam-se duas camadas de células do parênquima esponjoso, com menor espessura em relação aos demais tratamentos (Tabela 16) e alta proporção de espaços intercelulares (Figura 28A). É possível que a grande quantidade de espaços intercelulares tenha como função o aumento da eficiência fotossintética através do intercâmbio gasoso, devido à baixa intensidade luminosa nos recipientes de cultivo. De acordo com Cutter (1986) e Sert (1992), plantas submetidas a baixas intensidades luminosas possuem maior proporção dos espaços intercelulares no tecido esponjoso, tornando este parênquima mais difuso. Resultados semelhantes foram observados por Fidelis (1998) para mama-cadela, enquanto Santos (2001) cita que observou 5 a 6 camadas de células do parênquima esponjoso para a cultivar Rubi e 4 camadas para a cultivar de cafeeiro Apoatã.

De acordo com a Tabela 16, verifica-se aumento do parênquima esponjoso nas folhas das plantas aclimatizadas, sendo que aos 20 e 40 dias não se constatou diferença significativa (Figuras 28B, C e D). Maior espessura foi observada nas plantas propagadas no campo, diferindo também dos demais tratamentos por apresentarem células compactadas (Figura 28E). Fidelis (1998) também observou duas camadas de parênquima esponjoso compactado nas plantas de mama-cadela *in vivo* quando comparadas às plantas cultivadas *in vitro*. Santos (2001) verificou que as plantas de cafeeiro propagadas no campo

apresentavam oito e de nove a dez camadas de parênquima esponjoso para as cultivares Rubi e Apoatã, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

A adição de carvão ativado inibe a multiplicação das brotações da figueira ‘Roxo de Valinhos’.

As brotações obtidas com a utilização do BAP são pequenas, com grande quantidade de calos e, em concentrações mais altas, apresentam-se vitrificadas.

Com a utilização de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cinetina e 100% do meio WPM obtêm-se brotos maiores e bem formados.

O GA_3 diminui a formação e multiplicação dos brotos e induz estiolamento, vitrificação, clorose e necrose apical das plântulas.

Plântulas cultivadas por 30 dias em meio WPM sem reguladores de crescimento apresentam bom desenvolvimento em substrato Plantmax[®] durante a aclimatização.

Plântulas *in vitro* possuem os tecidos foliares pouco diferenciados e grande número de estômatos.

Durante a fase de aclimatização há redução no número de estômatos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, A. *In vitro* shoot differentiation in *Eucalyptus citriodora* Hook: effect of activated charcoal. **Indian Journal Forest**, Pradeshm v. 8, p. 340-341, 1985.

AMIN, M. N.; JAISWAL, V. S. Rapid clonal propagation of guava through in vitro shoot proliferation on nodal explants of mature trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 235-243, 1987.

ANAGNOSTAKIS, S. L. Haploid plants from anthers of tobacco – Enhancement with charcoal. **Planta**, Berlin, v. 115, n. 3, p. 281-283, 1974.

ANDERSON, W. C. Tissue culture cultivation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 20, p. 112-113, 1980.

ANJOS SOBRINHO, A. dos.; PASQUAL, M.; PAIVA, P. D. de. O. Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o desenvolvimento “in vitro” de gemas apicais de figo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15. , 1998, Poços de Caldas. **Resumos. . .** Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1998. p. 347.

ARENA, L. M. E.; PASTUR, G. M. 6-benzylaminopurine and activated charcoal affect in vitro shoot morphogenesis of *Berberis buxifolia*. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Buenos Aires, v. 21, n. 1, p. 41-47, 2001.

BAPAT, V. A.; MHATRE, M.; RAO, P. S. Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoots buds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, n. 5, p. 393-395, Oct. 1987.

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; MARTINS, F. P.; BOVI, V.; CASTRO, J. L. de. Produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos' através da cultura *in vitro*. **O agrônomo**, Campinas, v. 44, n. 1,2,3, p. 6-18, jan./dez. 1992.

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.

BEYL, C. A. Getting started with tissue culture – media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.).

Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. London: CRC Press, 2000. p. 21-38.

BHANSALI, R. R. Bud culture for shoot multiplication and plantlet formation of *Tecomella undulata* (rohida), a woody tree of the arid zone. **Tropical Science**, London, v. 33, n. 1, p. 1-8, Mar. 1993.

BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KÄMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro ‘Ouro Verde’ a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, jul. 1994.

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.

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. H. *In vitro* root formation in *Anacardium occidentale* microshoots. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 44, n. 2, p. 175-179, 2001.

BON, M. C.; GENDRAUD, M.; FRANCKET, A. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 34, n. 3-4, p. 283-291, 1988.

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.

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

BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’**. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.

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.

CAMPOS, V. P. Nematóides na cultura da figueira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 188, p. 33-38, 1997.

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.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119 p. (Tese – Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

COMPTON, M. E.; PREECE, J. E. Effects of phenolic compounds on tobacco callus and blackberry shoot cultures. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 160-163, Jan. 1988.

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.

CONSTANTIN, R.; HENKE, R.; MANSUR, M. A. Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. **In Vitro**, Largo, v. 13, n. 5, p. 293-296, 1977.

CORRÊA, D. de M. **Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.)**. 1990. 50 p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: Parte II: órgãos, experimentos e interpretações**. São Paulo: Rocca, 1986. 336 p.

DAMIANO, C. Il carbone attivo nella coltura *in vitro* della fragola. **Frutticoltura**, Genn, v. 40, n. 1, p. 49-50, 1978.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. p. 183-184.

- DEBERGH, P. C.; DE WAEL, J. Mass propagation of *Ficus lyrata*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 78, p. 361-364, 1977.
- DEBERGH, P. C.; MAENE, L. V. Pathological and physiological problems related to in vivo culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v. 40, p. 69-75, 1984.
- DECCETTI, S. F. C. **Propagação in vitro de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DE FOSSARD, R. A.; BENNETT, M. T.; GORST, J. R.; BOURNE, R. A. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Dordrecht, v. 28, p. 427-435, 1978.
- DEMIRALAY, A.; YALCIN-MENDI, Y.; AKA-KACAR, Y.; CETINER, S.; AKSOY, U.; FERGUSON, L.; HEPAKSOY, S. *In vitro* propagation of *Ficus carica* L. var. Bursa Siyahi through meristem culture. **Acta Horticulturae**, Wageningenn. 480, p. 165-167, 1998.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 120, n. 3, p. 435-440, May 1995.
- DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 2, p. 127-134, 1997.
- DONNELLY, D. J.; SKELTON, F. E. Hydathode structure of micropropagated plantlets and greenhouse-grown 'Totem' strawberry plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, p. 755-759, Sept. 1987.
- DONNELLY, D. J.; SKELTON, F. E.; NELLES, J. E. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 3, p. 566-569, May 1987.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984a.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Pigment content and gas exchanged of red raspberry “in vivo” and “ex vitro”. **Journal of American Society for Horticulture Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 177-181, Mar. 1984b.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, 1985.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 157-162, Mar. 1993.

EINSET, J. W. A practical guide to woody plant micropropagation. **Arnoldia**, Jamaica Plain, v. 46, n. 1, p. 36-44, 1986.

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.

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.

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

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

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 37, n. 4, p. 471-475, July/Aug. 2001.

FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: absorption of metabolites

inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 2, p. 104-106, 1978.

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

GASPAR, T. H.; PENEL, C.; CASTILLO, F. J.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acids peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 64, n. 3, p. 418-423, 1985.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – The Technology**, 2 ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture – handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984. 593 p.

GOMES, G. A. C. **Propagação in vitro de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GOULD, J. H.; MURASHIGE, T. Morphogenic substances released by plant tissue cultures. I. Identification of berberine in *Nandina* culture medium, morphogenesis and factors influencing accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 29-42, 1985.

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

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. **Annal Botany**, London, v. 42, n. 180, p. 993-995, 1978.

GROUT, B. W. W.; ASTON, M. J. Transplantin of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, Edingurgh, v. 17, n. 1, p. 1-7, 1977.

