

**LUZ E SACAROSE NA
MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA
'PRATA ANÃ': ALTERAÇÕES
MORFOANATÔMICAS**

HERMINIO SOUZA ROCHA

2005

HERMINIO SOUZA ROCHA

**LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DA
BANANEIRA ‘PRATA ANÃ’: ALTERAÇÕES
MORFOANATÔMICAS.’**

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. Dr. Carlos Ramirez de Rezende e Silva

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

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

Rocha, Hermínio Sousa

Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”:
alterações morfoanatômicas / Hermínio Sousa Rocha. —Lavras :
UFLA, 2005.

98 p. : il.

Orientador: Carlos Ramirez de Rezende e Silva.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Musa sp. 2. In vitro. 3. Protocolo. 4. Aclimatização. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-
634.77223

HERMINIO SOUZA ROCHA

**LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DA BANANEIRA
'PRATA ANA': ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS**

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 17 de fevereiro de 2005

Prof. Dr. Moacir Pasqual - UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA

Dr. Sebastião Oliveira e Silva - EMBRAPA

Prof. Dr. Carlos Ramirez de Rezende e Silva
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Herminio e Neyde, que sempre me apoiaram
e me encorajaram a seguir em frente e lutar pelo sucesso.

À minha esposa Jane, pelo amor, incentivo e companheirismo e
aos meus queridos filhos Fernanda e Pedro que são
os amores de minha vida,

DEDICO

Aos meus queridos Paulo, Diva, Gustavo e Alípio,
à minha querida irmã Virgínia,
aos amigos

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo auxílio, pela constante presença e incentivo em todos os momentos difíceis.

A Nossa Senhora pela ajuda e acompanhamento de meus passos.

Ao meu São Judas Tadeu, que sempre me atendeu em minhas preces, e sempre me auxiliou nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ramirez de Rezende e Silva, pela valiosa contribuição e segurança que sempre me transmitiu nos momentos e incertezas.

Ao Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro, meu grande amigo, que me recebeu de braços abertos para sugerir, orientar e auxiliar-me na área da Anatomia Vegetal.

Ao grande amigo Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, que sempre me incentivou e me proporcionou os maiores progressos profissionais na minha carreira.

Ao Prof. Dr. Samuel Pereira de Carvalho, pelo inegável apoio e ensinamentos no decorrer do curso de mestrado, e pelos incentivos que sempre me foram de grande valia.

Ao Prof. Dr. Moacir Pasqual, pela oportunidade de poder trabalhar no Laboratório de Cultura de Tecidos, sob sua coordenação, pelo exemplo de profissionalismo e pela constante simplicidade e espírito de equipe.

Ao Adriano Bortolotti da Silva, pelo inegável apoio, sugestões e acompanhamento no decorrer de todo o trabalho.

Ao meu grande amigo Sérgio Parreiras Pereira, pelo acompanhamento dos trabalhos estatísticos, companhia nos estudos e torcida para que tudo sempre desse certo em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, pelo suporte técnico e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

À CAMPO – CPA, pela oportunidade de me liberar para poder cursar o mestrado.

Aos meus queridos Paulo, Diva, Gustavo e Alípio pela incondicional amizade, amor, companheirismo, incentivo, e principalmente pelos belos exemplos de vida e simplicidade que sempre foram e serão. Serei eternamente grato por tudo o que fizeram por nós.

Ao meu grande amigo Jônio Marques, que sempre me incentivou e me apoiou nos momentos de incertezas.

Ao meu compadre e irmão Rodrigo Santana, pela incondicional amizade e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amigos Espeto, Lucas, Isabel, Sara, Francinelly e Girlene, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos caríssimos amigos Claret e Vantuil, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela assistência, amizade e presteza.

À amiga Aparecida Gomes de Araújo pelo inegável apoio e colaboração.

Aos amigos Marcelo e Mívea Vichiato, pelo auxílio e carinho.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em minha vida acadêmica e acreditaram na realização deste trabalho. À minha irmã Virgínia, pelas palavras de incentivo sempre.

À minha querida esposa e meus filhos do coração, pela companhia, compreensão e motivação em todos os instantes.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO POR TUDO!

BIOGRAFIA

HERMINIO SOUZA ROCHA, filho de Herminio Maia Rocha e Neyde Maria de Souza Rocha, nasceu em 7 de abril de 1967, na cidade de Itabuna – BA.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica, pela Escola Superior de Agricultura de Lavras – ESAL, no ano de 1994.

Ingressou na CAMPO – CPA, em 1994, no departamento de biotecnologia, tendo desde então se dedicado aos trabalhos de pesquisa, administração e comercialização de mudas micropropagadas, com maior ênfase para as culturas da bananeira e abacaxizeiro.

Em 1997, cursou durante seis meses, a especialização em biotecnologia, com ênfase na micropropagação de espécies lenhosas, no National Institute of Agrobiological Resources – NIAR, em Tsukuba, Japão.

Em 1998, assumiu a coordenação geral da Biofábrica do Centro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas – BA, por intermédio de uma cooperação técnica entre a Embrapa e a Campo – CPA.

Em fevereiro de 2003, ingressou no curso de mestrado em Agronomia/Fitotecnia, na Universidade Federal de Lavras – MG.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Importância da bananicultura.....	4
2.2 Principais métodos de propagação.....	5
2.2.1 Propagação Convencional.....	5
2.2.2 Micropropagação	6
2.3 Aclimatização	8
2.4 Efeitos do fator de luz no desenvolvimento <i>in vitro</i>	9
2.5 Efeitos do fator sacarose nos meios de cultura	11
2.6 Características anatômicas.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material vegetal	18
3.2 Extração das gemas e desinfestação do material	18
3.3 Meios de cultura e condições de incubação	19
3.4 Cultivo sob diferentes tipos de luz e concentrações de sacarose	20
3.5 Avaliação das características anatômicas das folhas das plântulas.....	24
3.6 Procedimentos Estatísticos	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Desenvolvimento fitotécnico	29
4.1.1 Número de brotações (NB)	29

4.1.2 Número de brotações maiores que 1 centímetro (NB > 1cm).....	32
4.1.3 Comprimento da parte aérea (CPA).....	33
4.1.4 Comprimento do sistema radicular (CSR).....	35
4.1.5 Massa fresca da parte aérea (MFPA).....	38
4.1.6 Massa fresca do sistema radicular (MFSR).....	39
4.1.7 Massa seca total (MST).....	40
4.2 Aspectos da anatomia foliar nos explantes <i>in vitro</i>	43
4.2.1 Anatomia foliar na posição P1.....	45
4.2.2 Espessura da epiderme superior (ES) na posição P1.....	52
4.2.3 Espessura da hipoderme (HP) na posição P1.....	53
4.2.4 Diâmetro do feixe vascular maior (DA) na posição P1.....	55
4.2.5 Diâmetro do feixe vascular menor (DE) na posição P1.....	57
4.2.6 Espessura do parênquima cortical (PC) na posição P1.....	58
4.2.7 Espessura da epiderme inferior (EI) na posição P1.....	60
4.2.8 Número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da seção transversal da lâmina foliar (NF) na posição P1.....	60
4.2.9 Espessura da camada de fibras perivasculares (esclerênquima - EC) na posição P1 (nervura mediana).....	64
4.2.10 Espessura total da seção transversal da lâmina foliar (ET) na posição P1 (nervura mediana).....	64
4.2.11 Anatomia foliar na posição P2.....	66
4.2.12 Espessura da epiderme superior (ES) na posição P2.....	66
4.2.13 Espessura da hipoderme superior (HS), na posição P2.....	68
4.2.14 Espessura do parênquima paliçádico (PP), na posição P2.....	70
4.2.15 Espessura do Parênquima Esponjoso (PE), na posição P2.....	72
4.2.16 Espessura da Hipoderme Inferior (HI), na posição P2.....	72
4.2.17 Espessura da Epiderme Inferior (EI), na posição P2.....	74
4.2.18 Espessura Total (ET) da lâmina foliar, na posição P2.....	75
4.3 Densidade estomática e dimensões dos estômatos nas superfícies abaxial e adaxial das folhas dos explantes de bananeira.....	76
4.3.1 Densidade estomática e dimensões dos estômatos na superfície abaxial das folhas.....	77
4.3.2 Densidade estomática e dimensões dos estômatos na superfície adaxial das folhas.....	84
5. CONCLUSÕES.....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1: Descrição dos tratamentos submetidos aos explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* UFLA, Lavras – MG 2005.....28
- TABELA 2: Resumo da análise de variância para dados fitotécnicos em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em meios de cultura de multiplicação (BAP) e enraizamento (ANA), sob condições de luz artificial e luz natural, com duas concentrações de sacarose no meio de cultura (15g L^{-1} e 30g L^{-1}). UFLA, Lavras – MG, 2005.....30
- TABELA 3: Médias do número de brotações (NB) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob dois tipos de regulador de crescimento e dois tipos de intensidades luminosas. UFLA, Lavras – MG, 2005..31
- TABELA 4: Médias do número de brotações maiores que 1 centímetro (NB>1cm) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob dois tipos de regulador de crescimento e dois tipos de intensidades luminosas. UFLA, Lavras – MG, 2005.....33
- TABELA 5: Médias dos comprimentos da parte aérea (CPA), em centímetros, de explantes de bananeira Prata Anã *in vitro* em função de condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....34
- TABELA 6: Médias dos comprimentos da parte aérea (CPA), em centímetros, de explantes de bananeira Prata Anã *in vitro* em função de diferentes tipos de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005...34
- TABELA 7: Médias do comprimento do sistema radicular (CSR), em centímetros, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em função de diferentes condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....36

TABELA 8: Médias do comprimento do sistema radicular (CSR), em centímetros, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ <i>in vitro</i> em função de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....	36
TABELA 9: Médias do comprimento do sistema radicular (CSR), em centímetros, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ <i>in vitro</i> , em função de meios de cultura com diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.....	37
TABELA 10: Médias da massa fresca da parte aérea (MFPA) de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ <i>in vitro</i> sob dois tipos de regulador de crescimento e duas diferentes condições ed luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....	38
TABELA 11: Médias da massa fresca do sistema radicular (MFSR) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ <i>in vitro</i> sob dois tipos de regulador de crescimento e duas concentrações de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....	40
TABELA 12: Médias da massa seca total (MST) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ <i>in vitro</i> sob duas concentrações de sacarose, com dois diferentes tipos de regulador de crescimento e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....	41
TABELA 13: Resumo da análise de variância para caracteres anatômicos, em seção transversal (Posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ <i>in vitro</i> em meios de cultura de multiplicação e enraizamento, sob condições de luz artificial e luz natural, e duas diferentes concentrações de sacarose (15g L ⁻¹ e 30g L ⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....	51

- TABELA 14: Médias da espessura da epiderme superior (ES) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função dos fatores reguladores de crescimento, condições de luminosidade e concentrações de sacarose isoladamente, nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....53
- TABELA 15: Médias da espessura da hipoderme (HP) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores reguladores de crescimento, condições de luminosidade e concentrações de sacarose isoladamente, nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....54
- TABELA 16: Médias do diâmetro do feixe vascular maior (DA) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e das condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....56
- TABELA 17: Médias do diâmetro do feixe vascular menor (DE) em μm , (posição P1), em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função dos fatores reguladores de crescimento nos meios de cultura, das condições de luminosidade e das concentrações de sacarose, isoladamente. UFLA, Lavras – MG, 2005.....57
- TABELA 18: Médias da espessura do parênquima cortical (PC) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose (30g L^{-1} ; 15g L^{-1}) e das condições de luminosidade (natural; artificial). UFLA, Lavras – MG, 2005.....58
- TABELA 19: Médias da espessura do parênquima cortical (PC) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose e dois tipos de regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.....59

- TABELA 20: Médias da espessura da epiderme inferior (EI) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....60
- TABELA 21: Médias do número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF), da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....61
- TABELA 22: Médias do número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF), da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob diferentes condições de luminosidade e regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.....61
- TABELA 23: Médias do número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF), da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores reguladores de crescimento e concentrações de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....62
- TABELA 24: Médias da espessura do esclerênquima (EC) em μm , na seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função de tipos reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....64
- TABELA 25: Médias da espessura total da nervura mediana (ET) em μm , da seção transversal (posição P1) de folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....65

- TABELA 26: Resumo da análise de variância para caracteres anatômicos, da seção transversal (Posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meios de multiplicação e enraizamento suplementados com 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose, sob condições de luz artificial e luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.....67
- TABELA 27: Médias da espessura da epiderme superior (ES) em µm, da seção transversal (posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose e regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.....68
- TABELA 28: Médias da espessura da hipoderme superior (HS) em µm, da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeiras *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....69
- TABELA 29: Médias da espessura do parênquima paliçádico (PP) em µm, da seção transversal (posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob diferentes condições de luminosidades e de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.....71
- TABELA 30: Médias da espessura do parênquima paliçádico (PP) em µm, da seção transversal (posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose e regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.....72
- TABELA 31: Médias da espessura da hipoderme inferior (HI) em µm, da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....73

- TABELA 32: Médias da espessura total (ET) em μm , da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeiras *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....75
- TABELA 33: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de multiplicação, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15g L^{-1} e 30g L^{-1} de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....77
- TABELA 34: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de enraizamento, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15g L^{-1} e 30g L^{-1} de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....78
- TABELA 35: Médias das variáveis resposta analisadas, nas seções paradérmicas da superfície abaxial, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de multiplicação, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L^{-1} e 30g L^{-1}) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....78
- TABELA 36: Médias das variáveis resposta analisadas nos cortes paradérmicos da superfície abaxial, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de enraizamento, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L^{-1} e 30g L^{-1}) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....79

- TABELA 37: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície adaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de multiplicação, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....85
- TABELA 38: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície adaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de enraizamento, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15g L⁻¹ e 30g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....85
- TABELA 39: Médias das variáveis resposta analisadas nos cortes paradérmicos da superfície ADAXIAL, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de multiplicação, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....86
- TABELA 40: Médias das variáveis resposta analisadas nos cortes paradérmicos da superfície adaxial, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de enraizamento, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....87

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1: Sala de crescimento, onde foram conduzidas as fases de multiplicação e enraizamento dos explants de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob luz artificial. (Foto: Rocha, 2003).....21
- FIGURA 2: Estufa tipo PAD & FAN, onde foram conduzidas as fases de multiplicação e enraizamento dos explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob luz natural. (Foto: Rocha, 2003).....22
- FIGURA 3: Médias das intensidades luminosas verificadas nos diferentes horários, nas posições dentro (1 centímetro acima dos frascos na condição de luz natural) e na sala de crescimento (1 centímetro acima dos frascos na condição de luz artificial). Cruz das Almas – BA, 2004.....23
- FIGURA 4: Médias das temperaturas diárias verificadas durante os dias de condução do experimento. Dados coletados da Estação Meteorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas – BA, 2004.....24
- FIGURA 5: Indicação da localização da folha número dois, nas mudas de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, utilizadas para a coleta dos dados fitotécnicos e anatômicos. UFLA, Lavras – MG, 2005.....25
- FIGURA 6: Posições P1 e P2 avaliadas nas seções transversais do diversos tratamentos. ES – Epiderme Superior; HS – Hipoderme Superior; PP – Parênquima Paliçádico; PE – Parênquima Esponjoso; EC – Fibras Esclerenquimáticas; HI – Hipoderme Inferior; PI – Parênquima Incolor; EI – Epiderme Inferior; XL – Xilema; FL – Floema. UFLA, Lavras – MG, 2005.....26

FIGURA 7: Representação gráfica das médias da massa seca total (MST) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* sob duas concentrações de sacarose, com dois diferentes tipos de regulador de crescimento e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.....42

FIGURA 8: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de estômato (tetracítico) em meio de multiplicação sob luz artificial, na superfície abaxial em folha de explante de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*. UFLA, Lavras – MG, 2005.....44

FIGURA 9: Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* (Coluna A – nervura mediana 10 x; coluna B – limbo foliar 20x e coluna C – cortes paradérmicos epiderme abaxial 40x). Linha 1 – Meio de multiplicação (BAP), na luz artificial, com 30g L⁻¹ de sacarose; linha 2 - Meio de multiplicação (BAP), na luz natural, com 30g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....46

FIGURA 10: Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* (Coluna A – nervura mediana 10 x; coluna B – limbo foliar 20x e coluna C – cortes paradérmicos epiderme abaxial 40x). Linha 1 – Meio de multiplicação (BAP), na luz artificial, com 15g L⁻¹ de sacarose; linha 2 - Meio de multiplicação (BAP), na luz natural, com 15g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.....47

FIGURA 11: Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* (Coluna A – nervura mediana 10 x; coluna B – limbo foliar 20x e coluna C – cortes paradérmicos epiderme abaxial 40x). Linha 1 – Meio de enraizamento (ANA), na luz artificial, com 30g L⁻¹ de sacarose; linha 2 - Meio de enraizamento (ANA), na luz natural, com 30g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2005.....48

- FIGURA 12: Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* (Coluna A – nervura mediana 10 x; coluna B – limbo foliar 20x e coluna C – cortes paradérmicos epiderme abaxial 40x). Linha 1 - Meio de enraizamento (ANA), na luz artificial, com 15g L⁻¹ de sacarose; linha 2 - Meio de enraizamento (ANA), na luz natural, com 15g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2005.....49
- FIGURA 13: Médias da espessura da hipoderme (HP) em µm, da seção transversal (posição P1) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....55
- FIGURA 14: Médias da espessura da hipoderme superior (HS) em µm, da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeiras *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....70
- FIGURA 15: Médias da espessura da hipoderme inferior (HI) em µm, da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....74
- FIGURA 16: Médias da espessura total ET em µm, da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.....76
- FIGURA 17: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de multiplicação, com a suplementação de 15 g L⁻¹ de sacarose, sob luz artificial. UFLA, Lavras – MG, 2005.....81

- FIGURA 18: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de multiplicação, com a suplementação de 30 g L⁻¹ de sacarose, sob luz artificial. UFLA, Lavras – MG, 2005.....82
- FIGURA 19: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de multiplicação, com a suplementação de 30g L⁻¹ de sacarose, sob luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.....83
- FIGURA 20: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de enraizamento, com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose, sob luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.....84
- FIGURA 21: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície adaxial de folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de enraizamento, com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose, sob luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.....88

RESUMO

ROCHA, Herminio Souza. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira ‘Prata anã’: Alterações morfoanatômicas.** 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

A micropropagação de bananeiras proporciona a obtenção de grande quantidade de mudas clonadas em reduzido espaço físico e em curto espaço de tempo. Entretanto, a estrutura anatômica das folhas dos explantes formados na condição *in vitro*, apresenta diversas deficiências que resultam, muitas das vezes, em elevados volumes de perdas causados principalmente por dessecação, durante a aclimatização. Objetivou-se estudar as alterações morfoanatômicas ocorridas nos explantes de bananeira ‘Prata anã’, quando submetidos a elevadas intensidades luminosas juntamente com a redução na suplementação de sacarose nos meios de cultura, nas fases de multiplicação e enraizamento. O experimento foi instalado na Biofábrica da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas – BA. Os explantes foram mantidos na condição *in vitro*, durante 65 dias, tendo sido testadas duas diferentes intensidades luminosas (luz natural e luz artificial - lâmpadas fluorescentes), com duas concentrações de sacarose (15g L^{-1} e 30g L^{-1}) e dois reguladores de crescimento BAP e ANA. O desempenho dos explantes *in vitro* foi avaliado pelo desenvolvimento fitotécnico. Foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre as modificações anatômicas nas folhas dos explantes, pela análise das seções transversais em duas posições da lâmina foliar (P1 – nervura mediana e P2 – porção central do limbo foliar), tendo sido medidas as espessuras dos diversos tecidos componentes do mesofilo. Também foram realizados cortes parâdermicos para caracterização das densidades, topografia e formato dos estômatos, em ambas as faces da lâmina foliar. Tanto os explantes na fase de multiplicação quanto enraizamento, sob luz artificial ou natural, apresentaram uma organizada diferenciação do mesofilo foliar, sem a presença de anormalidades. A funcionalidade dos estômatos pôde ser verificada pela relação diâmetros médios polares sobre diâmetros médios equatoriais, tendo sido verificado que, na fase de multiplicação, os desempenhos superiores dos explantes são obtidos sob luz artificial com a suplementação de 30g L^{-1} , e na fase de enraizamento as condições ideais de cultivo são a luz natural, com a suplementação de 15g L^{-1} .

¹ Comitê Orientador: Prof. Dr. Carlos Ramirez de Rezende e Silva (Orientador) – UFLA; Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro (Co – orientador) - UFLA

ABSTRACT

ROCHA, Herminio Souza. **Light and sucrose on 'Prata anã' banana micropropagation: morph-anatomical altered structure.** 2005. 98 p. Dissertation (Agronomy Master in Crop Production)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Micropropagation of bananas results in a great quantity of cloned plantlets, produced in a reduced space and in a short period of time. Nevertheless, the anatomical structure of the leaves of the explants formed under *in vitro* conditions present a series of deficiencies, which result, most of the time, in great volumes of losses due to desiccation, during acclimatization. The objective of this work was to study the morph- anatomical modifications caused to the banana 'Prata ana' explants, when submitted to high light intensities, and a reduction in sucrose supplementation in the culture media during multiplication and rooting phases. The experiment was established in the facilities of the Biofactory, at EMBRAPA Cassava and Tropical Fruit Crops, in the city of Cruz das Almas, Bahia state, Brazil. The explants were maintained *in vitro*, during a 65 days period, during which two different light intensities (a natural light and an artificial light environment), together with two different sucrose concentrations (15g L^{-1} and 30g L^{-1}) in the culture media, with two different growth regulators (BAP and ANA) were tested. The development of the *in vitro* materials were evaluated by several parameters. The anatomical characterization, was done by the extraction of transversal sections of the explants leaves, in two distinct positions (P1 – medium vein and P2 – central portion of the leaf limb, having been measured the thickness of each of the tissues which composed the leaf mesophyl. In order to characterize the shape, density and topography of the stomata, paradermic cuts were proceeded in both surfaces of the leaves. Explants in both multiplication and rooting media, under artificial or natural light presented an organized differentiation of the mesophyl, with no abnormalities at all. The appropriate functioning of the stomata, could be analyzed by the relation between the average polar diameters over the average equatorial diameters, having been confirmed that in the multiplication phase, the best results in terms of the development of the explants were obtained under artificial light conditions, with a 30g L^{-1} sucrose supplementation. On the other hand, for the rooting phase, the best results were obtained under natural light conditions, with a 15g L^{-1} sucrose supplementation.

¹ Guidance Committee: Prof. Dr. Carlos Ramirez de Rezende e Silva (Supervisor) – UFLA; Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro (Co-Supervisor) UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A bananicultura no Brasil é composta, em sua maioria, por pequenos produtores, que utilizam a banana como fonte geradora de renda em seu orçamento, porém o nível de tecnologia empregado é baixo se comparado com outros países produtores na América Latina, tais como Equador, Costa Rica, Honduras e Colômbia.

A cultura da bananeira vem recentemente passando por grandes transformações no Brasil. As diversas limitações de ordem fitossanitária que têm comprometido o cultivo e os bons rendimentos desta cultura, têm feito com que os produtores se voltem com maior interesse aos produtos do melhoramento genético desta espécie, os quais vêm sendo lançados nacionalmente, e que conferem resistência às mais danosas pragas e doenças.

A adoção de sofisticadas tecnologias para a propagação de musáceas, tem aumentando sobremaneira o número de plantas disponíveis em curto espaço de tempo. Dentre essas tecnologias, destaca-se a micropropagação ou propagação *in vitro*, que consiste no cultivo de pequenos segmentos de plantas, denominados explantes, que resultam em mudas clonadas, de plantas matrizes de elevado potencial produtivo, isentas de pragas e doenças, que proporcionam significativos ganhos qualitativos e quantitativos para os produtores. A micropropagação é portanto a principal forma de validação das novas variedades produzidas pelo programa nacional de melhoramento genético da bananeira, possibilitando aos produtores o imediato acesso às novas variedades lançadas.

A cultura de tecidos de plantas é uma forma de multiplicação assexuada, visando a propagação de determinados genótipos e, como tal, é excluída de qualquer forma de recombinação genética, possibilitando dessa

forma a multiplicação do indivíduo a partir de uma única célula ou de um pequeno número de células.

Em escala comercial, a micropropagação já é realidade em diversas regiões do mundo, com destaque para a Europa Ocidental, América do Norte, Ásia, Austrália e Israel. No Brasil, a principal limitação para o maior acesso dos produtores às mudas micropropagadas, na implantação de novos bananais, é o elevado custo deste tipo de material propagativo, que é muito superior ao das mudas convencionais.

A elevação dos custos se deve, entre outros fatores, a uma deficiente estrutura anatômica das folhas dos explantes, que são mantidos durante meses na condição *in vitro*, com umidade relativa de 100%, sob temperaturas controladas com baixas intensidades luminosas e que ainda contam com uma fonte de carbono prontamente disponível no meio de cultura. Estes fatores ambientais provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecidos, levando a incapacidade das plantas produzidas *in vitro* de controlar a perda d'água. Tudo isto faz com que a passagem da condição heterotrófica para a autotrófica seja traumática para as plântulas, causando muitas das vezes grandes volumes de perdas das mudas, na fase de aclimatização.

Neste sentido, o estudo anatômico das folhas destes explantes/plântulas micropropagadas, submetidas a modificações nas intensidades luminosas, juntamente com uma gradual redução na concentração de sacarose disponível nos meio de cultura, servirão para auxiliar na compreensão do comportamento destes tecidos vegetais nas condições *in vitro* e *ex vitro*, contribuindo para reduzir perdas e custos de produção.

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos do ambiente de cultivo sobre as características dos estômatos, das células epidérmicas e do mesofilo foliar nos explantes de bananeira 'Prata Anã' cultivados *in vitro*, com alterações nas

condições de luminosidade e nas concentrações de sacarose nos meios de cultura, nas fases de multiplicação e enraizamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da bananicultura

Em diversas regiões mais pobres do mundo, a banana representa uma das mais importantes fontes de alimento fornecedor de amido para milhões de pessoas (Gowen, 1995).

A cultura da bananeira representa grande importância econômica e social em todo o mundo, sendo cultivada em mais de 80 países tropicais, principalmente por pequenos agricultores. O Brasil é o terceiro produtor mundial de banana, sendo a segunda fruta mais consumida no país, com uma produção de 6,36 milhões de toneladas métricas por ano, ocupando uma área de 521 mil hectares (FAO, 2003), quase toda banana produzida é comercializada no mercado interno.

A banana é a fruta mais consumida pela população brasileira, principalmente pela população de baixa renda, devido ao seu sabor agradável, ao alto valor nutricional e ao baixo custo (Dantas & Soares Filho, 1977)

A bananicultura brasileira apresenta características peculiares que a diferenciam da maioria das principais regiões produtoras do mundo, tanto em relação à diversidade climática em que é explorada, quanto no tocante ao uso de cultivares, à forma de comercialização e às exigências do mercado consumidor. Os cultivos são geralmente tradicionais, com baixos índices de capitalização e de níveis tecnológicos. Cultivos tecnificados são encontrados nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Goiás e Minas Gerais, nos quais se observa a utilização de tecnologias geradas e/ou adaptadas de outros países. O baixo potencial de produtividade das cultivares em uso, inferior a 16 t ha^{-1} , o porte elevado de algumas cultivares, a falta de tolerância à estiagem e a presença de doenças e pragas são os principais problemas que afetam a cultura e que deverão ser

solucionados somente a médio e longo prazos, a partir de resultados de pesquisa (Alves, 1986).

Em termos econômicos, a bananicultura posiciona-se entre as seis culturas perenes que mais rapidamente proporcionam o retorno do capital investido, apresentando um contínuo fluxo de produção já a partir do primeiro ano (Souza e Torres Filho, 1997).

2.2 Principais métodos de propagação

2.2.1 Propagação Convencional

O sistema de plantio mais comum entre os produtores é a produção das mudas em condições de campo. Este sistema tem inconvenientes como a baixa taxa de multiplicação, em torno de 5 a 10 mudas por ano por planta matriz (Athayde, 1994); a possibilidade de transmissão de pragas e doenças e os altos custos de retirada e tratamento das mudas, bem como o seu transporte (Alves & Oliveira, 1995). Por este sistema a muda deve sofrer um processo de desinfestação e seleção, bem como apresentar peso não inferior a 2 kg, devendo os rizomas originar-se de filhos de alta vitalidade e de aparência normal. Podem ser do tipo chifre, chifrinho e chifrão, que são as melhores, mas são escassas. As mudas tipo orelha-de-elefante (ou guarda-chuva) têm desenvolvimento retardado, sendo descartadas pela maioria dos bananicultores (Alves & Oliveira, 1995). Um aprimoramento do sistema convencional é a propagação rápida *in vivo* que consiste na retirada de rizomas de plantas não floridas, eliminação das raízes e limpeza do rizoma; retirada das bainhas externas, eliminação do meristema apical e plantio em canteiros de areia com irrigação constante. Desta forma, brotações laterais são estimuladas. Nas primeiras brotações, faz-se nova incisão para eliminar o meristema apical e favorecer o desenvolvimento de novas brotações laterais, que finalmente irão desenvolver e serão retiradas do

rizoma-matriz para recipientes com substratos, para que enraízem, cresçam e formem mudas vigorosas (Dantas et al., 1986).

2.2.2 Micropropagação

A maioria dos trabalhos com cultura de tecidos que têm sido feitos com o gênero *Musa* consiste na obtenção de culturas assépticas a partir de ápices caulinares (meristemas recobertos com poucos primórdios foliares). A multiplicação é feita a partir de ápices caulinares, com aproximadamente 1 cm³, fazendo-se incisões para a quebra da dominância apical e com isto estimulando o surgimento de gemas laterais, as quais situam-se na periferia do ápice meristemático e que normalmente têm seu desenvolvimento malogrado (Domingues, 1992).

Para manter a uniformidade do material cultivado, tem-se trabalhado com explantes iniciais, contendo no máximo um ou dois pares de primórdios foliares sobre o meristema, cultivados até alcançarem 2 ou 3 cm de altura, quando então são cortados longitudinalmente pelo centro do ápice. Esta técnica pode ser utilizada também para a obtenção de plantas livres de vírus em larga escala, desde que o explante inicial esteja isento do patógeno (Krikorian & Cronauer, 1984).

Liu et al. (1989) obtiveram 7000 plantas a partir de diversas cultivares de bananeiras e plátanos, através de micropropagação e indicaram sua superioridade, quando instaladas em campo, em relação às plantas obtidas convencionalmente.

A incisão longitudinal no ápice caulinar proporcionou a obtenção de 6 a 12 brotos e aproximadamente 20 plantas originárias de um único ápice caulinar (Gupta, 1986).

O BAP permite bom estabelecimento e brotação dos ápices caulinares em bananeira. É recomendável a utilização do BAP como citocinina no meio de multiplicação (Wong, 1986; Hu & Wang, 1983; Pierick, 1987).

A maioria dos trabalhos publicados sobre cultura de ápices caulinares enfatiza a produção de plântulas enraizadas, usualmente por separação de brotos individuais, e transferência dos mesmos para meio de indução de enraizamento. Entretanto, em alguns trabalhos tem-se cultivado primeiro o explante em meio contendo auxina, obtendo-se consecutivamente a formação de parte aérea e raiz. No entanto, esta formação de parte aérea e raiz, pode ocorrer em brotos muito jovens, o que inibe a formação de brotos adicionais. Se o objetivo é a obtenção de muitos brotos deve-se realizar o enraizamento em um passo seguinte (Domingues, 1992).

Segundo Wong (1986) não foi necessária a adição de auxinas para a indução de enraizamento em brotos obtidos em meio contendo BAP. Vuylsteke & De Langhe (1985) também consideraram desnecessária a adição de auxinas para a indução de enraizamento em brotos obtidos em meio contendo BAP como citocinina. Esses autores introduziram os brotos com 2 a 3 cm em meio de enraizamento e quando existia auxina indutora de enraizamento (AIB), o crescimento era reduzido até a paralisação. Para a aclimatização os autores transferiram para o solo plantas com 6 a 10 cm de comprimento e bom sistema radicular com raízes com mais de 10 cm de comprimento, obtendo 100% de pegamento.

O desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* normalmente é focado na regeneração ou nas taxas de multiplicação. Pouca consideração tem sido dada a forma da planta ou a sua integridade no ambiente *ex vitro*. Tais informações se aplicadas a protocolos de micropropagação, poderiam elevar a eficiência dos sistemas de cultivo e permitir que métodos de cultura de tecidos

sejam economicamente adaptáveis a um maior número de espécies (Lee et al., 1988).

2.3 Aclimatização

De acordo com Smith et al. (1986), o período de aclimatização, cuja duração é de uma a quatro semanas, objetiva corrigir as alterações e anormalidades induzidas no período de desenvolvimento *in vitro*. Neste período é induzida a transferência do metabolismo heterotrófico para o autotrófico, juntamente com as alterações para que a planta tenha maior controle sobre a perda e a absorção d'água, necessitando que as plântulas passem por um gradual aumento da irradiação e decréscimo da umidade relativa.

As características fisiológicas e anatômicas de plântulas micropropagadas tornam necessária a gradual aclimatização ao ambiente da casa de vegetação ou à condição de campo. As mais satisfatórias técnicas para a condução da aclimatização direcionam para ambientes com baixas umidades relativas, altas intensidades luminosas, crescimento autotrófico e ambientes sépticos, os quais são característicos de casas de vegetação e do campo (Preece & Sutter, 1991).

O processo de micropropagação vegetal leva a produção de plântulas com folhas finas, que as assemelham a plantas de sombra, por terem sido expostas a baixos níveis de luminosidade. As plântulas micropropagadas, submetidas a altas intensidades luminosas, sofrem clorose e queima de folhas. Alguns laboratórios elevam as intensidades luminosas, na fase de enraizamento *in vitro* (Griffis et al., 1993, citado por Preece & Sutter, 1991).

As plântulas ou brotações cultivadas *in vitro* são expostas a microambientes que são selecionados para fornecer o mínimo estresse possível e caracterizam-se pelas ótimas condições de cultivo. Estes materiais se desenvolvem dentro de frascos de cultura sob reduzida intensidade luminosa,

condições assépticas, num meio de cultura contendo sacarose e nutrientes em quantidade suficiente para promover crescimento heterotrófico, numa atmosfera de alta umidade relativa. Todas estas condições contribuem para a constituição de um fenótipo que é incapaz de sobreviver às condições ambientais quando transferidos para uma casa de vegetação ou para o campo. Dessa forma, é necessário se promover uma gradual aclimatização das plântulas para assegurar sua sobrevivência até que novas folhas, mais adaptadas às condições ambientais, sejam emitidas (Preece & Sutter, 1991).

A sobrevivência e o crescimento das plântulas cultivadas *in vitro* são ainda problemáticos para algumas culturas. Um reduzido desenvolvimento da cutícula, o funcionamento anormal dos estômatos (Brainerd & Fuchigami, 1981; Fuchigami et al., 1981) e um sistema vascular de pouco desenvolvimento (Fabri & Bartolini, 1985; Leshem, 1983; Ziv et al., 1981) são as causas sugeridas para a suscetibilidade das plântulas ao estresse hídrico durante a aclimatização.

O endurecimento das plântulas *in vitro*, através do aumento da irradiância, pode contribuir para a redução das perdas, pois as plântulas se tornariam menos frágeis quando removidas do ambiente *in vitro* (Capellades et al., 1990).

2.4 Efeitos do fator de luz no desenvolvimento *in vitro*

A utilização de lâmpadas fluorescentes brancas é citada em 90% dos trabalhos de pesquisas em cultura de tecidos de plantas, como a fonte de luz disponibilizada (Dooley 1991). Os custos com iluminação, principalmente das salas de crescimento num laboratório de cultura de tecidos, contabilizam 65% do total gasto em eletricidade (Standaert de Metsenaere, 1991), e se constituem num dos mais elevados componentes do custo total de produção, com exceção para os gastos com a mão-de-obra (Dooley, 1991).

A intensidade luminosa pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar características, tais como a espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e o desenvolvimento dos estômatos (Lichtenthaler et al., 1981; Terry et al., 1983, citados por Lee et al., 1988).

Já é conhecido o fato de que o fator luz é capaz de influenciar intensamente a fotossíntese, a concentração de clorofila e a ultraestrutura de cloroplastos, em avaliações de cultivos de *Liquidambar styraciflua*, e que a baixa capacidade fotossintética neste sistema não representa um fator limitante para a aclimatização de plântulas e para o crescimento dos materiais transplantados (Lee et al., 1985). Neste caso, as dificuldades de sobrevivência das plântulas transplantadas são, ao contrário, mais provavelmente relacionadas com as adaptações relacionadas a relações hídricas, já que estas plântulas exibem um reduzido desenvolvimento cuticular com extensos espaços intercelulares no mesofilo (Wetzstein & Sommer, 1982), e também divergentes configurações de estômatos, com reduzida funcionalidade (Wetzstein & Sommer, 1983).

Kodyn e Zapata-Arias (1999) estudaram as vantagens potenciais da utilização de luz solar sobre a luz artificial para o cultivo *in vitro* de bananeiras da variedade Grande Naine, e os efeitos das flutuações de temperaturas, do fotoperíodo e da intensidade luminosa nas taxas de multiplicação e na qualidade das plântulas. Ao testar três diferentes ambientes de cultivo *in vitro*, ou seja, câmara de crescimento com luz artificial e temperatura controladas; sala de crescimento com luz natural sem controle de temperatura e casa de vegetação com luz natural, também sem controle de temperatura, verificou-se que as maiores taxas de multiplicação foram obtidas sob condições de luz natural, em casa de vegetação. Com o endurecimento promovido, na condição de luz natural na casa de vegetação, resultou em plântulas verdes claras e com o

desenvolvimento de uma área foliar maior do que na luz artificial, entretanto foi observado queima de folhas e perda de turgor. Sistemas radiculares mais vigorosos foram também verificados na luz natural. Estes autores ressaltam que a estrutura ideal para um laboratório de micropropagação vegetal seria composta por salas de crescimento com luz natural, possibilitando elevados padrões de higiene, similares aos de uma câmara de crescimento.

Seko & Nishimura (1996) verificaram um crescimento fotoautotrófico *in vitro*, em meio de cultura sem sacarose, enriquecido com CO₂, com explantes regenerantes de cultura de calus de arroz, sob condições de iluminação contínua (24 h) e sob alta intensidade (Densidade de Fluxo de Fotons Fotossintéticos de 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante a fase de preparação, ou seja, alongamento e enraizamento de brotações.

Nos estudos realizados por Lee et al. (1988), com *Liquidambar styraciflua* L., os resultados mostram que diferenças no fluxo quântico podem modificar o desenvolvimento *in vitro*. A elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessadas *in vitro*, com uma diferenciação do tecido paliádico no mesófilo das folhas. A anatomia foliar destas plântulas apresentou-se mais próxima de folhas de mudas em aclimatização do que o material *in vitro* crescendo sob baixa irradiância.

2.5 Efeitos do fator sacarose nos meios de cultura

A concentração de sacarose no meio de cultura tem efeito sobre a multiplicação e o crescimento. Concentrações de 2 a 4% (peso por volume) são as mais comuns. Abaixo dessa faixa, pode ocorrer clorose nas culturas e, acima dela, pode-se incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando deterioração das culturas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Kozai (1991) resalta que uma possível razão fundamental para os elevados custos de produção, na micropropagação convencional, é a presença de

sacarose no meio de cultura. Nestas condições, observam-se rápidos crescimentos heterotróficos de fungos e bactérias. Quando a sacarose está presente no meio, as plântulas não se desenvolvem fotoautotroficamente, provocando retardo no crescimento e em alguns casos, altas percentagens de morte durante a fase de aclimatização. Omitindo a sacarose do meio de cultivo, ocorrem benefícios às plântulas, não somente pela promoção da condição fotoautotrófica *in vitro*, mas também pela redução na perda de plântulas devido a contaminações biológicas no meio de cultura.