GUERRA, M. P.; COSTA, R. M. B. F. L. da. **Micropropagação da figueira ‘Roxo de Valinhos’, através da cultura de meristemas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9. , 1987, Campinas. **Anais. . .** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v. 2, p. 465-467.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae). **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n. 7, p. 550-552, Dec. 1988.

GUNVER, G.; ERTAN, E.; AKSOY, U.; FERGUSON, L.; HEPAKSOY, S. A study on the propagation of figs by the tissue culture techniques. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 480, p. 169-172, 1998.

HAELTERMAN, R. M.; DOCAMPO, D. M. *In vitro* propagation of mosaic-free fig (*Ficus carica* L.) cultivars, using thermotherapy and shoot tip cultures. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, Buenos Aires, v. 25, n. 3, p. 15-22, 1994.

HARBAGE, J. F.; STIMART, D. P.; EVERT, R. F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. ‘Gala’. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 5, p. 680-688, Sept. 1993.

HAZRA, S.; KULKARNI, A.; BANERJEE, A. K.; DHAGE, A. B.; AGRAWAL, D. C.; KRISHNAMURTHY, K. V.; NALAWADE, S. M. A rapid and simple method for *in vitro* plant regeneration from split embryo axes of six cultivars of cotton. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 317-319, 2002.

HERBERLE-BORS, E. Interaction of activated charcoal and iron chelates in anther culture of *Nicotiana* and *Atropa belladonna*. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 99, n. 4, p. 339-347, 1980.

HICKS, G. S. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 9, p. 1913-1920, Sept. 1987.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’**. 1999. 240 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ZAMAN, A.; JOARDER, O. I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 10, p. 522-524, Sept. 1992.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.

JAISWAL, V. S.; NARAYAN, P. Regeneration of plantlets from the somatic tissue of some Indian trees. **Proceedings National Symp Advances Front Plant Science**, Jodhpur, p. 138-139, 1983.

JOHANSSON, L.; CALLEBERG, E.; GEDIN, A. Correlation between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultures of anthers of *Anemone Canadensis*. **Physiology Plant**, copenhagen, v. 80, n. 2, p. 243-249, 1990.

JONA, R.; GRIBAUDO, I. Adventitious bud formation from leaf explants of *Ficus lyrata*. **HortScience**, Madison, v. 22, n. 4, p. 651-653, 1987.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L. Formación de raíces en entrenudos de higuera (*Ficus carica* L. cv. Adriatic) cultivados in vitro. **Ciencia Investigaciones Agrícolas**, Buenos Aires, v. 7, n. 2, p. 149-151, 1980.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 207-215, July 2001.

KÄMPF, A. N. Seleção de materiais para uso como substrato. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas – a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 139-145.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

KEVERS, C.; PRAT, R.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content, **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 59-66, 1987.

KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acids and adenini sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 38, n. 157, p. 795-802, 1974.

KOWALSKI, B.; STADEN, J. van. Micropropagation of *Podocarpus henkelii* and *P. elongates*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 67, n. 2, p. 362-366, July 2001.

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

KUMAR, V.; RADHA, A.; CHITA, S. K. *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. Gular) using apical buds from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, n. 9, p. 717-720, June 1998.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 237-257, 1961.

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Maryland, v. 78, n. 3, p. 637-941, July 1985.

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* – and *in vivo* – developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x 97**. 1995. 50 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures *Annona squamosa* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 5, p. 721-728, Sept. 1996.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, June 1980.

MAIORANO, J. A.; ANTUNES, L. E. C.; REGINA, M. A. de.; ABRAHÃO, E.; PEREIRA, A. F. Botânica e caracterização de cultivares da figueira. Informe **Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 188, p. 22-24, 1997.

MAKINO, R. K.; NAKANO, R. T.; MAKINO, P. J.; MURASHIGE, T. Rapid cloning of *Ficus* cultivars through application of *in vitro* methodology. **In vitro**, Largo, v. 13, n. 3, p. 169, 1977.