O cultivo *in vitro*, utilizando meio de cultura desprovido de sacarose, permite que recipientes bem maiores do que os convencionais para cultura de tecidos, sejam usados com poucos riscos de contaminações, resultando em economia de mão-de-obra (Kozai & Iwanami, 1988).

George (1993a) observa que a presença de sacarose no meio de cultura inibe a formação de clorofila e conseqüentemente a fotossíntese, prejudicando o crescimento autotrófico.

Debergh (1988) afirma que a redução ou até mesmo a eliminação da sacarose do meio de enraizamento deve ser utilizada com a finalidade de facilitar a passagem das plantas para o estágio autotrófico no transplântio para a fase de aclimatização.

Foi observado que regenerantes de arroz, a partir de cultura de calos, cultivados em meio de cultura desprovidos de sacarose, com enriquecimento de CO₂, apresentaram hiperhidricidade, de forma que suas brotações provavelmente continham anormalidades anatômicas, incluindo estômatos pouco desenvolvidos (Seko & Nishimura, 1988). A hiperhidricidade, ou vitrificação, pode ter sido verificada em função do baixo potencial hídrico do meio de cultura, disponibilizando mais facilmente água para os explantes. Desta forma, a eliminação total da sacarose do meio de cultura deve ser questionada, para algumas situações.

Normalmente para o cultivo *in vitro* de células de tecidos ou órgãos, faz-se necessária a incorporação de uma fonte de carbono no meio de cultura. A sacarose é quase que universalmente usada para o propósito da micropropagação ou cultivo *in vitro*. A concentração ótima de sacarose para a indução de morfogênese ou crescimento difere entre os diferentes genótipos e às vezes entre genótipos próximos (George, 1993).

2.6 Características anatômicas.

As plântulas micropropagadas apresentam folhas com divergentes aspectos anatômicos e fisiológicos, quando comparadas com plantas não cultivadas *in vitro*, tais como reduzida diferenciação do mesófilo com grandes espaços intercelulares, decrescente desenvolvimento da cera cuticular e estômatos elevados, volumosos, de crescente densidade, com funcionalidade diminuída (Brainerd et al., 1981; Grout & Aston 1978; Wetzstein & Sommer, 1983).

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam cutícula pouco espessada, estômatos pouco funcionais com um deficiente mecanismo de abertura e fechamento, além de apresentarem uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea, o que as caracteriza pela alta suscetibilidade à baixa umidade relativa durante a aclimatização (Pierik 1990).

As folhas podem ser diferenciadas em função da sua natureza morfológica e de suas estruturas anatômicas em dois tipos: folhas de sombra e folhas de sol. As folhas de sombra possuem anatomia e propriedades fisiológicas específicas que as capacitam a utilizar baixas intensidades luminosas com elevada eficiência, todavia não são capazes de fazer uso eficiente da luz plena, sob altas intensidades, por provocar a foto-oxidação dos plastídeos (Bjorkman & Holmgren, 1963; Coombs & Hall, 1982). Por outro

lado, as folhas de sol são mais facilmente adaptadas às condições de sombra, pela própria arquitetura das plantas, que promovem o auto-sombreamento de suas folhas a medida que se desenvolvem.

Normalmente as folhas de sol são menores e mais espessas, com maior desenvolvimento da cutícula. Nessas folhas, tanto o parênquima paliçádico como o parênquima lacunoso encontram-se no mesófilo, bem diferenciados. As células do parênquima paliçádico são maiores e bem organizadas, de forma que os espaços intercelulares são pequenos, apresentando uma maior área de superfície externa de paredes, além de possuir células mais alongadas na direção perpendicular à superfície foliar. As paredes celulares e a epiderme são também mais espessas (Esau, 1976; Mitchell, 1979; Whatley & Whatley, 1982; Coombs & Hall, 1982). Nas folhas de sol, aumenta a relação entre parênquima paliçádico e parênquima lacunoso, bem como o desenvolvimento de tecidos de sustentação (Medri & Lleras, 1980). Respostas a mudanças de luminosidade são verificadas nas duas faces das folhas (adaxial e abaxial), porém a face adaxial é geralmente mais afetada (Engel & Poggianni, 1989). Esau (1965) esclarece que as modificações ocorrem de maneira irreversível já no primórdio da gema.

As folhas formadas em ambiente *in vitro* geralmente carecem de cerosidade epicuticular bem desenvolvida, possuem estômatos elevados externamente à epiderme, os quais não se fecham eficientemente e apresentam uma anatomia interna fracamente estruturada. Essas folhas podem também ser ineficientes em termos fotossintéticos, e nunca se tornarão “normais”, sendo portanto imperativo que novas folhas mais similares às desenvolvidas em ambientes naturais ou de casas de vegetação sejam desenvolvidas relativamente rápido, nas mudas micropropagadas (Preece & Sutter, 1991).

Considerando a densidade estomática, observa-se que esta característica é amplamente afetada pela intensidade luminosa. Diversos trabalhos têm demonstrado que sob alta irradiância, a frequência de estômatos por unidade de

área superficial da folha é alta (Bjorkman & Holmgren, 1963; Evans, 1973; Boardman, 1977; Ashton & Turner, 1979; Medri & Lleras, 1980). A densidade estomática é inversamente proporcional à área da lâmina foliar e quando plantas da mesma espécie foram submetidas a diferentes condições ambientais, a mesma correlação era mantida (Gupta 1961).

Sciutti & Morini (1995) trabalhando com quatro diferentes porcentagens de umidades relativas, dentro dos frascos de cultivo *in vitro*, na fase de enraizamento de ameixeira, observaram que as densidades estomáticas foram maiores sob ambiente *in vitro* com 100% de umidade relativa e decresceram significativamente com o decréscimo da umidade no interior dos frascos. Esta alta densidade estomática verificada influenciou na rápida dissecação dos tecidos quando transferidos ao ambiente externo.

Lee et al. (1988) estudando os efeitos de três densidades de fluxo de quantum ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $315 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na morfologia das folhas de *Liquidambar styraciflua* L. sob ambiente *in vitro* e *in vivo*, conduzido em sala de crescimento sob temperatura ambiente de 26° C e fotoperíodo de 16 h, verificaram que as configurações dos estômatos foram pouco afetadas pelo fluxo quântico. Entretanto, as condições ambientais dos cultivos *in vitro* vs. *in vivo* apresentaram pronunciados efeitos na topografia dos estômatos. As folhas das plântulas *in vitro* exibiram células-guarda elevadas, em estômatos abertos, sob quaisquer condições de intensidade luminosa.

Capellades et al. (1990) descrevem que na fase de multiplicação *in vitro*, de *Rosa multiflora* L. cv. Montse, com 100% de umidade relativa dentro dos frascos de cultivo, e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, as densidades estomáticas foram significativamente maiores do que nas plantas em fase de enraizamento *in vitro*, com $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e sob umidade relativa de 75% e 100%, e também maiores do que as plântulas em aclimatização. Foi observado ainda que os estômatos das folhas dos explantes e

plântulas, nas fases de multiplicação e enraizamento com 100% de umidade relativa dentro dos frascos, apresentaram-se elevados acima da superfície das células epidérmicas; ao passo que os estômatos das plântulas, na fase de enraizamento com 75% de umidade relativa nos frascos, e os das folhas das plantas em condição de campo, apresentaram-se abaixo das células epidérmicas.

Também Wetzstein & Sommer (1983) verificaram densidades estomáticas significativamente maiores em cultivo *in vitro* do que em plantas de campo ou nas folhas de plantas em fase final de aclimatização.

Contrariamente, Brainerd et al. (1981) em trabalho com ameixeira cv. Pixy sob três diferentes ambientes de cultivos (explantes *in vitro* com luz artificial em intensidade normal, plantas em aclimatização em casa de vegetação e plantas no campo), verificaram que as densidade estomáticas foram menores nos explantes *in vitro* (150 + 60 estômatos por mm²) do que nas plantas em aclimatização na casa de vegetação (300 + 60 estômatos por mm²).

Smith et al. (1986) em trabalho com Bétula branca asiática *Betula platyphylla* var. *szechanica*, comparando a anatomia de explantes *in vitro*, plântulas em câmara de crescimento e material em casa de vegetação, verificaram que as células paliçádicas nas seções transversais, contabilizaram aproximadamente 38% do total da espessura das seções transversais nas plantas em casa de vegetação e nas plântulas em câmara de crescimento, porém somente 21% nas folhas dos materiais *in vitro*. Também as nervuras principais das folhas de materiais *in vitro* apresentaram apenas 13% da área da seção transversal ocupada por vasos xilemáticos/floemáticos. Em contraste, nas folhas das plantas de casa de vegetação, o sistema vascular compreendeu 27% de toda a área e nas plântulas em câmara de crescimento 17%.

Donnelly & Vidaver (1984), trabalhando com estudos da anatomia foliar de framboesa *Rubus idaeus*, comparando plântulas *in vitro* em fase de enraizamento com plântulas em aclimatização e plantas em controle de

crescimento no campo, verificaram que as folhas dos materiais *in vitro* apresentaram-se menores, mais finas, e com células paliçádicas e células do mesofilo menos compactadas em relação às plantas controle (de campo), permitindo assim maiores espaços intercelulares. As novas folhas que se desenvolveram após dois meses de aclimatização apresentaram uma anatomia foliar similar a das folhas das plantas controle.

É evidente que os tecidos foliares produzidos *in vitro*, apesar de mostrarem-se teoricamente bem adaptados e metabolicamente ativos, apresentam sua morfologia interna e suas características estomáticas pouco funcionais, e incapazes de sobrepujarem as adversidades das condições atmosféricas no ambiente *ex vitro*. Uma gradual intensificação da luminosidade proporcionada aos frascos de cultivo, juntamente com a diminuição na concentração de sacarose nos meios de cultura, pode ser de grande utilidade na aclimatização, ainda na condição *in vitro*, proporcionando às plântulas uma anatomia mais adaptada, com um metabolismo mais próximo da condição autotrófica, contribuindo para a redução de perdas na fase de aclimatização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho de pesquisa foi conduzido na Unidade Biofábrica da *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia, a 12° 40' de Latitude Sul, 39° 06' de Longitude Oeste e 200 metros de altitude.

O experimento foi instalado em janeiro de 2004 e conduzido até março do mesmo ano.

3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado consistiu de explantes de bananeira da cultivar triplóide (AAB) Prata Anã, tendo sido selecionadas as plantas “matrizes”, para a extração das gemas, a partir do banco ativo de germoplasma de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

3.2 Extração das gemas e desinfestação do material

Na fase de estabelecimento, em ambiente externo, procedeu-se a extração de gemas laterais e apicais dos rizomas das plantas “matrizes” selecionadas. As dimensões iniciais dessas gemas eram de aproximadamente 10 cm x 10 cm x 12 cm. Em seguida realizou-se a lavagem com detergente, o enxague em água de torneira, com a posterior desinfestação em hipoclorito de sódio 3% durante 30 minutos. Após esta primeira desinfestação, as gemas pré – tratadas foram novamente reduzidas, realizando cortes superficiais na base das mesmas e transversal na parte apical. Após a segunda redução, as gemas com dimensões aproximadas de 5 cm x 5 cm x 2,5 cm foram novamente desinfestadas com hipoclorito de cálcio, na concentração de 10%, durante 20 minutos. Neste estágio transferiu-se todo o material para o interior das câmaras

de fluxo laminar, e sob total assepsia, novamente procederam-se cortes superficiais até que atingissem as dimensões de 1 cm x 1 cm x 0,5 cm, quando foram novamente desinfestadas com hipoclorito de cálcio HTH[®], na concentração de 5%, durante 5 minutos. Em seguida, foram mais uma vez reduzidas até atingirem as dimensões de 0,5 cm x 0,5 cm x 0,5 cm, procedendo-se a inoculação em meio de cultura. Nestas condições, os explantes permaneceram sob fotoperíodo de 16 h, na temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 45 dias, após os quais realizou-se a eliminação dos contaminados e deu-se prosseguimento a fase seguinte, que consistiu em corte ao meio, com o objetivo de atingir a gema apical, quebrando a dominância apical e forçando multiplas brotações laterais.

3.3 Meios de cultura e condições de incubação

Nas fases iniciais de cultivo, ou seja, estabelecimento e multiplicação, o cultivo dos materiais foi efetuado em meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 22,2 μM de 6-Benzylaminopurine (BAP), 3% de sacarose, solidificado com 4,5 g $\cdot\text{L}^{-1}$ de phytigel[®] (SIGMA), sendo o pH ajustado para 5,8.

Na fase de enraizamento, foi utilizado o meio de cultivo básico MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 5,37 μM de Ácido naftalenoacético (ANA), 3% de sacarose, solidificado com 6g L^{-1} de agar, sendo o pH ajustado para 5,8.

Após o preparo do meio, procedeu-se a distribuição no volume de 50 mL em frascos de 268 mL, os quais foram vedados com tampas metálicas, e posteriormente levados a autoclavagem com temperatura de 121°C e de 1,2 atm de pressão por 20 minutos.

Durante toda a fase de multiplicações *in vitro*, foi utilizado o mesmo meio de cultivo da fase de estabelecimento.

Nas fases de estabelecimento e multiplicação os materiais vegetais foram mantidos nas salas de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e temperatura controlada em $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Foram efetuados dois subcultivos após a fase de corte ao meio, em intervalos de 35 dias, quando se realizou a limpeza e subdivisão das brotações retirando-se as partes oxidadas.

3.4 Cultivo sob diferentes tipos de luz e concentrações de sacarose

De posse dos explantes em fase de multiplicação, no segundo subcultivo, foram inoculados 4 explantes por frasco de 268 mL, constituindo-se em uma parcela experimental. Cada tratamento contou com cinco repetições, sendo os mesmos constituídos por explantes em meio de multiplicação e enraizamento, contendo 30 g L^{-1} e 15 g L^{-1} de sacarose sob dois diferentes níveis de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFA): $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz artificial) e $30 - 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz natural), sendo que o ambiente de luz artificial foi conduzido em sala de crescimento com temperatura controlada em $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ (Figura 1), e o ambiente de luz natural foi conduzido em estufa PAD & FAN[®], com cobertura dupla de plástico inflado, sombrite[®] de 50% para retenção da radiação solar e temperatura oscilando entre 23°C a 38°C (Figura 2). Lateralmente a estufa é fechada por plástico rígido PVC transparente. Tanto nas fases de multiplicação quanto enraizamento, os frascos foram acomodados em estantes nas salas de crescimento e na estufa PAD & FAN[®], na altura de 1,50 m do nível do piso.



FIGURA 1: Sala de crescimento, onde foram conduzidas as fases de multiplicação e enraizamento dos explants de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob luz artificial. (Foto: Rocha, 2003)

Nas Figuras 3 e 4, são apresentados gráficos correspondentes aos dados de intensidades luminosas e temperaturas durante o decorrer da condução do experimento.



FIGURA 2: Estufa tipo PAD & FAN, onde foram conduzidas as fases de multiplicação e enraizamento dos explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob luz natural. (Foto: Rocha, 2003)

Os explantes foram deixados sob estas condições de cultivo por 65 dias (janeiro de 2004 até março de 2004). Após este período, as plântulas foram transferidas para o Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas avaliações fitotécnicas em relação a número de brotações; número de brotações maiores que 1cm; comprimento da parte aérea em cm; maior comprimento de raiz em

cm; massa fresca da parte aérea em gramas; massa fresca do sistema radicular em gramas e massa seca total em gramas.

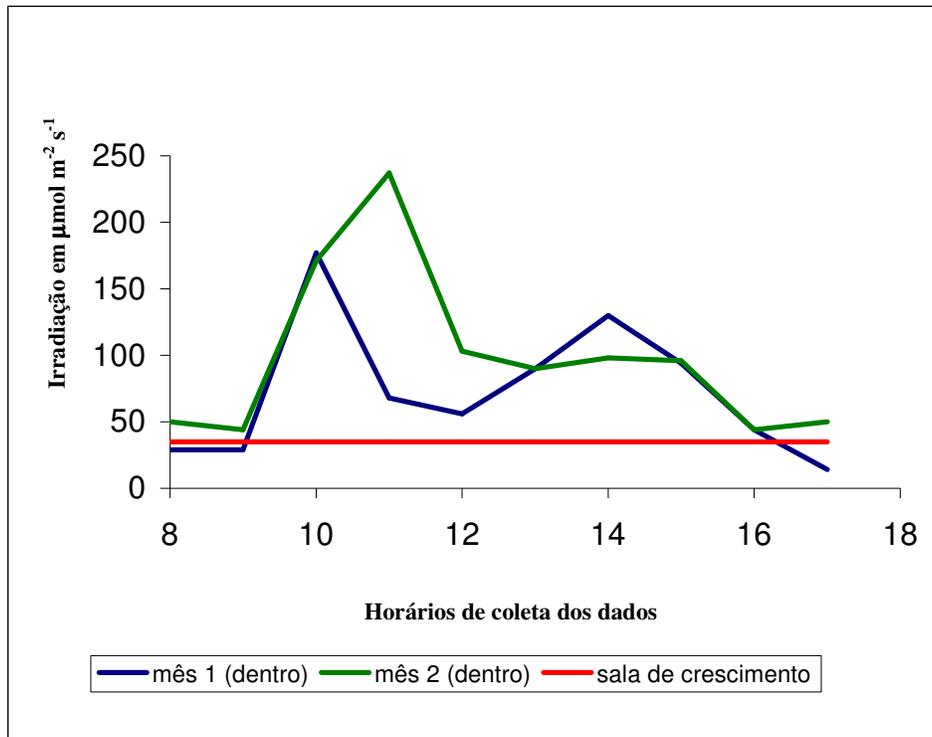


FIGURA 3: Médias das intensidades luminosas verificadas nos diferentes horários, nas posições dentro (1 centímetro acima dos frascos na condição de luz natural) e na sala de crescimento (1 centímetro acima dos frascos na condição de luz artificial). Cruz das Almas – BA, 2004.

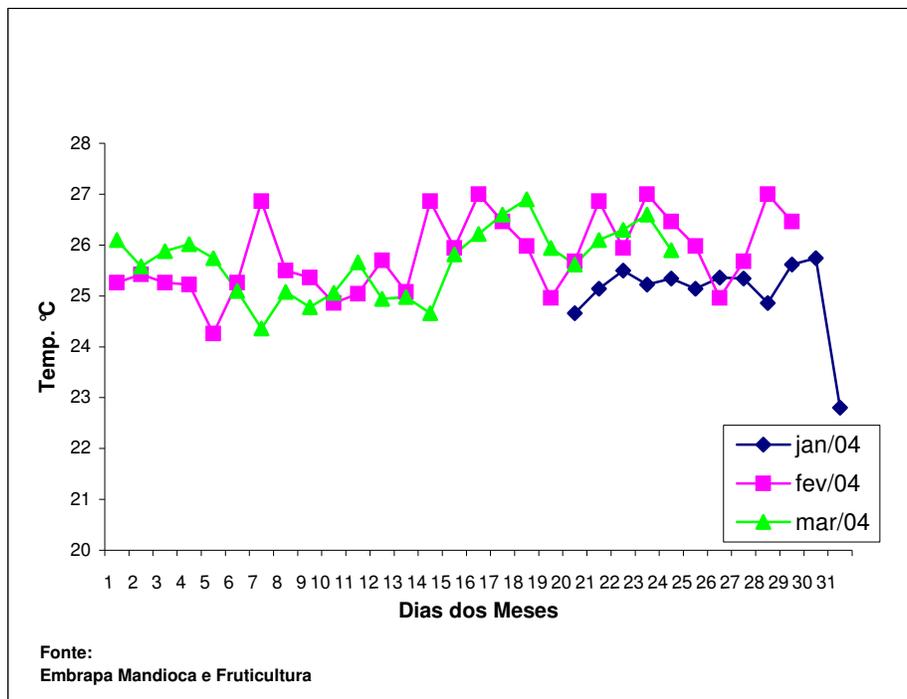


FIGURA 4: Médias das temperaturas diárias verificadas durante os dias de condução do experimento. Dados coletados da Estação Meteorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Cruz das Almas – BA, 2004.

3.5 Avaliação das características anatômicas das folhas das plântulas

Ao final do experimento, após a coleta dos dados fitotécnicos, foram coletadas as folhas de número 2, conforme indicado na Figura 5 e fixadas em álcool etílico 70%.

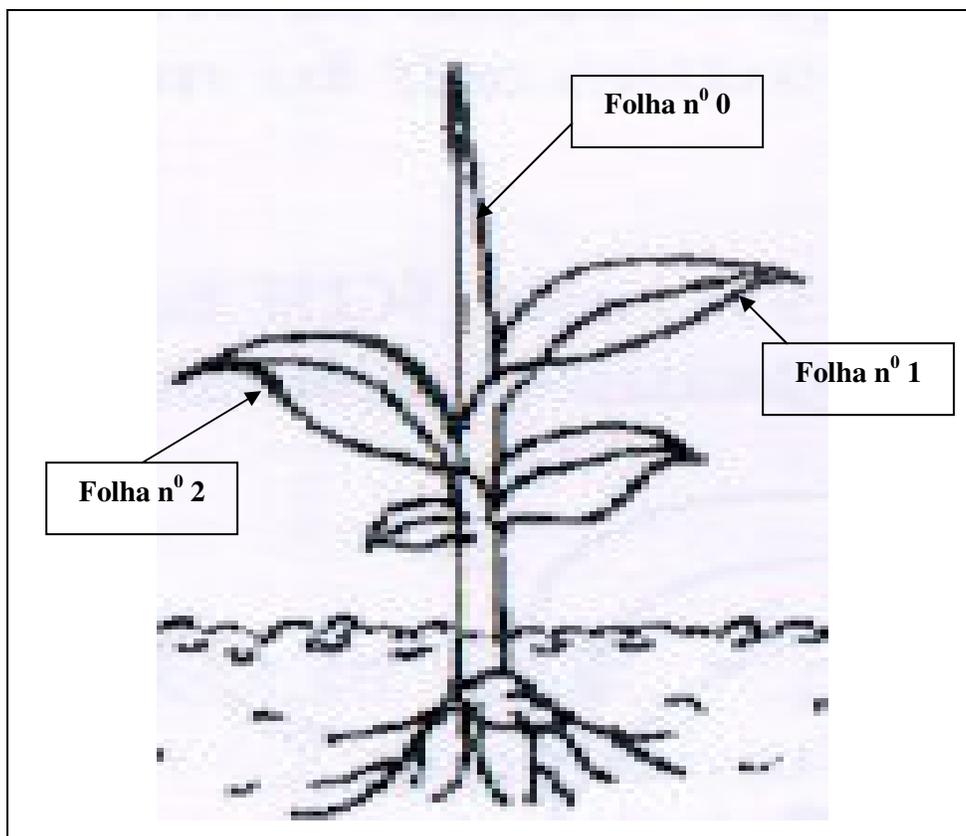


FIGURA 5: Indicação da localização da folha número dois, nas mudas de bananeira 'Prata Anã' *in vitro*, utilizadas para a coleta dos dados fitotécnicos e anatômicos. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Utilizou-se micrótono de mesa para a obtenção de seções transversais do terço médio foliar. Os cortes paradérmicos foram realizados manualmente no terço médio das folhas.

Na Figura 6, estão indicados os diversos tecidos avaliados na lâmina foliar, com as distintas posições de avaliação das espessuras dos mesmos.

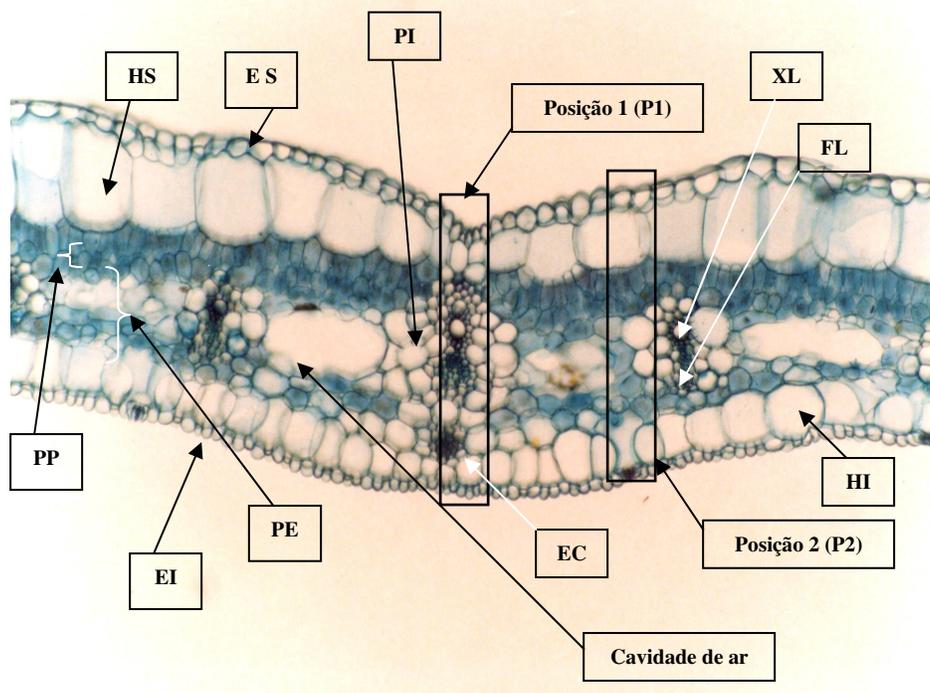


FIGURA 6: Posições P1 e P2 avaliadas nas seções transversais do diversos tratamentos. ES – Epiderme Superior; HS – Hipoderme Superior; PP – Parênquima Paliçádico; PE – Parênquima Esponjoso; EC – Fibras Esclerenquimáticas; HI – Hipoderme Inferior; PI – Parênquima Incolor; EI – Epiderme Inferior; XL – Xilema; FL – Floema. UFLA, Lavras – MG, 2005.

As seções transversais foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio, por um período de 10 minutos, com posterior lavagem tríplice em água destilada. Após as lavagens, as seções transversais foram coradas com azul de astra-safranina, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997) e montadas em glicerina 50%.

Para cada tratamento foram avaliadas 5 plantas, com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada em microscópio de luz. As variáveis respostas coletadas para a posição P1 das seções transversais foram: espessura da epiderme superior; espessura da hipoderme; diâmetro do maior feixe vascular nesta posição; diâmetro do menor feixe vascular nesta posição, espessura do parênquima cortical; espessura da epiderme inferior; número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido horizontal da seção; espessura do esclerênquima e espessura total desta posição. Para a posição P2, foram: espessura da epiderme superior; espessura da hipoderme superior; espessura do parênquima paliçádico; espessura do tecido esponjoso; espessura da hipoderme inferior; espessura da epiderme inferior e espessura total destas seções.

Para as avaliações de caracterização dos estômatos, foram efetuados cortes paradérmicos nas superfícies abaxial e adaxial das mesmas folhas em que se extraíram as seções transversais. Foram feitos quatro cortes por folha, tendo sido extraídos cortes de cinco diferentes plantas dentro do mesmo tratamento, totalizando 20 campos de observação para cada tratamento. Cada campo compreendia uma área de 0,065 mm², totalizando 1,3 mm².

As seções paradérmicas foram montadas entre lâmina e lamínula diretamente com a solução corante (safranina 1% em água glicerinada).

Para as avaliações de caracterização dos estômatos (densidade estomática por mm²; os diâmetros polar e equatorial, tanto para a superfície abaxial quanto para a adaxial) foi utilizado um microscópio Olympus CBB, com o auxílio de câmara clara, segundo a técnica de Laboriau et al., (1961).

No Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal da Lavras foram feitas as fotomicrografias em microscópio Olympus BX 60, com filme ASA 100 colorido.

3.6 Procedimentos Estatísticos

Os dados fitotécnicos e as medições anatômicas foram analisados pelo delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito tratamentos e cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro plantas num frasco. O esquema experimental foi o fatorial 2 x 2 x 2, sendo os fatores compostos por: tipos de reguladores de crescimento, “**meio**”- (6-Benzilaminopurina para multiplicação e ácido naftalenoacético para enraizamento); concentrações de sacarose no meio de cultura, “**sacarose**”- (15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹) e duas condições de luminosidade, com dois diferentes níveis de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFA) - (luz natural e luz artificial). Os fatores foram avaliados pelo teste de médias Scott-knott, no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), a 5% de probabilidade.

Para a análise estomática especificamente, também foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, tendo sido analisados separadamente os quatro tratamentos para a fase de multiplicação e os quatro tratamentos para a fase de enraizamento, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1: Descrição dos tratamentos submetidos aos explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*. UFLA, Lavras – MG 2005.

Tipos de Luz	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Artificial	Meio de	Meio de	Meio de	Meio de
	Multiplicação com 30 g L ⁻¹ de sacarose	Multiplicação com 15 g L ⁻¹ de sacarose	Enraizamento com 30 g L ⁻¹ de sacarose	Enraizamento com 15 g L ⁻¹ de sacarose
	Tratamento 5	Tratamento 6	Tratamento 7	Tratamento 8
Natural	Meio de	Meio de	Meio de	Meio de
	Multiplicação com 30 g L ⁻¹ de sacarose	Multiplicação com 15 g L ⁻¹ de sacarose	Enraizamento com 30 g L ⁻¹ de sacarose	Enraizamento com 15 g L ⁻¹ de sacarose

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento fitotécnico

Na Tabela 2 é apresentado o resumo da análise de variância para os dados de desenvolvimento fitotécnico dos explantes, com os respectivos níveis de significância. Pode-se observar que, para a variável número de brotações (NB), houve interação significativa entre os fatores luz e meio. Da mesma maneira, para a variável número de brotações maiores que 1cm (NB>1 cm) houve interação entre luz e meio. Para o comprimento da parte aérea, os fatores luz e meio atuaram significativamente de forma isolada. A variável comprimento do sistema radicular (CSR) apresentou significância para todos os três fatores: luz, meio e sacarose de forma independente. Para a massa fresca da parte aérea (MFPA), houve interação significativa entre os fatores luz e meio. Houve também interação significativa entre os fatores meio e sacarose para a variável massa fresca do sistema radicular (MFSR). A variável massa seca total (MST) apresentou interação significativa entre todos os três fatores estudados, luz, meio e sacarose.

4.1.1 Número de brotações (NB)

Na Tabela 3 estão apresentadas as médias dos números de brotações em função da interação entre os fatores luz e meio. Pode-se verificar que o maior número de brotações foi obtido com a utilização de meio de cultura de multiplicação (BAP) com o material vegetal mantido sob condições de luz artificial, atingindo 2,35 brotações por explante.

TABELA 2: Resumo da análise de variância para dados fitotécnicos em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em meios de cultura de multiplicação (BAP) e enraizamento (ANA), sob condições de luz artificial e luz natural, com duas concentrações de sacarose no meio de cultura (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹). UFLA, Lavras – MG, 2005.

FV	GL	Quadrados Médios						
		NB	NB > 1 cm	CPA (cm)	CSR (cm)	MFPA (g)	MFSR (g)	MST (g)
Luz (L)	1	1,8384*	1,2521*	13,7681*	13,5850*	8,3845*	0,0722	0,0064
Meio (M)	1	6,1337*	4,5075*	345,3849*	259,7490*	131,6253*	82,6255*	0,2629*
Sacarose (S)	1	1,3902	0,8877	4,4030	23,1030*	1,5664	3,5112*	0,0499*
L x M	1	1,8384*	1,2521*	2,9221	3,8990	10,2378*	0,2450	0,0142*
L x S	1	0,0034	0,0038	1,8480	0,3806	0,9660	1,4196	0,0141*
M x S	1	1,3902	0,8877	1,0621	0,0007	1,5138	8,2012*	0,0043
L x M x S	1	0,0034	0,0038	0,7657	0,0075	0,5512	0,5886	0,0126*
Erro	24	0,3747	0,2959	1,2268	1,9402	1,8178	0,5234	0,0016
C.V (%)		42,57	39,55	9,93	20,75	29,18	25,32	16,68

* - Significativo ao nível de 5%, pelo teste F

NB – número de brotações;

NB > 1cm– número de brotações maiores que um centímetro;

CPA – Comprimento da parte aérea em centímetros;

CSR – Comprimento do sistema radicular em centímetros;

MFPA – Massa fresca da parte aérea em gramas;

MFSR – Massa fresca do sistema radicular em gramas;

MST – Massa seca total em gramas.

TABELA 3: Médias do número de brotações (NB) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob dois tipos de regulador de crescimento e dois tipos de intensidades luminosas. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Tipos de Luz	Regulador de Crescimento	
	BAP	ANA
Natural	1,39 B	1,00 A
Artificial	2,35 A	1,00 A

As médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados concordam com os de outros autores (Raman 1977; Lameira 1987; Godinho 1991 e Grattapaglia & Machado 1998), os quais relatam que o BAP é um regulador de crescimento fundamental para a multiplicação *in vitro* de diversas espécies frutíferas.

Como era previsível, o meio de enraizamento, sem BAP, não foi eficiente na multiplicação do material vegetal, uma vez que, o grupo de reguladores de crescimento ao qual pertence o ANA (auxina) apresenta o enraizamento como principal resposta biológica. Entretanto, alguns autores têm relatado que um balanço hormonal entre auxinas e citocininas é fundamental para multiplicação (Quoirin & Lepoivre, 1977; Hu & Wang, 1983).

O emprego da luz artificial proporcionou maior número de brotações do que a luz natural. O ambiente da sala de crescimento proporcionou melhores condições para a obtenção de maiores taxas de multiplicação celular, conseqüentemente produzindo maior número de brotações. Possivelmente, a alta irradiação e alta temperatura podem ter sido fatores deletérios, os quais ocorreram em condição de luz natural, resultando em baixas taxas de divisão celular. Resultados similares foram encontrados por Kitto & Janick (1981) em

trabalho com micropropagação de citrange Carrizo, no qual houve diminuição no número de partes aéreas em explantes expostos a altas intensidades luminosas, uma vez que as divisões celulares iniciais dos explantes e o crescimento de tecidos de calus são, às vezes, impedidos pela luz, como foi afirmado por George (1993b). Em relação a luz, a exposição a elevadas densidades de fluxo de fótons fotossintéticos, pode levar a danos por foto-inibição e foto-oxidação do aparato fotossintético, sendo exacerbada por fatores de estresse adicionais, tais como os baixos níveis de CO₂ e elevadas temperaturas (Powels, 1984).

Contrariamente a estes resultados, Kodym & Zapata-Arias (1999) observaram que as maiores taxas de multiplicação de explantes de bananeira ‘Grande Naine’, foram obtidas sob luz natural, em detrimento da luz artificial. Entretanto, naquele trabalho, a intensidade luminosa nas salas de crescimento foi de 65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por um fotoperíodo de 16 h, ou seja, quase o dobro da intensidade luminosa utilizada nas salas de crescimento em Cruz das Almas (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Essa elevada intensidade luminosa pode ter influenciado negativamente nas taxas de multiplicação dos materiais sob luz artificial.

4.1.2 Número de brotações maiores que 1 centímetro (NB > 1cm)

Os resultados superiores obtidos para o número de brotações maiores que 1centímetro (Tabela 4) foram também na presença de luz artificial e meio de multiplicação, comportando-se de forma semelhante aos resultados observados anteriormente.

Sob intensidade luminosa de 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ou seja, nas condições de luz artificial em sala de crescimento, as brotações apresentaram médias de 2,14 cm de comprimento. Estes resultados podem representar maior facilidade para os trabalhos de repicagem, no que se refere ao manuseio dos explantes nas câmaras de fluxo laminar. Como consequência direta, esta maior facilidade

tenderá a aumentar a velocidade de trabalho dos operadores de repicagem, melhorando os rendimentos dos laboratórios de micropropagação comercial, permitindo maior economia com a mão de obra.

TABELA 4: Médias do número de brotações maiores que 1 centímetro (NB>1cm) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob dois tipos de regulador de crescimento e dois tipos de intensidades luminosas. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Tipos de Luz	Regulador de Crescimento	
	BAP	ANA
Natural	1,35 B	1,00 A
Artificial	2,14 A	1,00 A

As médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

4.1.3 Comprimento da parte aérea (CPA)

Pelos resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que os comprimentos superiores da parte aérea dos explantes foram obtidos sob luz natural, com média de 11,80 cm, o que corrobora resultados obtidos por Seko & Nishimura (1996), em trabalho com regeneração de plântulas de arroz a partir de cultura de calos, no qual foram obtidos os maiores comprimentos das brotações sob a mais alta intensidade luminosa, de $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, num fotoperíodo de 24 h, tendo resultado também na sobrevivência de 100% dos explantes. Apesar dos resultados obtidos por estes autores terem sido em condições de luz artificial, a intensidade luminosa foi semelhante aos valores observados para a condição de casa de vegetação do presente trabalho, reforçando os resultados verificados.

TABELA 5: Médias dos comprimentos da parte aérea (CPA), em centímetros, de explantes de bananeira Prata Anã *in vitro* em função de condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	CPA (cm)
Luz Natural	11,80 a
Luz Artificial	10,49 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste F.

Como pode ser observado pela Tabela 6, foram os explantes em meio de enraizamento que apresentaram os maiores comprimentos da parte aérea, com média de 14,43 cm de altura. Taiz (2004) afirma que uma das principais funções das auxinas nos vegetais superiores é a regulação do crescimento por alongamento de caules jovens e coleótilos.

TABELA 6: Médias do comprimento da parte aérea (CPA), em centímetros, de explantes de bananeira Prata Anã *in vitro* em função de diferentes tipos de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Reguladores de Crescimento	CPA (cm)
ANA	14,43 a
BAP	7,86 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste F.

Os resultados verificados para esta variável demonstram que a luz natural é capaz de promover maior crescimento da parte aérea do que a luz artificial. Isto é particularmente importante para os explantes em fase de enraizamento, pois a manipulação das plântulas enraizadas de maior tamanho facilita o plantio na fase de aclimatização, além de proporcionar um desenvolvimento *ex vitro* mais rápido, permitindo a rápida emissão de novas folhas, as folhas de transição, mais adaptadas às condições ambientais adversas, que são verificadas na casa de vegetação e em campo. Neste aspecto, ocorre redução de perdas na fase de aclimatização, reduzindo os custos de produção da muda micropropagada.

4.1.4 Comprimento do sistema radicular (CSR)

De forma independente, os fatores luz, sacarose e meio foram responsáveis pela indução do maior comprimento das raízes. Como pode ser verificado nas Tabelas 7, 8 e 9, nos explantes cultivados sob luz natural, as raízes foram maiores do que os cultivados sob luz artificial. Resultados similares foram verificados por Kodym & Zapata-Arias (1998) em explantes de bananeira ‘Grande Naine’, que formaram raízes mais fortes e vigorosas sob luz natural. A concentração de sacarose de 15g L⁻¹ promoveu maiores comprimentos das raízes do que a concentração de 30g L⁻¹, que é normalmente utilizada na fase de multiplicação. A disponibilidade de uma fonte de energia é indispensável para que ocorra a rizogênese (Grattapaglia & Machado, 1998), no entanto, em grandes concentrações pode ser prejudicial como observado neste trabalho. Desta forma a concentração de sacarose no meio de cultura deve ser mantida entre 2 a 3 %.

TABELA 7: Médias do comprimento do sistema radicular (CSR), em centímetros, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em função de diferentes condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	CSR (cm)
Luz Natural	7,36 a
Luz Artificial	6,06 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 8: Médias do comprimento do sistema radicular (CSR), em centímetros, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em função de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	CSR (cm)
15 g L ⁻¹	7,56 a
30 g L ⁻¹	5,86 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 9: Médias do comprimento do sistema radicular (CSR), em centímetros, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função de meios de cultura com diferentes reguladores de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Reguladores de Crescimento	CSR (cm)
ANA	9,56 a
BAP	3,86 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste F.

Em alguns casos a redução na concentração ou até mesmo a eliminação pode ser favorável, por facilitar a passagem das plantas para o estado autotrófico no transplântio (Debergh, 1988). Como era de se esperar, o meio contendo auxina foi bem superior ao que continha citocinina, na formação do sistema radicular. Estes resultados corroboram informações de Hu & Wang (1983) de que a auxina está presente em 86% dos meios de enraizamento, e que o ANA parece ser a auxina com maior eficiência no estímulo ao enraizamento no cultivo *in vitro*.

Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que a qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento. Partes aéreas pequenas não enraizam bem e necessitam de uma fase intermediária de alongamento. A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes. Enquanto as duas primeiras fases (às vezes consideradas uma só) respondem ou dependem de auxina, o crescimento das raízes é inibido pela presença deste fitorregulador, cuja produção, transporte e acúmulo são promovidos pela alta intensidade luminosa, como demonstrado por (Andersen, 1986).

Estes resultados verificados para o maior comprimento do sistema radicular sob alta intensidade luminosa podem ser explicados pelo fato de que a

luz é um importante fator, principalmente para o crescimento das partes aéreas e alongamento de raízes, o que irá dotar a planta de maior resistência ao transplântio.

4.1.5 Massa fresca da parte aérea (MFPA)

A interação dos fatores luz e meio foi responsável pelas maiores médias de massa fresca da parte aérea, nos explantes de bananeira, como pode ser observado na Tabela 10.

TABELA 10: Médias da massa fresca da parte aérea (MFPA) de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* sob dois tipos de regulador de crescimento e duas diferentes condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	Regulador de Crescimento	
	BAP	ANA
Natural	2,53 A	7,72 A
Artificial	2,64 A	5,57 B

As médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

O mais alto valor verificado para esta variável foi obtido com os explantes em meio de enraizamento sob luz natural. Kozai et al. (1995), trabalhando com *Solanum tuberosum in vitro*, obtiveram os maiores pesos frescos sob as mais altas intensidades luminosas ($140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em fotoperíodo de 16 h. Como observado anteriormente, para o comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento do sistema radicular (CSR), a luz natural foi a que resultou nos maiores valores para estas variáveis, e os explantes em meio de

enraizamento também produziram maior comprimento da parte aérea e do sistema radicular do que os explantes em meio de multiplicação. Como consequência, as maiores massas frescas foram também verificadas para explantes em meio de enraizamento sob luz natural, sendo que para esta variável, os dois fatores apresentaram efeitos sinérgicos. A principal função do BAP é promover a quebra da dominância apical e proliferar as gemas axilares. Desta forma, os explantes em meio de multiplicação apresentam um menor desenvolvimento da parte aérea do que os materiais em meio de enraizamento. Neste sentido, pode-se afirmar que a fase de enraizamento sob luz natural é vantajosa, haja vista que com a promoção de uma maior parte aérea, as possibilidades de sobrevivência na fase de aclimatização aumentam pelo maior vigor das plântulas, associado a um correspondente vigoroso sistema radicular.

4.1.6 Massa fresca do sistema radicular (MFSR)

As maiores massas frescas do sistema radicular foram obtidos pela interação dos fatores meio e sacarose, sendo que os explantes em fase de enraizamento com meio de cultura suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose compuseram a combinação que proporcionou os maiores valores dos mesmos (Tabela 11).

Diversos autores relatam que a diminuição na concentração de sacarose no meio de cultura, anteriormente a fase de aclimatização, é benéfica por contribuir para a promoção da passagem do estado heterotrófico para o autotrófico (Boulay, 1984; Mousseau, 1986; Kozai et al., 1987; Fujiwara et al., 1988; Kozai et al., 1988; Glazy & Compan, 1992; Fournioux & Bessis, 1993).

TABELA 11: Médias da massa fresca do sistema radicular (MFSR) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* sob dois tipos de regulador de crescimento e duas concentrações de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Regulador de Crescimento	
	BAP	ANA
15 g L ⁻¹	1,42 A	3,62 B
30 g L ⁻¹	1,07 A	5,30 A

As médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos não seguiram a mesma tendência verificada para o comprimento do sistema radicular (CSR), que se mostrou beneficiado pela luz natural em detrimento da luz artificial e também pela concentração de apenas 15g L⁻¹ de sacarose, em detrimento de 30g L⁻¹. Uma explicação para estas respostas está no fato de que a sacarose é necessária para o desenvolvimento de células do xilema e floema em tecidos cultivados *in vitro*. Aloni (1980) afirma que a quantidade de vasos xilemáticos é dependente da concentração de sacarose no meio de cultura. Desta forma, é provável que a dose de 30g L⁻¹ seja a ideal para uma perfeita conexão das raízes com os vasos xilemáticos da plântula, resultando em maiores taxas de absorção de água pelas raízes, elevando seus calibres e conseqüentemente os seus pesos da matéria fresca.

4.1.7 Massa seca total (MST)

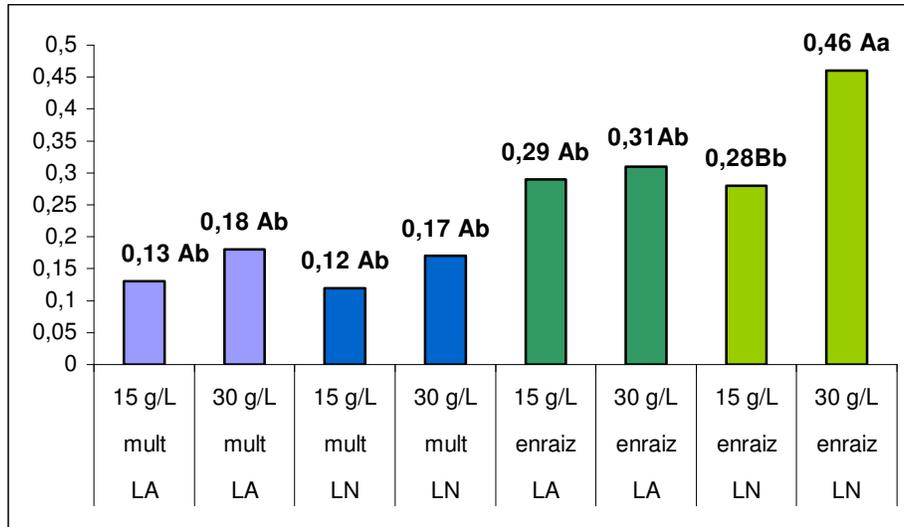
A massa seca total, cujo valor é a representação do crescimento efetivo da parte aérea e do sistema radicular, teve a influência da interação dos três fatores. O meio de enraizamento, suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose na

condição de luz natural, foi responsável pela promoção dos maiores valores para a variável massa seca total (MST), como pode ser visto na Tabela 12 e Figura 7.

TABELA 12: Médias da massa seca total (MST) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* sob duas concentrações de sacarose, com dois diferentes tipos de regulador de crescimento e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Regulador de Crescimento			
	BAP		ANA	
	Luz Artificial	Luz Natural	Luz Artificial	Luz Natural
15 g L ⁻¹	0,13 Ab	0,12 Ab	0,29 Aa	0,28 Ba
30 g L ⁻¹	0,18 Ab	0,17 Ab	0,31 Ab	0,46 Aa

As médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical e minúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.



As letras maiúsculas representam a comparação das médias quando fixadas a condição de luminosidade e os tipos de reguladores de crescimento, variando a concentração de sacarose. As letras minúsculas representam a comparação entre todas as categorias dos três fatores testados.

Figura 7: Representação gráfica das médias da massa seca total (MST) em explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* sob duas concentrações de sacarose, com dois diferentes tipos de regulador de crescimento e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Estes resultados reforçam a superioridade das plântulas cuja fase de enraizamento é conduzida sob luz natural. Nestas condições, a luz natural juntamente com a maior concentração de sacarose foram responsáveis por uma elevação de mais de 58% no peso da matéria seca total, sobre a condição de luz artificial com 15g L⁻¹ de sacarose, e 48,38% sobre a condição de luz artificial com 30g L⁻¹ no meio de enraizamento. Kozai et al. (1987), em trabalho com *Cymbidium*, verificaram que sob alta intensidade luminosa (230 μmol m⁻² s⁻¹), com ambiente enriquecido com CO₂, ocorrem aumentos na massa seca de 70% a 100% sobre o tratamento de baixa intensidade luminosa (51 μmol m⁻² s⁻¹), sem enriquecimento com CO₂, não tendo havido diferenças entre as concentrações de sacarose testadas. Os resultados obtidos são semelhantes aos verificados para a

massa fresca do sistema radicular, evidenciando que a luz natural é um forte agente promotor de crescimento da parte aérea e do sistema radicular, e a maior concentração de sacarose é necessária para promover uma perfeita conexão das raízes com os vasos xilemáticos das plântulas, aumentando as taxas de absorção de água e nutrientes pelas raízes, ainda no ambiente *in vitro*, na fase de enraizamento.

4.2 Aspectos da anatomia foliar nos explantes *in vitro*

As seções transversais obtidas a partir das folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’, nas diversas combinações dos fatores condições de luminosidade, com diferentes concentrações de sacarose e diferentes tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura, apresentaram organização dorsiventral, com camada única de parênquima palicádico e várias camadas de parênquima esponjoso, com amplas cavidades de ar e estômatos nas duas epidermes, caracterizando uma espécie anfihipoestomática com estômatos do tipo tetracítico (Figura 8). Estômatos deste tipo são envolvidos por quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células guarda, sendo o par restante polar e freqüentemente menor (Alquini et al., 2003). Não foi verificada a presença de qualquer tipo de tricoma em ambas as superfícies das lâminas foliares.

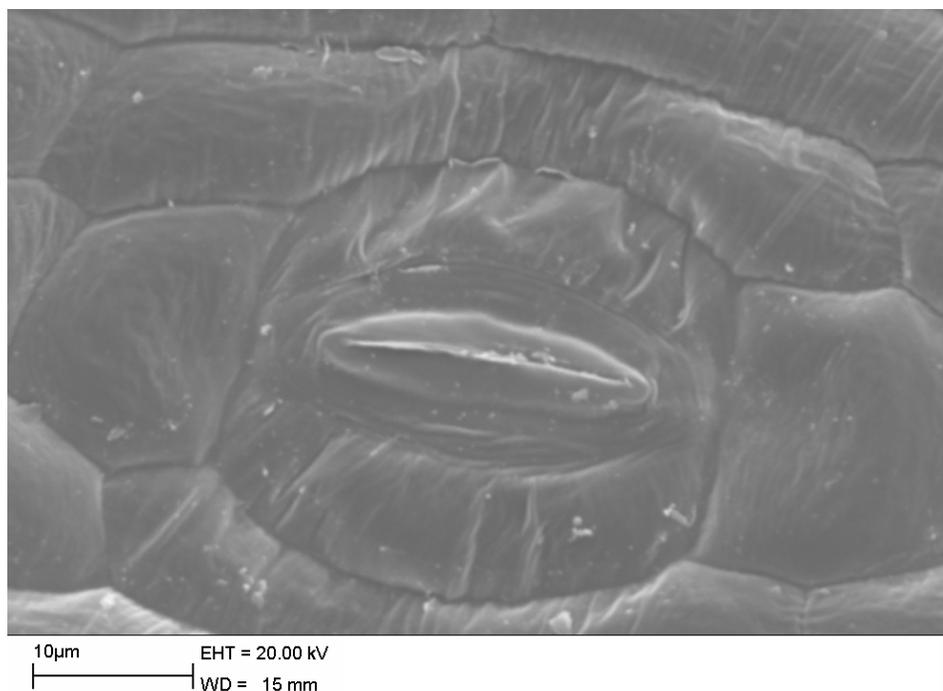


FIGURA 8: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura de estômato (tetracítico) em meio de multiplicação sob luz artificial, na superfície abaxial em folha de explante de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*. UFLA, Lavras – MG, 2005.

As nervuras medianas em seções transversais, na posição P1 nos diferentes tratamentos, apresentaram feixes vesculares colaterais com a presença de cavidades de ar localizadas lateralmente ao feixe vascular (Figura 8).

Várias diferenças anatômicas foram observadas nos tecidos foliares das plântulas cultivadas sob luz artificial e sob luz natural, principalmente com relação à espessura total do limbo; espessura da camada de células paliçádicas e quanto à organização e compactação das células do mesofilo, como pode ser observado nas Figuras 9, 10, 11 e 12. Foram igualmente verificadas diferenças

marcantes na densidade estomática, na topografia e dimensões dos estômatos, das folhas sob os dois ambientes de intensidade luminosa testados.

4.2.1 Anatomia foliar na posição P1.

Nas avaliações da posição P1 (região compreendida pela nervura mediana), em todas as combinações dos três fatores testados conjuntamente, a camada epidérmica, tanto da superfície abaxial quanto adaxial, apresentou-se uniestratificada com espessa camada da hipoderme.

Pode-se observar pela análise de variância (Tabela 13) que, à exceção das variáveis espessura da epiderme superior (ES) e diâmetro do feixe vascular menor (DE), todas as demais apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (espessura da hipoderme (HP); diâmetro do feixe vascular maior (DA); espessura do parênquima cortical (PC); espessura da epiderme inferior (EI); número de feixes perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF); espessura do esclerênquima (EC) e espessura total da lâmina foliar (ET)).

TABELA 13: Resumo da análise de variância para caracteres anatômicos, em seção transversal (Posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em meios de cultura de multiplicação e enraizamento, sob condições de luz artificial e luz natural, e duas diferentes concentrações de sacarose (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

F.V	G.L	Q.M's								
		ES	HP	DA	DE	PC	EI	NF	EC	ET
Luz	1	42,7248	2074,4640*	179,9032	834,4822	15449,2233*	0,7700	0,4000	6,9472	29864,0390*
Sacarose	1	0,0372	1850,9602	969,9295	134,9827	1404,8175	0,0013	0,4000	0,0015	104,0707
Meio	1	11,0460	3077,5684*	11371,3956*	464,4422	90442,9530*	23,5776	0,4000	1164,3489*	128965,5496*
L x S	1	0,5198	5105,3402*	1201,1064*	834,1168	33902,0885*	49,9746*	2,5000*	1,0725	59927,7256*
L x M	1	56,6440	1235,8768	40,7434	15,7753	9664,9483	22,1265	4,9000*	203,0854	3065,3006
M x S	1	6,9555	1240,7732	159,9600	1413,9588	38614,4174*	0,1199	2,5000*	200,9280	25325,0497*
L x M x S	1	6,9388	3018,2112*	25,0430	12,3654	1359,4394	2,4552	0,0000	104,1030	7823,7684
Erro	32	31,3220	482,0057	266,3851	346,5269	3111,2342	7,6486	0,2000	80,9343	4514,2357
C.V (%)		30,95	50,98	17,46	50,68	16,78	20,68	19,88	51,72	16,48

* - Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

Para a variável resposta espessura da hipoderme (HP), a interação tripla (LxMxS) foi significativa. Para o diâmetro do feixe vascular maior (DA), houve interação significativa entre os fatores luz e sacarose. A variável resposta espessura do parênquima cortical (PC) apresentou significância para a interação entre os fatores meio e sacarose, e também para a interação entre os fatores luz e sacarose. Para a espessura da epiderme inferior (EI) foi verificada uma interação significativa entre os fatores luz e sacarose. A quantidade de feixes no sentido perpendicular ao eixo de envergadura da lâmina foliar, que é medida pela variável NF, apresentou interação significativa em todas as interações duplas testadas, ou seja, luz com sacarose; luz com meio e meio com sacarose. A espessura da camada de fibras perivasculares (esclerênquima) abaixo do menor feixe vascular (EC) apresentou resultado significativo isoladamente para o fator meio. Os resultados verificados, para a variável espessura total da seção transversal das folhas estudadas (ET), demonstram que houve interação dupla significativa entre os fatores luz e sacarose e também para os fatores meio e sacarose.

4.2.2 Espessura da epiderme superior (ES) na posição P1.

A espessura da epiderme superior das folhas não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Observou-se que os dois tipos de meios de cultura testados não foram capazes de afetar esta variável resposta, o que também se verificou para as condições de luminosidade e para as duas concentrações de sacarose, como pode ser visto na Tabela 14.

TABELA 14: Médias da espessura da epiderme superior (ES) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função dos fatores reguladores de crescimento, condições de luminosidade e concentrações de sacarose isoladamente, nos meios de cultura. UFPA, Lavras – MG, 2005.

	Reguladores de Crescimento		Condições de Luminosidade		Concentrações de Sacarose	
	(BAP)	(ANA)	Artificial	Natural	15 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
ES (μm)	17,55 a	18,60 a	19,11 a	17,04 a	18,05 a	18,11 a

As médias seguidas da mesma não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Smith et al. (1986) em trabalho com *Betula platyphylla*, no qual se comparou a anatomia e fisiologia de três diferentes tipos de materiais vegetais, ou seja, brotações cultivadas *in vitro*, plântulas germinadas em um sistema com permanente controle de umidade e plantas em casa de vegetação. Constatou-se que as espessuras das epidermes superiores não diferiram estatisticamente em nenhum dos três diferentes ambientes de cultivo.

4.2.3 Espessura da hipoderme (HP) na posição P1.

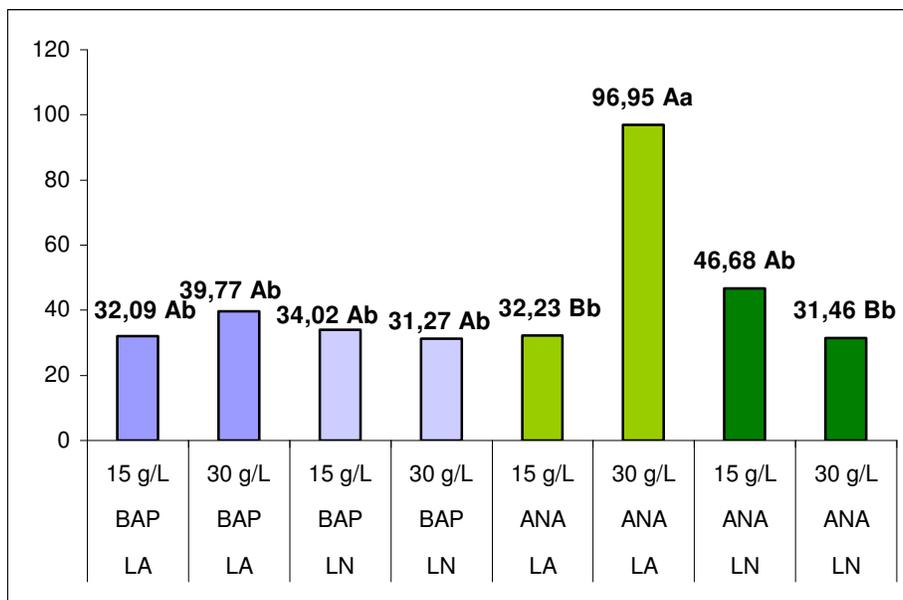
A interação dos três fatores resultou nas mais elevadas médias de espessura da hipoderme, como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 15 e Figura 13.

TABELA 15: Médias da espessura da hipoderme (HP) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores reguladores de crescimento, condições de luminosidade e concentrações de sacarose isoladamente, nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	Reguladores de Crescimento			
	ANA		BAP	
	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹
Natural	46,68 Aa	31,46 Ba	34,02 Aa	31,27 Aa
Artificial	32,23 Ab	96,95 Aa	32,09 Ab	39,77 Ab

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

A condição de luz artificial, com os explantes em meio de enraizamento, numa concentração de 30g L⁻¹ de sacarose foi a que promoveu a maior espessura da hipoderme.



As letras maiúsculas representam a comparação das médias quando fixadas a condição de luminosidade e os tipos de reguladores de crescimento, variando a concentração de sacarose. As letras minúsculas representam a comparação entre todas as categorias dos três fatores testados.

Figura 13: Médias da espessura da hipoderme (HP) em μm , da seção transversal (posição P1) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

4.2.4 Diâmetro do feixe vascular maior (DA) na posição P1.

O diâmetro do feixe vascular maior foi influenciado pela interação dos fatores luz e sacarose, como pode ser verificado na Tabela 16. Esta variável representa a intensidade da atividade metabólica das plântulas, na medida em que quanto maior for o diâmetro do feixe vascular, maior será a possibilidade de transporte de fotoassimilados pelo floema para outras partes da planta e também maior será o transporte de água e sais minerais pelo xilema, a partir das raízes.