MARÍN, J. A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annal Botany**, London, v. 62, n. 6, p. 663-670, Dec. 1988.

MEDEIROS, A. R. M. de. **A cultura da figueira**. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1987. 20 p. (EMBRAPA-CNPFT. Circular Técnica, 13).

MILLER, D. Weaning and growing-on of micropropagated plants. **Comb Proc Intl Plant Propagation Soc.**, v. 33, p. 253-256, 1983.

MINAMI, K. Adubação em substrato. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas – a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 147-152.

MISHRA, M.; SAXENA, R. P.; PATHAK, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chambattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, Dec. 1999.

MHATRE, M.; BAPAT, V. A.; RAO, P. S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 4, n. 2, p. 78-80, 1985.

MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Largo, v. 37, n. 2, p. 204-205, Mar./Apr. 2001.

MUNHOZ, A. B.; ENCINA, C. L.; PÉREZ, E. S.; ALFARO, F. P. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 11-17, 1999.

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.

MURITHI, M.; RAGAN, T. S. WAITE, B. H. *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. **HortScience**, Alexandria, v. 17, p. 86-87, Feb. 1982.

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.

NOBEL, P. S. Internal leaf area and cellular CO₂ resistance: photosynthetic implication of variations with grown conditions and plant species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 40, p. 137-144, 1977.

NOBRE, J.; ROMANO, A.; AKSOY, U.; FERGUSON, L.; HEPAKSOY, S. *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 480, p. 161-164, 1998.

NORMAH, M. N.; NOR-AZZA, A. B.; ALIUDIN, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 291-294, Dec. 1995.

NOVAK, F. J.; JUVOVA, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 231-240, 1983.

ORLANDER, G.; DUE, K. Location of hydraulic resistance in the soil-plant pathway in seedlings of *Pinus sylvestris* L. grown in peat. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 16, n. 1, p. 115-28, Feb. 1986.

PAIVA, P. D. O. de. **Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no**

- meio de cultura.** 1998. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PAN, M. J.; STADEN, J. van. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 155-163, Dec. 1998.
- PASQUAL, M. **Meios de cultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.
- PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 212, p. 245-252, 1987.
- PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree *Morus australis* Poir. syn *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, n. 11, p. 841-845, Aug. 1996.
- PEIXOTO, P. H. P. **Micropropagação e termoterapia *in vitro* do porta-enxerto de videira ‘1103 Paulsen’.** 1990. 94 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PENTEADO, S. R. O cultivo da figueira no Brasil e no Mundo. In: CORRÊA, L. S. de.; BOLIANI, A. C. (Ed.). **Cultura da figueira - do plantio à comercialização.** Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p. 1-16.
- PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; MORAES, R. M.; FRANCA, S. C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 17-21, abr. 2000.
- PEREIRA, F. M. **Cultura da figueira.** Piracicaba: Livroceres, 1981. 73 p.
- PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Botânica, biologia e cultivares de figueira. In: CORRÊA, L. S. de.; BOLIANI, A. C. (Ed.). **Cultura da figueira - do plantio à comercialização.** Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p. 25-35.
- PHAN, C. T.; LETOUZÉ, R. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained “in vivo”. **Plant Science Letters**, Clare, v. 31, n. 2/3, p. 323-327, 1983.
- PIERIK, R. L. M. Handicaps for the large escale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 230, p. 63-71, 1988.

- POCOCK, S. Procedures and problems associated with the transfer of tissue-cultured plants. **Comb Proc Intl Plant Propagation Soc.**, v. 33,, p. 316-320, 1983.
- PONTIKIS C. A.; MELAS P. Micropropagation of *Ficus carica* L. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 153-154, Feb. 1986.
- PREECE, J. E.; COMPTON, M. E. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry** 17 High-Tech and Micropropagation I. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 168-189.
- PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.
- QADEER, R.; HANIF, J.; SALEEM, M. A.; AFZAL, M. Characterization of activated charcoal. **Journal Chemical Society Pakistan**, Karachi, v. 16, n. 4, p. 229-235, dec. 1994.
- QI-GUANG, Y.; READ, P. E.; FELLMAN, C. D.; HOSIER, M. A. Effect of cytokinin, IBA and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 133-134, Feb. 1986.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 437-422, 1977.
- READ, P. E.; FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, wageningen, n. 166, p. 15-20, 1985.
- RIGITANO, O. **Instruções para cultura da figueira**. Campinas: IAC, 1964. 30 p.
- RIBEIRO, I. J. A. Doenças da figueira. In: CORRÊA, L. S. de.; BOLIANI, A. C. (Ed.). **Cultura da figueira - do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p. 151-164.
- RIPLEY, K. P.; PREECE, J. E. Micropropagation of *Euphorbia Lathyris* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dodrdrecht, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1986.