TABELA 16: Médias do diâmetro do feixe vascular maior (DA) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e das condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Condições de Luminosidade	
	Natural	Artificial
30 g L ⁻¹	96,12 Aa	80,92 Bb
15 g L ⁻¹	95,01 Aa	101,73 Aa

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

A mais baixa concentração de sacarose sob luz artificial mostrou-se responsável pela promoção do maior DA. Resultados correlacionados com esta tendência foram verificados também por Short et al. (1987), em trabalho com couve-flor e crisântemo, no qual as plântulas que foram cultivadas em meio de cultura sem sacarose, evidenciaram maiores taxas fotossintéticas do que as plântulas mantidas em meio de cultura com sacarose. Grout & Price (1987), em trabalho com plântulas de morangueiro cultivadas *in vitro*, com a presença de sacarose no meio de cultura, verificaram uma reduzida atividade carboxilase da enzima Ribulose 1,5 Bisfosfato Carboxilase Oxigenase (RuBP) e um negativo balanço de carbono. Estas folhas não conseguiram sobreviver após terem sido transferidas para um meio de cultura sem sacarose. Todavia é importante observar que o cultivo *in vitro*, com total ausência de sacarose no meio, irá restringir a atividade fotossintética devido a reduzida concentração de CO₂ presente no frasco de cultivo. Neste sentido, uma redução na concentração de sacarose, como foi realizado no presente trabalho, é menos drástica do que a total eliminação.

4.2.5 Diâmetro do feixe vascular menor (DE) na posição P1.

No estudo da variável diâmetro do feixe vascular de menor calibre nas folhas de bananeira *in vitro*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Verificou-se que tanto os meios de cultura testados quanto as condições de luminosidade e as duas concentrações de sacarose, isoladamente, ou em interação, não foram capazes de afetar esta variável resposta, como pode ser visto na Tabela 17.

TABELA 17: Médias do diâmetro do feixe vascular menor (DE) em μm , (posição P1), em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função dos fatores reguladores de crescimento nos meios de cultura, das condições de luminosidade e das concentrações de sacarose, isoladamente. UFLA, Lavras – MG, 2005.

	Reguladores de Crescimento		Condições de Luminosidade		Concentrações de Sacarose	
	BAP	ANA	Artificial	Natural	15 g L ⁻¹	30 g L ⁻¹
DFME (μm)	33,32 a	40,13a	41,29 a	32,16 a	34,89 a	38,56 a

As médias seguidas da mesma não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo test F.

Da mesma forma que o observado para a variável espessura da epiderme superior (ES), nota-se que a variável DE não fornece resultados que possam indicar o grau de adaptação da plântula às diferentes condições ambientais testadas neste trabalho.

4.2.6 Espessura do parênquima cortical (PC) na posição P1.

Como pode ser observado na análise de variância, as espessuras do PC foram influenciadas significativamente pela interação dos fatores meio e sacarose e também na interação de luz com a sacarose. Na Tabela 18 são descritos os resultados das espessuras desta variável sob as duas concentrações de sacarose testadas com as duas condições de luminosidade.

TABELA 18: Médias da espessura do parênquima cortical (PC) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose (30g L^{-1} ; 15g L^{-1}) e das condições de luminosidade (natural; artificial). UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Condições de Luminosidade	
	Natural	Artificial
30 g L^{-1}	277,70 Bb	375,23 Aa
15 g L^{-1}	347,78 Aa	328,86 Aa

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical, e minúsculas na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Verifica-se que sob luz artificial com quaisquer das duas concentrações de sacarose foram obtidas as maiores espessuras para esta variável. Conforme tem sido relatado em diversos trabalhos que avaliam o desempenho do cultivo *in vitro* sob altas intensidades luminosas, geralmente se observa a ocorrência de clorose nas folhas com perda de turgor (Kodym & Zapata-Arias, 1999; Lee et al. 1988; Powels, 1984). Neste trabalho, as menores espessuras do parênquima cortical foram obtidas sob as mais altas intensidades luminosas (luz natural), com 30g L^{-1} de sacarose, o que, muito provavelmente se deveu a perda de turgor

destas folhas produzidas *in vitro*. Desta forma, apurou-se que a condição da luminosidade artificial não provoca o dessecamento dos tecidos. Verificou-se também que a condição de luz natural com a suplementação de apenas 15g L⁻¹ de sacarose igualou-se as duas combinações de sacarose na luz artificial.

Na Tabela 19 observa-se que, a maior espessura do parênquima cortical, (PC) sob os dois tipos de meio de cultura testados com as duas concentrações de sacarose foi obtida com os explantes em meio de enraizamento, na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose. Estes resultados certamente se devem à capacidade de estímulo das auxinas para a o crescimento das partes aéreas e também devido às maiores atividades metabólicas sob baixas concentrações de sacarose no meio de cultura.

Pode-se dizer então que, para a obtenção de suficiente espessamento do parênquima cortical, a condição de luz artificial com a suplementação de apenas 15g L⁻¹ de sacarose no meio deve ser preferida por proporcionar também os maiores diâmetros dos feixes vasculares maiores (DA).

TABELA 19: Médias da espessura do parênquima cortical (PC) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose e dois tipos de regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Regulador de Crescimento	
	BAP	ANA
15 g L ⁻¹	259,70 A	416,94 A
30 g L ⁻¹	309,98 A	342,94 B

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

4.2.7 Espessura da epiderme inferior (EI) na posição P1.

Apesar da análise de variância ter mostrado uma resposta significativa da interação dos fatores luz e sacarose para a espessura da epiderme inferior, quando foram submetidos os dados ao teste de Scott-Knott, não se observou diferença entre as médias dos tratamentos para esta interação. Desta forma, observa-se que esta variável não é afetada pelos diferentes fatores testados neste trabalho, como pode ser visto pela Tabela 20.

TABELA 20: Médias da espessura da epiderme inferior (EI) em μm , da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Sacarose	Condições de Luminosidade	
	Natural	Artificial
30 g L ⁻¹	14,35Aa	12,39Aa
15 g L ⁻¹	12,10 Aa	14,62Aa

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

4.2.8 Número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da seção transversal da lâmina foliar (NF) na posição P1.

Os resultados verificados para esta variável resposta (NF), cuja grandeza também fornece um indício da intensidade da atividade metabólica realizada pelas plântulas, demonstram o efeito significativo das interações duplas dos

fatores luz e sacarose; luz e meio, e meio e sacarose, como podem ser observados pelas Tabelas 21, 22 e 23 respectivamente.

TABELA 21: Médias do número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF), da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Condições de Luminosidade	
	Natural	Artificial
30 g/L	1,80 Bb	2,50 Aa
15 g/L	2,50 Aa	2,20 Aa

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

TABELA 22: Médias do número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF), da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob diferentes condições de luminosidade e regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	Regulador de Crescimento	
	ANA	BAP
Natural	2,60 A	1,70 B
Artificial	2,10 B	2,60 A

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

TABELA 23: Médias do número de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar (NF), da seção transversal (posição P1) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores reguladores de crescimento e concentrações de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Regulador de Crescimento	
	ANA	BAP
15 g L ⁻¹	2,70 A	2,00 A
30 g L ⁻¹	2,00 B	2,30 A

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Os resultados observados para estas três interações duplas evidenciam que sob condições de luz natural, o maior NF é obtido em meio suplementado com apenas 15g L⁻¹ de sacarose. Já na condição de luz artificial, as duas concentrações de sacarose não apresentaram resultados diferentes para a promoção do maior NF.

Na Tabela 22 são apresentados os resultados que permitem afirmar que os maiores NF obtidos em meio de enraizamento, ocorrem na presença de luz natural. Já para os explantes em meio de multiplicação, os maiores NF são obtidos sob luz artificial.

Para os explantes em fase de multiplicação, verifica-se que as quantidades de feixes vasculares perpendiculares ao sentido de envergadura da lâmina foliar, com a suplementação de 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura e

15g L⁻¹, não diferiram entre si. Já para os explantes em fase de enraizamento, os maiores valores para esta variável são obtidos na concentração de apenas 15g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. Estes resultados confirmam os anteriormente verificados para os maiores números de brotações (NB) e maiores números de brotações maiores que um centímetro (NB>1cm), que apresentaram os maiores valores, na fase de multiplicação sob luz artificial. Igualmente verificado para a massa fresca da parte aérea (MFPA), na fase de enraizamento, e na condição de luz natural, que foram obtidas as maiores massas frescas da parte aérea, sendo que para esta mesma variável, os explantes em fase de multiplicação não apresentaram diferenças entre as MFPA nas duas condições de luz testadas.

Como estas variáveis e inferências refletem a atividade metabólica dos explantes, tanto na fase de multiplicação quanto de enraizamento, pode-se afirmar que, para a promoção das melhores condições de desenvolvimento *in vitro*, de explantes de bananeira ‘Prata Anã’, a fase de multiplicação deve ser conduzida sob luz artificial, com a suplementação de apenas 15g L⁻¹ de sacarose. Entretanto, para os explantes em fase de enraizamento, a atividade metabólica é mais intensificada pela condição de luz natural, com a suplementação também de apenas 15g L⁻¹ de sacarose.

Particularmente, para a fase de multiplicação, a obtenção de elevadas taxas de atividades metabólicas dos explantes representa uma grande importância, por proporcionar maiores taxas de multiplicação, contribuindo para aumentar a eficiência dos protocolos. Neste sentido, os resultados obtidos para NF são extremamente importantes para a definição das melhores condições de cultivo.

4.2.9 Espessura da camada de fibras perivasculares (esclerênquima - EC) na posição P1 (nervura mediana).

Dentre os fatores estudados, observa-se que somente o tipo de regulador de crescimento com efeito isolado foi capaz de influenciar nesta variável resposta, como pode ser visto na Tabela 24.

TABELA 24: Médias da espessura do esclerênquima (EC) em μm , na seção transversal (posição P1) em folhas de explantes bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função de tipos reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Reguladores de Crescimento	Espessura dos Esclerênquimas (μm)
ANA	22,78 a
BAP	11,99 b

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste F.

As células do tecido esclerenquimático são encontradas em faixas ou calotas, ao redor dos tecidos vasculares, fornecendo proteção e sustentação (Scatena & Dias, 2003). Como pôde ser visto anteriormente, foi no meio de enraizamento que foi obtido o maior desenvolvimento dos tecidos vegetais, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, o que deve ter afetado igualmente no espessamento do esclerênquima, protegendo o feixe vascular.

4.2.10 Espessura total da seção transversal da lâmina foliar (ET) na posição P1 (nervura mediana).

As espessuras totais da seção transversal da lâmina foliar na posição P1, foram influenciadas pelos tratamentos com interação dos fatores luz e sacarose, e também pela interação dos fatores meio e sacarose, como pode ser verificado nas Tabelas 25 e 26 respectivamente.

TABELA 25: Médias da espessura total da nervura mediana (ET) em μm , da seção transversal (posição P1) de folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em função da interação entre os fatores concentrações de sacarose e condições de luminosidade. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Condições de Luminosidade	
	Natural	Artificial
30 g L ⁻¹	343,19Bb	475,25Aa
15 g L ⁻¹	417,61Aa	394,37Ba

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Os resultados apresentados na Tabela 25 demonstram que as maiores espessuras das seções transversais das nervuras medianas obtidas sob luz natural, foram provenientes de meios de cultura suplementados com apenas 15g L⁻¹ de sacarose, ao passo que para os explantes sob luz artificial, a concentração de 30g L⁻¹ foi a que promoveu a maior espessura. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que sob alta densidade de fluxos fotosinteticamente ativos (DFFA) da luz natural, a dependência de uma fonte de sacarose é menor para se atingir maiores taxas fotossintéticas. Esta condição mais próxima de um metabolismo autotrófico provavelmente tenha induzido uma maior produção de

cloroplastos no tecido fotossintetizante (parênquima paliçádico), espessando-o mais acentuadamente.

4.2.11 Anatomia foliar na posição P2.

Como pode ser observado, pela Tabela 26, as variáveis avaliadas na posição P2 foram: espessura da epiderme superior – ES; espessura da hipoderme superior – HS; espessura do parênquima paliçádico – PP; espessura do parênquima esponjoso – PE; espessura da hipoderme inferior – HI; espessura da epiderme inferior – EI e espessura total da seção transversal – ET.

Nas avaliações da posição P2, verifica-se pela análise de variância (Tabela 26) que as variáveis resposta PE e EI não foram influenciadas pelos diversos tratamentos testados neste trabalho. Entretanto, as demais variáveis (ES; HS; PP; HI e ET) apresentaram significância para algumas interações entre os fatores testados.

4.2.12 Espessura da epiderme superior (ES) na posição P2.

Na posição P2, apesar do resultado significativo na interação entre os fatores meio e sacarose para a espessura da epiderme superior (ES), verifica-se pelo teste de médias que não houve diferença entre as espessuras obtidas pelo efeito destes dois fatores interagindo, como pode ser visto na Tabela 27.

TABELA 26: Resumo da análise de variância para caracteres anatômicos, da seção transversal (Posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meios de multiplicação e enraizamento suplementados com 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose, sob condições de luz artificial e luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.

F.V	G.L.	Q.M's						
		ES	HS	PP	PE	HI	EI	ET
Luz (L)	1	3,2433	3027,4260*	51,5971	1125,4027	272,2752	11,5670	10627,2740
Sacarose (S)	1	4,7403	314,3284	75,8727	0,3705	756,9000*	1,9847	347,9230
Meio (M)	1	10,5575	7364,4390*	925,1554*	5259,4542	1773,4248*	0,0714	54935,5204*
L x S	1	36,9216	6003,2350*	149,4982	18419,1180	1177,2250*	13,7945	37432,9830*
L x M	1	56,6202	5968,4933*	525,5525*	15725,5868	1323,1900*	0,0366	356,1105
M x S	1	158,0460*	2137,2978*	491,1907*	15325,2675	95,6664	9,0916	1300,6262
L x M x S	1	49,9746	4091,1130*	292,8433	2652,8265	416,1540*	1,7850	26045,2019*
Erro	32	32,4963	350,7855	110,4582	4842,5604	100,9998	9,4206	3283,9951
C.V (%)		26,16	21,78	34,19	38,21	15,89	19,95	14,35

* - significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 27: Médias da espessura da epiderme superior (ES) em μm , da seção transversal (posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose e regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Regulador de Crescimento	
	ANA	BAP
30 g L ⁻¹	23,94 A	18,94 A
15 g L ⁻¹	20,66 A	23,61 A

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

4.2.13 Espessura da hipoderme superior (HS) , na posição P2.

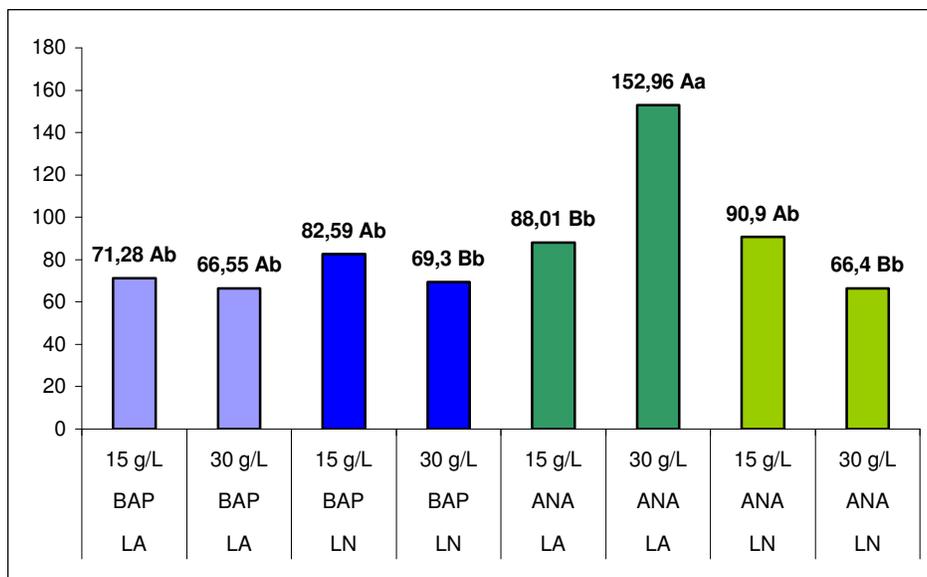
A espessura da hipoderme superior na posição P2 foi influenciada pela interação tripla dos fatores luz, meio e sacarose, como pode ser visto pelas médias na Tabela 28 e Figura 14.

Estes resultados confirmam a mesma tendência verificada na posição P1, em que a interação tripla dos fatores foi significativa para esta mesma variável, tendo sido verificadas as maiores espessuras da HS, para os explantes em meio de enraizamento, com 30g L⁻¹ de sacarose, na luz artificial.

Tabela 28: Médias da espessura da hipoderme superior (HS) em μm , da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeiras *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFPA, Belém – PA, 2005.

Condições de Luminosidade	Reguladores de Crescimento			
	ANA		BAP	
	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹
Natural	90,90 Aa	66,40 Bb	82,59 Aa	69,30 Ab
Artificial	88,01 Ab	152,96 Aa	71,28 Ab	66,55 Ab

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.



As letras maiúsculas representam a comparação das médias quando fixadas a condição de luminosidade e os tipos de reguladores de crescimento, variando a concentração de sacarose. As letras minúsculas representam a comparação entre todas as categorias dos três fatores testados.

Figura 14: Médias da espessura da hipoderme superior (HS) em μm , da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeiras *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

4.2.14 Espessura do parênquima paliçádico (PP), na posição P2.

Nas avaliações das espessuras médias dos PP na posição P2, verificou-se um efeito estatisticamente significativo da interação dupla dos fatores luz e meio (LxM), e também da interação dos fatores meio e sacarose (MxS), conforme pode ser verificado nas Tabelas 29 e 30.

Pelos resultados apresentados na Tabela 29, verifica-se que tanto na fase de multiplicação quanto de enraizamento, as espessuras dos PP não diferem entre si, nas condições de luminosidade natural e artificial. No entanto, sob

condições de luz artificial, os explantes em meio de enraizamento produzem PP's mais espessos do que os explantes em meio de multiplicação.

TABELA 29: Médias da espessura do parênquima paliçádico (PP) em μm , da seção transversal (posição P2) em folhas de explantes de bananeira 'Prata Anã' *in vitro*, sob diferentes condições de luminosidades e de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	Reguladores de Crescimento	
	BAP	ANA
Artificial	21,16 Ab	38,03 Aa
Natural	30,68 Aa	33,05 Aa

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Como se observa na Tabela 30, quando se estudou a interação dupla dos fatores meio e sacarose (MxS), verificou-se que em meio de multiplicação (BAP), a concentração de 15g L^{-1} de sacarose proporciona as maiores espessuras do PP. Já na fase de enraizamento, não houve diferença entre as duas concentrações de sacarose testadas.

Provavelmente, com a redução da concentração de sacarose no meio de multiplicação, os tecidos vegetais tenham sido estimulados à produção de cloroplastos, para a geração própria de cadeias de carbono por meio da atividade fotossintética, tendo provocado um maior espessamento do parênquima paliçádico, que é o principal tecido fotossintetizante na folha, onde são encontradas as maiores concentrações de cloroplastos.

TABELA 30: Médias da espessura do parênquima paliçádico (PP) em μm , da seção transversal (posição P2) em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, sob duas concentrações de sacarose e regulador de crescimento. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Concentrações de Sacarose	Regulador de Crescimento	
	BAP	ANA
15 g L ⁻¹	30,81 A	33,42 A
30 g L ⁻¹	21,04 B	37,67 A

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

4.2.15 Espessura do Parênquima Esponjoso (PE), na posição P2.

Na posição P2, não houve efeito de nenhum dos fatores isoladamente ou interagindo entre si, para a promoção da espessura do PE, como pode ser verificado na Tabela 26.

4.2.16 Espessura da Hipoderme Inferior (HI), na posição P2.

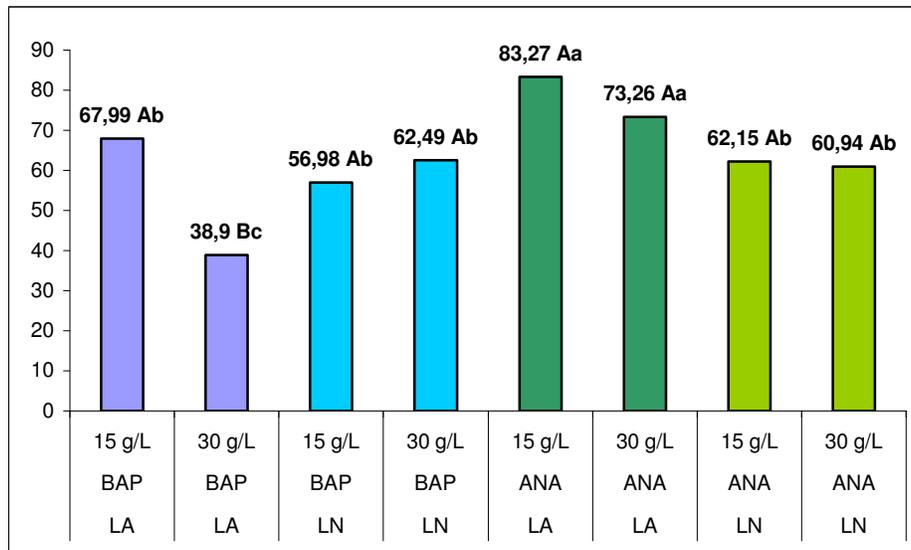
As avaliações, na posição P2, mostraram efeito estatístico significativo para a espessura da hipoderme inferior (HI) na interação tripla entre os três fatores estudados (LxMxS), como pode ser visualizado pela Tabela 31 e Figura 15.

Tabela 31: Médias da espessura da hipoderme inferior (HI) em μm , da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	Reguladores de Crescimento			
	ANA		BAP	
	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹
Natural	62,15 Ba	60,94 Aa	56,98 Aa	62,49 Aa
Artificial	83,27 Aa	73,26 Aa	67,99 Ab	38,90 Bc

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

Na posição P2, observa-se que são os explantes em meio de enraizamento, sob luz artificial, tanto na concentração de 15g L⁻¹ ou de 30g L⁻¹ de sacarose que foram responsáveis pelas maiores espessuras médias das HI. Estes resultados foram igualmente verificados para a espessura da hipoderme superior (HS) na mesma posição P2 e também para a espessura da hipoderme na posição P1. Considerando-se que a hipoderme é um parênquima aquífero, ou seja, um tecido responsável pelo acúmulo de água na folha, verifica-se que a luz artificial possivelmente não tenha provocado danos por dessecação deste tecido foliar, como na condição de luz natural.



As letras maiúsculas representam a comparação das médias quando fixadas a condição de luminosidade e os tipos de reguladores de crescimento, variando a concentração de sacarose. As letras minúsculas representam a comparação entre todas as categorias dos três fatores testados.

Figura 15: Médias da espessura da hipoderme inferior (HI) em μm , da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Comparando estes resultados com aqueles observados anteriormente nas avaliações de comprimento da parte aérea (CPA), em que o meio de enraizamento foi responsável pelo maior CPA, observa-se de igual modo um maior desenvolvimento de todos os demais tecidos que fazem parte do mesofilo foliar.

4.2.17 Espessura da Epiderme Inferior (EI), na posição P2.

Pelos resultados apresentados na Tabela 26, observa-se que na posição P2 não houve efeito dos tratamentos sobre esta variável.

4.2.18 Espessura Total (ET) da lâmina foliar, na posição P2.

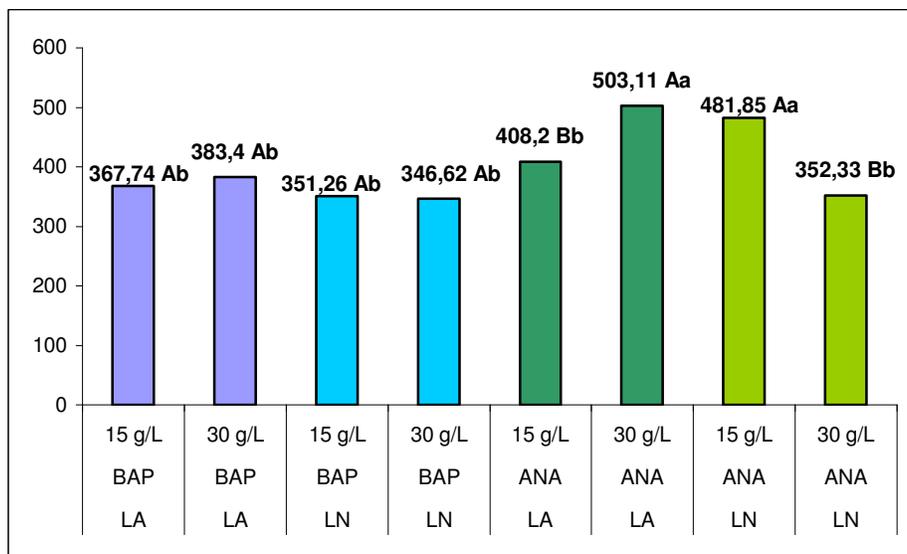
A interação tripla dos fatores LxSxM, na posição P2, foi estatisticamente significativa para a variável resposta ET, conforme se observa na Tabela 32 e Figura 16.

Tabela 32: Médias da espessura total (ET) em μm , da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeiras *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e tipos de reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Condições de Luminosidade	Reguladores de Crescimento			
	ANA		BAP	
	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹	15g L ⁻¹	30g L ⁻¹
Natural	481,85 Aa	352,33 Bb	351,26 Ab	346,62 Ab
Artificial	408,20 Ab	503,11 Aa	367,74 Ab	383,40 Ab

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Scott-Knott.

De maneira geral, pode-se observar que as maiores espessuras totais das seções transversais das lâminas foliares dos explantes de bananeira são obtidas em meio de enraizamento sob luz artificial, tanto nas concentrações de 15g L⁻¹ quanto de 30g L⁻¹. Estes resultados seguiram a mesma tendência do que foi verificado para as espessuras das hipodermes superiores e inferiores, pois como pode ser observado nas Figuras 9, 10, 11 e 12, colunas B, são justamente as hipodermes que ocupam os maiores espaços na seção transversal da folha, influenciando predominantemente na espessura total da lâmina foliar.



As letras maiúsculas representam a comparação das médias quando fixadas a condição de luminosidade e os tipos de reguladores de crescimento, variando a concentração de sacarose. As letras minúsculas representam a comparação entre todas as categorias dos três fatores testados.

Figura 16: Médias da espessura total ET em µm, da seção transversal (posição P2) de folhas de explantes de bananeira *in vitro*, em função da interação entre os fatores condições de luminosidade, concentrações de sacarose e reguladores de crescimento nos meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

4.3 Densidade estomática e dimensões dos estômatos nas superfícies abaxial e adaxial das folhas dos explantes de bananeira.

Para a análise dos resultados das densidades estomáticas e dimensões dos estômatos na superfície abaxial das folhas, foram realizadas análises estatísticas por tratamentos separados em dois grupos distintos, ou seja, os tratamentos na fase de multiplicação e tratamentos na fase de enraizamento, conforme a descrição da Tabela 1. Desta forma, foi definido a melhor condição ambiental, tanto para a fase de multiplicação quanto de enraizamento, que proporcionou a maior densidade estomática, acompanhada da necessária funcionalidade dos estômatos.

4.3.1 Densidade estomática e dimensões dos estômatos na superfície abaxial das folhas.

Nas Tabelas 33 e 34, são apresentados os resumos das análises de variância para os tratamentos nas fases de multiplicação e enraizamento respectivamente.

TABELA 33: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de multiplicação, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15g L⁻¹ e 30g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.

F.V.	G.L.	QM's			
		NE	DP	DE	DP/DE
Tratamentos	3	3008,1493*	57,5335*	60,1140*	0,3910*
Erro	76	465,7482	4,2115	5,2465	0,0843
CV (%)		23,15	6,16	12,37	15,78

*- Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

NE – Número de Estômatos

DE – Diâmetro Equatorial

DP – Diâmetro Polar

TABELA 34: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de enraizamento, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15g L⁻¹ e 30g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.

F.V.	G.L.	QM's			
		NE	DP	DE	DP/DE
Tratamentos	3	2150,2426*	43,7325*	68,5497*	0,1658
Erro	76	496,0103	6,6427	7,7809	0,0831
CV (%)		20,54	8,43	15,88	16,17

*- Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

NE – Número de Estômatos

DE – Diâmetro Equatorial

DP – Diâmetro Polar

Observa-se então que houve efeito dos tratamentos para todas as três variáveis analisadas, tanto na fase de multiplicação quanto de enraizamento, como pode se verificar pelas Tabelas 35 e 36 respectivamente.

TABELA 35: Médias das variáveis resposta analisadas, nas seções paradérmicas da superfície abaxial, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de multiplicação, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

TRATAMENTOS	Variáveis Resposta			
	N.E.	D.P. (µm)	D.E. (µm)	D.P./D.E.
T1	79,92 b	33,80 b	17,20 c	2,01 a
T2	109,52 a	31,87 c	17,20 c	1,88 a
T5	93,24 b	32,11 c	18,76 b	1,74 b
T6	90,28 b	35,52 a	20,86 a	1,71 b
CV (%)	23,15	6,16	12,37	15,78

As médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-knott.

Como pode ser observado pelos dados apresentados na Tabela 35, as maiores densidades estomáticas nos tratamentos em fase de multiplicação foram verificadas na condição de luz artificial com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose. Estes resultados foram igualmente verificados por Wetzstein & Sommer (1983), que também observaram maiores densidades estomáticas em plântulas *in vitro*, do que nas plântulas aclimatizadas ou nas plantas cultivadas nas condições de campo.

TABELA 36: Médias das variáveis resposta analisadas nos cortes paradérmicos da superfície abaxial, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de enraizamento, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

TRATAMENTOS	Variáveis Resposta			
	N.E.	D.P. (µm)	D.E. (µm)	D.P./D.E.
T3	95,46 b	32,13 a	19,83 a	1,66 a
T4	119,88 a	29,16 b	16,48 b	1,79 a
T7	112,48 a	31,51 a	18,25 a	1,79 a
T8	105,82 a	29,46 b	15,69 b	1,88 a
CV (%)	20,54	8,43	15,88	16,17

As médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-knott.

No entanto, sabe-se que a análise da densidade estomática, pura e simples, não é um bom parâmetro de verificação da adaptabilidade anatômica das espécies à aclimatização. Wardle et al. (1983) verificaram que as plântulas de *Liquidambar styraciflua* em fase de aclimatização apresentaram estômatos em formato elipsóide, deprimidos em relação à superfície foliar e em menor densidade do que as plântulas *in vitro*. Ao analisarmos as dimensões dos

estômatos do tratamento 2, verificamos o menor diâmetro polar, juntamente com o menor diâmetro equatorial.

Observa-se que a relação entre os DP e DE fornece um bom indicativo do formato dos estômatos, na medida em que quanto maior esta relação, mais elipsóide é o formato estomático, e maior a sua funcionalidade. Verifica-se que o inverso, ou seja, quanto menor esta relação, menos elipsóide é o formato estomático, e menos funcional é o estômato. Tem-se portanto, nesta variável, um bom indicativo da funcionalidade dos mesmos. Verifica-se então, que o Tratamento 2 apresentou uma relação DP/DE de 1,88, que é a maior relação, no entanto, não foi diferente do verificado para o Tratamento 1.

É necessário destacar que os explantes em fase de multiplicação necessitam de ótimos níveis de atividades metabólicas para que ocorram as maiores taxas de multiplicação *in vitro*. Neste sentido, o aspecto da maior densidade estomática participa com o maior fator de importância do que a funcionalidade estomática, haja vista que no interior dos frascos de cultura a umidade relativa é de 100%, e não ocorrem perdas de explantes por dessecação.

Diante disso, pode-se concluir que, para a fase de multiplicação, o Tratamento 2, ou seja, uma condição de luz artificial, com a suplementação de sacarose de 15g L^{-1} , foi o melhor para promover as maiores densidades estomáticas com a melhor funcionalidade dos estômatos, na superfície abaxial das folhas dos explantes *in vitro*, como pode ser observado pelas fotografias de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 17 e 18).

Observou-se ainda, que a topografia estomática neste tratamento 2 apresentou vantagens sobre o mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, considerando-se que os estômatos encontram-se ligeiramente deprimidos em relação à superfície foliar, o que é também um dos indicativos de uma boa funcionalidade estomática.

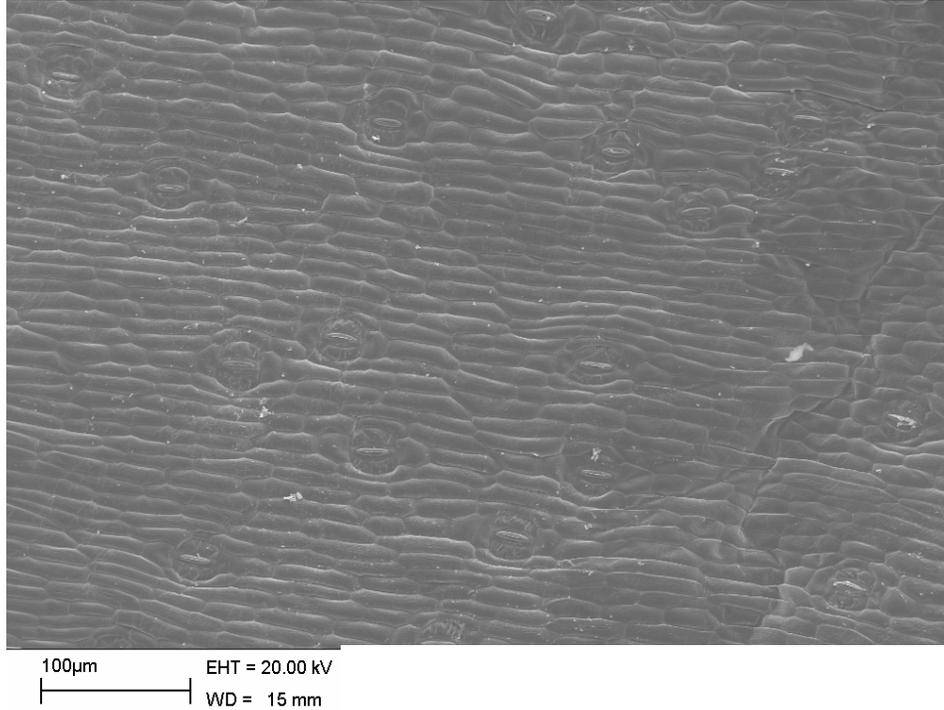


FIGURA 17: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de multiplicação, com a suplementação de 15 g L⁻¹ de sacarose, sob luz artificial. UFLA, Lavras – MG, 2005.

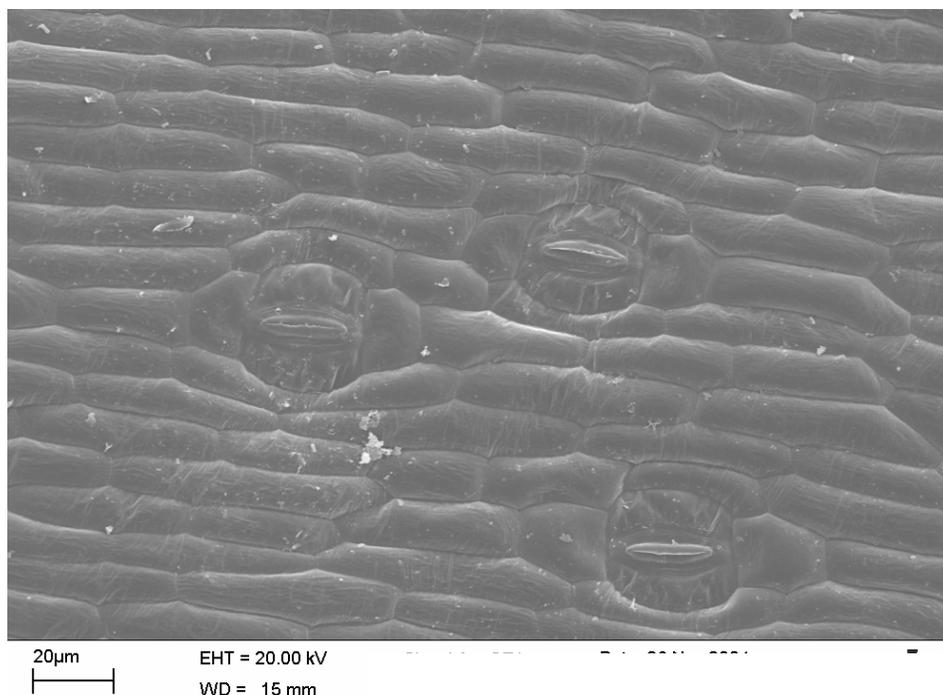


FIGURA 18: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de multiplicação, com a suplementação de 30 g L⁻¹ de sacarose, sob luz artificial. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Ainda, referindo-se aos estômatos dos tratamentos em fase de multiplicação, observa-se pela Figura 19, que na condição de luz natural, ocorre uma intensa deposição de cera epicuticular.

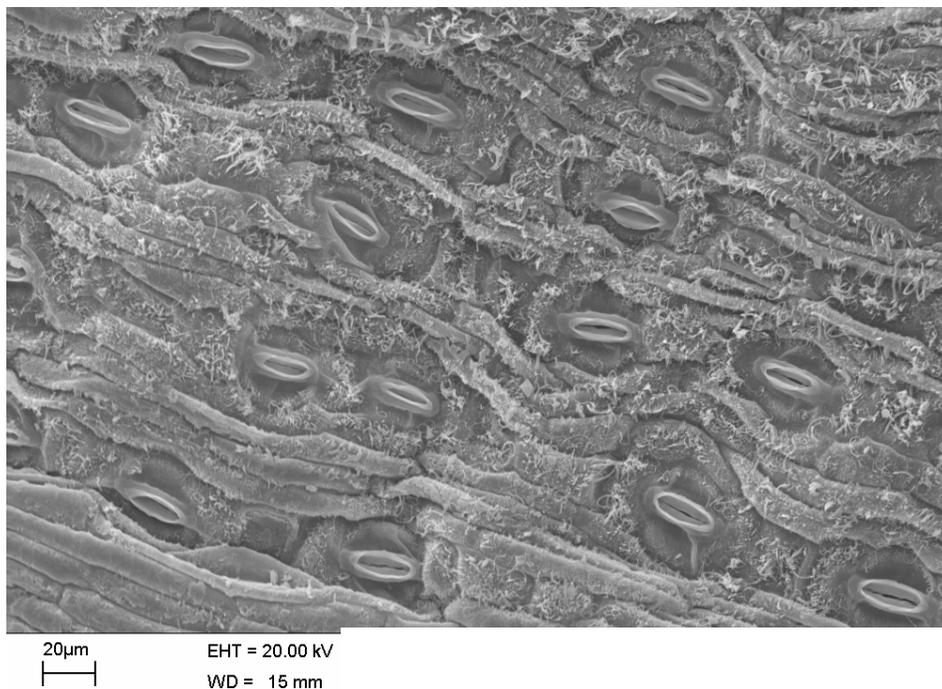


FIGURA 19: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de multiplicação, com a suplementação de 30g L⁻¹ de sacarose, com luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.

Para os explantes em fase de enraizamento, verifica-se que as maiores densidades estomáticas ocorreram para os Tratamentos 4, 7 e 8. Entretanto, ao se analisar a relação DP/DE, como igual artifício para se medir a funcionalidade estomática, verifica-se que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos para esta variável resposta, na superfície abaxial das folhas. Diante disto, conclui-se que para a fase de enraizamento, a condição de luz natural, com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose, é capaz de proporcionar elevada densidade estomática, com boa funcionalidade dos estômatos (Figura 20),

evitando sobremaneira a excessiva perda d'água, e contribuindo para que as plântulas sejam mais facilmente adaptadas à condição heterotrófica.