RODRIGUES, L. R.; FIOR, C. S. Substrato para aclimatização ex vitro de canela-sebo, *Persea venosa* Nees et Martius ex Nees. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas – a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 2271-276.

ROSATI, P.; MARINO, G.; SWIERCZEWSKI, C. *In vitro* propagation of japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 105, n. 1, p. 126-129, Jan. 1980.

ROY, G. M. Agriculture. In: _____. **Activated carbon applications in the food and pharmaceutical industries**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1995, cap. 3, p. 19-42.

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

SANTOS, dos. J. M.; MAIA, A. S. Nematóides da figueira (*Ficus carica* L.). In: CORRÊA, L. S. de.; BOLIANI, A. C. (Ed.). **Cultura da figueira - do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p. 135-149.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 70, n. 2, p. 221-228, Mar. 1995.

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

SERT, M. A. **Anatomia foliar e teores de clorofila em três variedades de soja [*Glycine max* (L.) MEDRILL] e dois níveis de radiação solar**. 1992. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SHA, L.; McCOWN, B. H.; PETERSON, L. A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 5, p. 631-634, Sept. 1985.

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.

SILVA, C. R. de R. Produção de figueira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 102, p. 30, jun. 1983.

SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760 p.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SPURR, S. H.; BARNES, B. Y. **Forest Ecology**. New York: The Ronald Press, 1973. 571 p.

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

SUTTER, E. G. 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 carnation 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.

SUTTER, E. G.; LUZA, J. Developmental anatomy of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Malus pumila* 'M-26' shoots grown in vitro. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 154, n. 1, p. 59-67, Mar. 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Auxins: Growth and Tropisms. In: _____. **Plant Physiology**. California: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 1991. cap. 16, p. 398-424a.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Cytokinins. In: _____. **Plant Physiology**. California: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 1991. cap. 17, p. 452-471b.

TAKAYARNA,S.; MISAWA, M. Differentiation in *Lilium* bulb scales *in vitro*. Effect of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 121-125, 1980.

THAKUR, M.; SHARMA, D. R.; KANWAR, K. Mass micropropagation of *Alnus nepalensis* D. Don. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 51, n. 2, p. 123-127, 2001.

TE-CHATO, S.; LIM, M. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 291-298, Dec. 2000.

WANG, P. J.; HUANG, L. C. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. **In Vitro**, Largo, v. 12, n. 3, p. 260-262, 1976.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G. G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Jena, v. 89, n. 2, p. 141-147, 1978.

WEBB, D. T.; FLINN, B. S.; GEORGIS, W. Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 18, n. 12, p. 1570-1580, Dec. 1988.

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal Botany**, New York, v. 69, n. 10, p. 1579-1586, Oct. 1982.

YOUMBI, E.; BENBADIS, A. Régénération *in vitro* de plants à partir des bourgeons axillaires et de l'apex de plantules sexuées de *Dacryodes edulis* (Don) Lam. **Fruits**, Paris, v. 56, n. 5, p. 333-343, 2001.

YUI, E. **Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.)**. 1990. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J.; ISHIDA, J. S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do

porta-enxerto de macieira M-7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 597-602, mar. 1993.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 120, p. 217-222, 1981.

ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**, Butterworths: London, 1986. p. 187-196.

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

ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A. H. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets “in vivo”. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 2, n. 1, p. 55-60, 1983.