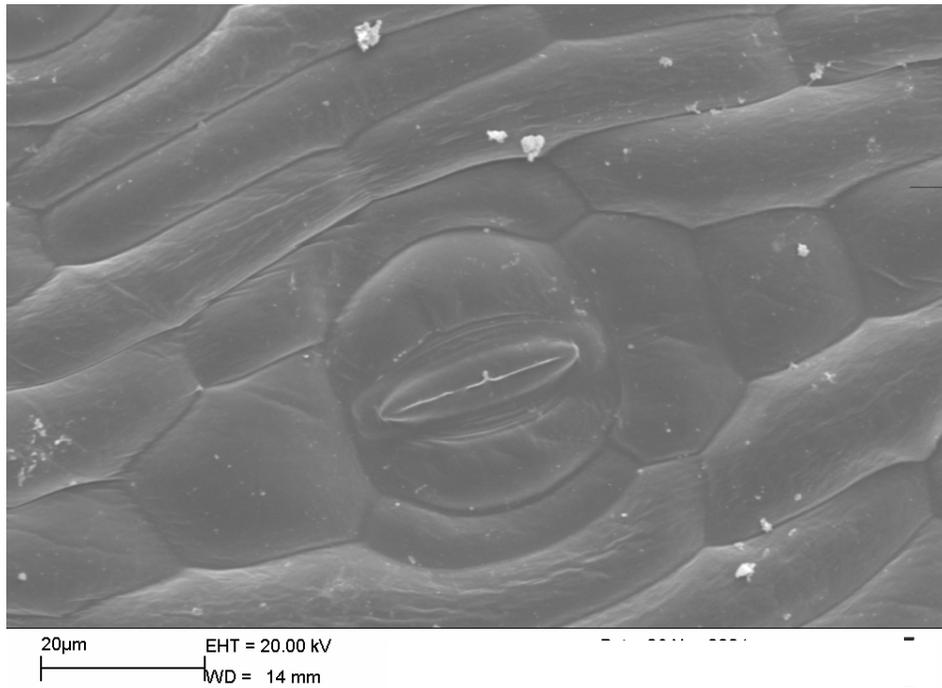


FIGURA 20: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície abaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de enraizamento, com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose, sob luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.

4.3.2 Densidade estomática e dimensões dos estômatos na superfície adaxial das folhas.

Da mesma forma como se procedeu para as avaliações dos estômatos na superfície abaxial, foi realizado para a superfície adaxial. Analisando separadamente os tratamentos contemplando a fase de multiplicação, pode-se verificar o resumo da análise de variância na Tabela 37; e para os tratamentos

que contemplaram a fase de enraizamento, verifica-se o resumo da análise de variância na Tabela 38.

TABELA 37: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície adaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de cultura para a fase de multiplicação, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.

F.V.	G.L.	QM's			
		NE	DP	DE	DP/DE
Tratamentos	3	6931,1100*	90,1351*	305,6995*	5,5633*
Erro	76	345,9967	6,8005	12,3710	0,8798
CV (%)		48,11	7,35	16,49	50,93

*- Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

NE : Número de Estômatos

DE : Diâmetro Equatorial

DP : Diâmetro Polar

TABELA 38: Resumo da análise de variância para a caracterização dos estômatos da superfície adaxial em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro* em meio de cultura para a fase de enraizamento, sob condições de luz artificial e natural, com a suplementação de 15g L⁻¹ e 30g L⁻¹ de sacarose. UFLA, Lavras – MG, 2005.

F.V.	G.L.	QM's			
		NE	DP	DE	DP/DE
Tratamentos	3	270,1493*	80,2644***	95,7830***	0,1829**
Erro	76	108,0789	4,9274	8,1140	0,0682
CV (%)		27,02	6,31	13,85	14,93

*- Significativo a 6,6% de probabilidade pelo teste F

** - Significativo a 5,28% de probabilidade pelo teste F

***- Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

NE : Número de Estômatos

DE : Diâmetro Equatorial

DP : Diâmetro Polar

Observa-se que a superfície adaxial das lâminas foliares apresentam densidades estomáticas bem inferiores às verificadas na superfície abaxial. Pelos resultados apresentados na Tabela 39, verifica-se que a condição de luz artificial, com a suplementação de 15g L⁻¹, ou seja, o Tratamento 2 é o mais favorável, por ter resultado na maior densidade estomática, o que se reflete em uma maior atividade fotossintética dos explantes, possibilitando aumentar as taxas de multiplicação, e também apresentando a segunda maior relação DP/DE. Estes resultados reforçam os anteriormente observados para as superfícies abaxiais dos explantes.

TABELA 39: Médias das variáveis resposta analisadas nos cortes paradérmicos da superfície ADAXIAL, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de multiplicação, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

TRATAMENTOS	Variáveis Resposta			
	N.E.	D.P. (µm)	D.E. (µm)	D.P./D.E.
T1	21,46 c	36,48 a	17,35 c	2,60 a
T2	65,12 a	32,28 b	19,69 b	1,65 b
T5	33,30 b	36,70 a	21,73 b	1,70 b
T6	34,78 b	36,36 a	26,54 a	1,39 b
CV (%)	48,11	7,35	16,49	50,93

As médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-knott.

NE : Número de Estômatos

DE : Diâmetro Equatorial

DP : Diâmetro Polar

Os resultados obtidos com os explantes em fase de enraizamento na superfície adaxial (Tabela 40) seguiram a mesma tendência verificada para os da superfície abaxial, ou seja, o Tratamento 8, cujas condições são de luz natural

com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose, foi o que proporcionou a maior relação DP/DE, com a menor densidade estomática.

TABELA 40: Médias das variáveis resposta analisadas nos cortes paradérmicos da superfície adaxial, em folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, em meio de enraizamento, sob condição de luz artificial e luz natural, com duas diferentes doses de sacarose (15g L⁻¹ e 30g L⁻¹) no meio de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2005.

TRATAMENTOS	Variáveis Resposta			
	N.E.	D.P. (µm)	D.E. (µm)	D.P./D.E.
T3	41,44 a	37,30 a	23,61 a	1,60 b
T4	38,48 a	33,24 b	19,02 b	1,80 a
T7	40,70 a	36,49 a	20,70 b	1,78 a
T8	33,30 b	33,75 b	18,93 b	1,80 a
CV (%)	27,02	6,31	13,85	14,93

As médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5%, pelo teste de Scott-knott.

Assim, pode-se reafirmar a conclusão de que na fase de enraizamento a condição mais eficiente para a promoção de uma superfície foliar anatômicamente adaptada às condições de baixa unidade relativa, é a luz natural com apenas 15g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. Esta conformação da superfície adaxial, pode ser visualizada na Figura 21.

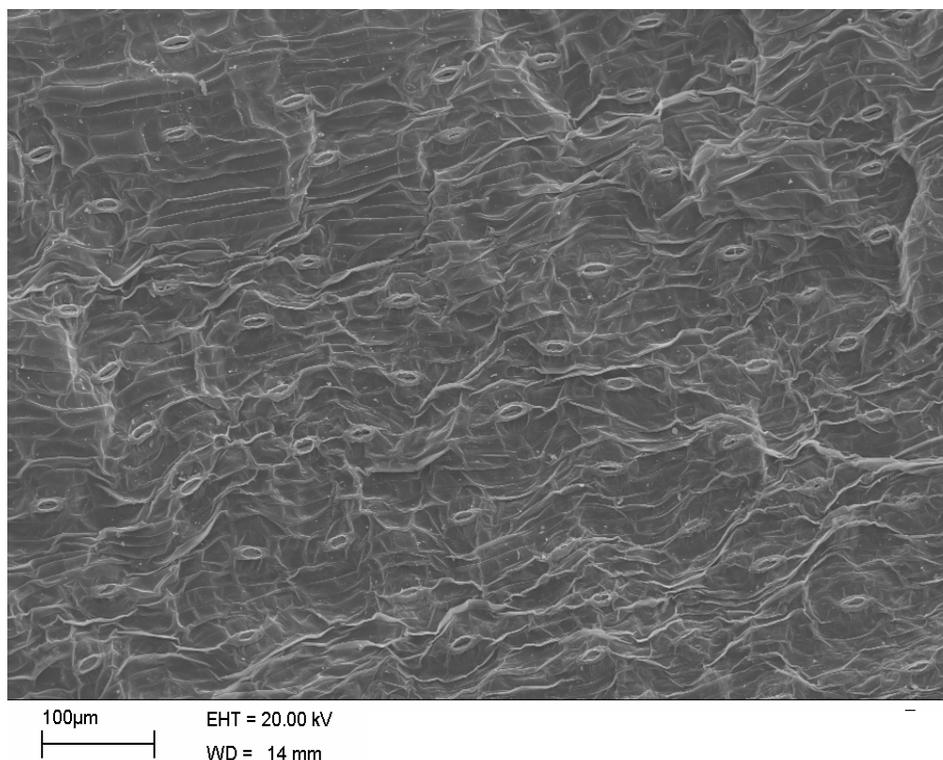


FIGURA 21: Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura da superfície adaxial de folhas de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ *in vitro*, na fase de enraizamento, com a suplementação de 15g L^{-1} de sacarose, sob luz natural. UFLA, Lavras – MG, 2005.

É possível notar-se que as células epidérmicas e as células guarda encontram-se em colapso. Esta conformação foi reportada por Wetzstein & Sommer (1982), a qual foi atribuída aos efeitos da luminescência e do vácuo nas observações com microscopia eletrônica de varredura.

5 CONCLUSÕES

Tanto sob condições de luz natural quanto artificial, em ambas as fases de multiplicação e enraizamento, observou-se uma diferenciação do mesófilo foliar, de forma organizada, não apresentando quaisquer anormalidades.

A observação visual dos explantes *in vitro* não indica com precisão o momento ideal de se proceder a transferência para o ambiente *ex vitro*, necessitando-se de um estudo morfoanatômico complementar .

A relação entre os diâmetros médios polares e os diâmetros médios equatoriais, deve ser utilizada como forma de avaliação da funcionalidade dos estômatos, por fornecer um forte indício do seu formato, tanto nas superfícies abaxial quanto adaxial das folhas.

Na fase de multiplicação, a condição de luz artificial, com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose, é responsável pelas maiores densidades estomáticas, tanto nas superfícies adaxial quanto abaxial das folhas.

Pode-se obter maior eficiência na micropropagação da bananeira ‘Prata Anã’, utilizando-se a luz artificial, com a suplementação de 30g L⁻¹ de sacarose para a fase de multiplicação; e a luz natural com a suplementação de 15g L⁻¹ de sacarose para a fase de enraizamento. Estas alterações no protocolo, resultarão na redução dos custos com energia elétrica, além de reduzir perdas na aclimatização.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 255-263, 1980.

ALQUINI, Y. Epiderme In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**, Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 87-108.

ALVES, E. J. **A bananicultura brasileira e o programa de pesquisa coordenado pela Embrapa em prol do seu melhoramento**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1986. 50 p. (Embrapa/CNPMPF. Documentos, 17).

ALVES, E. J.; OLIVEIRA, M. de A. Instalação do bananal. In: .ALVES, E. J. (Ed.). **Banana para exportação: aspectos técnicos da produção**. MARA/ SDR/ FRUPEX/ EMBRAPA/ SPI, 1995. p. 25-35. (Série Publicações Técnicas, 18).

ANDERSEN, A. S. Environmental influences on adventitious rooting cuttings of non-woody species. In: JACKSON, M. B. (Ed.). **New root formation and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p. 223-253.

ASHTON, D. H.; TURNER, J. S. Studies on the light compensation point of *Eucalyptus regnans* Muell. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 27, n. 5, p. 289-607, 1979.

ATHAYDE, M. O. Propagação *in vitro* da bananeira 'Ouro da mata'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Resumos...** Salvador, 1994. p. 139.

BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 355-377, 1977.

BOULAY, M. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestiers. **Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL**, Paris, v. 8, p. 7-43, 1984.

BJORKMAN, O.; HOLMGREN, P. Adaptability of the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 889-915, 1963.

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

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J.; 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.

CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA C., DEBERGH, P. Environment Influences Anantomy os Stomata and Epidermal Cells in Tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journa of The American Society of Horticultural Science**, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

COOMBS, J.; HALL, D. O. **Techniques in bioproductivity and photosynthesis**. Oxford: Pergamon,, 1982. 191 p.

DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J. Propagação rápida da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12 , n. 133, p. 33-38, jan. 1986.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W dos S. Classificação botânica, origem e evolução. In: ALVES, J. E. (Ed.). **Banana para exportação**: aspectos técnicos de produção. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1977. p. 9-12. (Técnicas Frupex).

DEBERGH, P. C. Control of *in vitro* plant propagation. In: SIMPÓSIO INTERNA CIONAL DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS, 1., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CEBTEC/FEALQ/USP, 1988.

DOMINGUES, E. D. **Cultura de tecidos visando o melhoramento genético de bananeira (*Musa ssp*) através de indução de mutações**. 1992. 119 p. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf Anatomy of Red Raspberry Transferred from Culture to Soil. **Journa of The American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

DOOLEY, J. H. Influence of lighting spectra on plant tissue culture. In: MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS, 1991, Chicago. **Proceending...** Chicago: [s. n.], 1991.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudos fenológicos das principais espécies arbóreas plantadas no Parque da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. **O Solo**, Piracicaba, v. 77, n. 1-2, p. 42-56, 1989.

ESAU, K. **Plant anatomy**. 2.ed. New York: J. Wiley, 1965.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução de Berta Lange de Morretes. São Paulo: Edgard Blücher/USP, 1976. 193 p.

EVANS, L. T. The effect of light on plant growth, development and yield. In: SLATTYER, R. O. (Ed.) **Plant response to climatic factors**. Paris: UNESCO, 1973. p. 21-35.

FABRI, A.; BARTOLINI, G. Osservazioni anatomiche su radichi di barbetelle di Paradox moltiplicate agamicamente. **Frutticoltura**, Bologna, v. 47, p. 43-46, gen. 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2003. Disponível em: <http://www.fao.com>>. Acesso em: maio 2003.

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.

FOURNIOUX, J. C.; BESSIS, R. Use of carbon dioxide enrichment to obtain adult morphology of grapevine *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 51-57, Apr. 1993.

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

FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stage. **Acta Horticulturae**, amsterdam, v. 230, p. 153-158, 1988.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**: the components of culture media. 2. ed. Great Britain: Exegetics, 1993a. 574 p.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture: factors affecting growth and morphogenesis**. 2. ed. Great Britain: Exegetics, 1993b. 574 p.

GLAZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 239-244, Dec. 1992.

GODINHO, F. P. **Efeito de doses de 6-benzilaminopurina na propagação de mudas de bananeira (*Musa sp*) cultivar prata, pelo método de propagação rápida 'in vivo'**. 1991. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

GOWEN, S. **Bananas and Plantains**. London: Chapman & Hall, 1995. 612 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa/SPI/CNPH, 1998. v.1, pt. 2, p. 183-260.

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

GROUT, B. W. W.; PRICE, F. The establishment of photosynthesis independence in strawberry cultures prior to transplanting. In: DUCATÉ, G.; JACOB, M.; SIMEON A. **Plant Micropropagation in Horticultural Industries**. Belgium: Universitaires, 1987. p. 55-60.

GUPTA, B. Correlation of tissues in leaves. Absolute stoamtal numbers. **Annals of Botany**, London, v. 25, n. 97, p. 71-77, 1961.

GUPTA, P. K. Erradication of mosaic disease and rapid clonal mutiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 33-39, 1986.

GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F.; JÁGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees-lonal propagation of mature trees of *Eucalyphthus citriodora* and *Eucaypthuscomaldulensis*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 2, n. 3, p. 296-299, June 1983.

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.

KITTO, S. L.; JANICK, J. *In vitro* propagation of Carrizo Citrange. **Hortscience**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 305-306, June 1981.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine') **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-14, 1998.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **MICROPROPAGATION Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 448-467.

KOZAI, T.; IWANAMI, Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, Kyoto, v. 57, n. 2, p. 279-288, Sept. 1988.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 230, p. 121-127, 1988.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. In: SYMPOSIUM ON PLANT MICROPROPAGATION IN HORTICULTURAL INDUSTRIES, 1987, Arlon. **Anais ... Arlon**: [s. n.], 1987.

KOZAI, T.; WATANABE, K.; JEONG, B. R. Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 64, n. 1-2, p. 1-9, Oct. 1995.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: [s. n.], 1997. 198 p.

KRIKORIAN, A. D. *In vitro* culture of bananas and plantains: background, update and call for information. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 66, n. 3, p. 194-200, July 1989.

KRIKORIAN, A. D.; CRONAUER, S. S. Aseptic culture techniques for plantain improvement. **Economic Botany**, Bronx, v. 38, n. 3, p. 322-331, July/Sept. 1984.

LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABORIAU, 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. 33, n. 2, p. 237-252, jun. 1961.

LAMEIRA, O. A.; **Propagação *In vitro* da bananeira *Musa sp* através da cultura de ápice caulinar**. 1987. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

LARIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal Variation. **Annual Review Plant Physiology**, Palo alto, v. 39, p. 413-438, 1988.

LEE, N.; WEZSTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrstructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambarstyraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 78, n. 3, p. 637-641, July 1985.

LEE, N.; WEZSTEIN, 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 of Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988

LESHEM, B. Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation, **Annals of Botany**, London, v. 52, n. 3, p. 413-415, Sept. 1983.

LIU, L. J. et al. A. *In vitro* propagation of plantain (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* AAB) and banana (*Musa acuminata* AAA) in Puerto Rico. **Journal of Agricultural University of Puerto Rico**, Rio Piedras, n. 73, v. 1, p. 51-58, Jan. 1989.

MEDRI, M. E.; LLERAS, E. Ecofisiologia de plantas da Amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanha-do-

Pará) – Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 9, n. 1, p. 15-23, mar. 1980.

MITCHELL, R. L. **Crop growth and culture**. Ames: The Iowa State University, 1979. 439 p.

MOUSSEAU, M. CO₂ enrichment *in vitro*. Effects on autotrophic and heterotrophic cultures of *Nicotiana tabacum* (var. Samsun). **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 8, n. 2, p. 187-191, 1986.

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

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **MICROPROPAGATION Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 72-93.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff, 1987. 344 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

POWELS, S. B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. **Annals Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 15 – 44, 1984.

QUOIRIN, M.; LEPOIVER, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, p. 437-442, 1997.

RAMAN, K. Rapid multiplication of streptocarpus and *Gloxinia* from *in vitro* cultured pedicel segments. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 83, n. 5, p. 411-418, 1977.

ROBINSON, J. C. **Bananas and Plantains**. Cambridge, U.K.: Cambridge University, 1996. p. 104-127.

SALANTINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALANTINO, M. L. F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 117-124, dez. 1986.

SANTIAGO, E. J. A. de **Aspectos anatômicos e do crescimento da Pimenta Longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em Condições “in vitro” e “in vivo”**. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SCATENA, V. L.; DIAS, E. S. Parênquima, Colênquima e Esclerênquima In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. p. 109-127.

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsteram, v. 46, n. 3, p. 257-264, Sept. 1996.

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

SHORT, K. C.; WARBURTON, J.; ROBERTS, A. V. *In vitro* hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 212, p. 329 – 334, 1987.

SMITH, M. A. L.; PALTA, J. P; McCOWN, B. H. Comparative Anatomy and Physiology of Microcultured, Seedling, and Greenhouse-grown Asian White Birch, **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 3, p. 437-442, May 1986.

SMITH, M. K.; BIGGS, B. J.; SCOTT, K. J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Planta Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 3, p. 221-228, 1986.

SOUZA, J. da S.; TORRES FILHO, P. Aspectos socioeconômicos. In: ALVES, E. J. (Org.). **A CULTURA DA BANANA: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1997. p. 507–524.

STANDAERT-DE-METSANAERE, R. E. A. Economic considerations In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 131-140.

STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. Berkeley: University of California, 1973. 614 p.

TAIZ, L. Auxina: o hormônio de crescimento. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 19, p. 449-484.

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 65, n. 4, p. 323-328, Oct. 1985.

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

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 475-480, May 1983.

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

WHATHEY, J. M.; WHATHEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1982. 101 p. (Temas de Biologia, 30).

WONG, W. C. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.) initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 159-166, 1986.

ZIV, M.; MEIR, G.; HALEVY, A., Hardening carnation plants regenerated from shoot tips cultured *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 21, n. 3-4, p. 423, 1981.