

EFEITO DA LUZ E DO SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL EM ABACAXIZEIRO (*Bromeliaceae*) MICROPROPAGADO

LIGHT EFFECT AND NATURAL VENTILATION SYSTEM ON PINEAPPLE (*Bromeliaceae*) MICROPROPAGATED

Adriano Bortolotti da SILVA¹; Vinicius Rodrigues Silva CORREA^{2†};
Alúcio Hideki TOGORO²; Juliana Aparecida dos Santos SILVA²

1. Engenheiro Agrônomo, Professor, Doutor, Faculdade de Agronomia, Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil. adriano.silva@unifenas.br; 2. [†] *in memoria* do autor; 3. Alunos de graduação da Faculdade de Agronomia - UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil

RESUMO: O emprego de luz natural e do sistema de micropropagação em ventilação natural proporciona maior irradiância e trocas gasosas no cultivo *in vitro* de plantas, ocasionando alterações na anatomia foliar e possibilitando um cultivo mais próximo ao fotoautotrófico. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento e anatomia foliar de plantas de abacaxi cultivadas *in vitro* em dois sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), com as plantas mantidas em ambiente com luz natural e artificial, e em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose. Os tratamentos constaram de diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30 e 45 g.L⁻¹) em combinação com dois sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), mantidos sob luz natural. Foram realizados dois tratamentos controle adicionais constando de sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, sendo o cultivo realizado em sala de crescimento com luz e temperatura controlada. Maior crescimento *in vitro* foi observado em sistema de micropropagação com ventilação natural, em meio de cultura contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, e com as plantas mantidas sob luz natural. A micropropagação em ventilação natural, com as plantas sob luz natural, promoveu alterações na anatomia foliar que proporcionaram maior espessura do parênquima clorofiliano durante o cultivo *in vitro*. A luz natural em combinação com o sistema de micropropagação em ventilação natural proporciona maior acúmulo de biomassa e melhores características de anatomia foliar.

PALAVRAS-CHAVE: *Ananas*. Luz natural. Trocas gasosas. Cultura de tecidos.

INTRODUÇÃO

A aclimatização é uma das fases mais limitantes da micropropagação devido basicamente ao estresse hídrico, causado pela transferência do cultivo *in vitro* para o *ex vitro*, que tem sido relatado como a principal causa de altas taxas de perdas, desta fase (BARBOZA et al., 2006).

A alta umidade do cultivo *in vitro* e a baixa irradiância são os principais fatores envolvidos com a desorganização dos tecidos, baixo funcionamento dos estômatos e a fina camada de cera epicuticular na anatomia foliar de plantas produzidas por cultura de tecidos, levando ao baixo controle da perda de água, quando são submetidas ao ambiente natural, com aumento da demanda evaporativa (ALBANY et al., 2005; DECCETTI et al., 2008; SILVA, et al., 2008).

O emprego de luz natural é uma forma de aumentar a intensidade luminosa do cultivo *in vitro*. A alta irradiância altera a anatomia foliar, possibilitando maior diferenciação e organização dos tecidos (ERIG; SCHUCH, 2005), maior controle estomático (SILVA et al., 2008), o que pode reduzir as perdas durante a fase de micropropagação. Estudos com de aumento da

irradiância têm sido relatados na micropropagação fotoautotrófica (LEE et al., 2000; FUENTES et al., 2005; KHAN et al., 2003).

Outra forma de possibilitar a micropropagação fotoautotrófica seria o cultivo *in vitro* com o emprego de tampas ou frascos que permitam trocas gasosas, o qual é denominado de sistema de ventilação natural (ERIG; SCHUCH, 2005). Os efeitos benéficos da ventilação natural são devido a múltiplas interações entre redução relativa umidade *in vitro* (MILLS; TAL, 2004), o aumento da trocas gasosas com a atmosfera exterior (MILLS et al., 2004) e diminuição da disponibilidade de água. Ambos os fatores, luz natural e sistema de ventilação natural vem sendo empregados no intuito de aumentar a taxa fotossintética *in vitro*, visando produzir plantas mais rústicas e reduzindo perdas da micropropagação.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento e anatomia foliar de plantas de abacaxi cultivadas *in vitro* em dois sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), com as plantas mantidas em ambiente com luz natural e artificial, e em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG. As plantas foram obtidas através de cultura de gemas axilares de abacaxi (*Ananas comosus* L. cv Imperial), as quais foram inoculadas em meio contendo sais do meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962); 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; 0,1 mg.L⁻¹ de ANA; 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 6 g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos, mantidos em sala de crescimento por 60 dias.

Para a montagem do experimento, as plantas obtidas, a partir das gemas axilares, foram subcultivadas por três vezes, no meio de cultura descrito anteriormente, visando a obtenção do número necessário de plantas. Antes da inoculação, as plantas foram uniformizadas com 1 cm de comprimento e transferidas de acordo com os diferentes tratamentos. Os tratamentos constaram de diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30 e 45 g.L⁻¹) em combinação com dois sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), sendo mantidos em casa de vegetação, sob condição de luz natural. Foram realizados dois tratamentos controle adicionais constando dos sistemas de micropropagação (convencional e de ventilação natural), em meio de cultura contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, mantidos em sala de crescimento, sob condição de luz artificial.

Para todos os tratamentos, o meio de cultura constou dos sais do MS, o pH foi ajustado para 5,8, e solidificado com o emprego de 7 g.L⁻¹ de ágar. Foram distribuídos 40 mL de meio de cultura em frascos de 250 mL, os quais foram identificados de acordo com cada tratamento, e autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Nos tratamentos com plantas crescendo sob luz natural, o cultivo foi mantido em casa de vegetação, coberta com Sombrite® 50%, revestida com plástico agrícola, apresentando 37,5 °C de temperatura máxima e 14 °C de mínima, sendo a média do período em torno dos 26 °C, umidade relativa variando de 35 a 70% e irradiância entre 35 a 148 W.m⁻². Os tratamentos adicionais foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 2 °C, intensidade luminosa de 30 W.m⁻² e 16 horas de fotoperíodo.

No sistema de micropropagação com ventilação natural foram empregadas duas membranas de filtro (Milli Seal, Millipore, Tóquio, Japão) com poros de 0,5 µm usadas para cobrir um par de furos (10 mm de diâmetro) das tampas nos frascos de cultivo.

Após 60 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas nas seguintes características: comprimento da parte aérea, massa fresca e seca da planta. Para anatomia foliar foi avaliado a espessura foliar, da epiderme superior e inferior, do parênquima clorofiliano e aquífero, diâmetro polar e equatorial dos estômatos.

As plantas utilizadas nos estudos anatômicos foram coletadas e conservadas em álcool 70° GL. Os cortes das seções foliares foram realizados à mão livre. As seções transversais, foram clarificadas em solução a 1% de hipoclorito de sódio e, em seguida, lavadas em água destilada e coradas com o corante azul de astra-safranina. As lâminas foram montadas em glicerina 50%, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). A partir das seções transversais, com o auxílio de ocular micrométrica, foram realizadas medições da espessura dos tecidos no terço mediano de cada folha. Os tratamentos foram compostos por 4 repetições com 4 plantas por parcela, sendo avaliada uma folha de cada parcela, totalizando 16 laminas foliares por tratamento

Os cortes paradérmicos foram realizados na face abaxial, na região mediana das folhas e a safranina hidroalcoólica 1% foi usada como corante na montagem das lâminas. O diâmetro polar e equatorial dos estômatos foi obtido com emprego de ocular micrométrica. Em cada folha avaliada, foram medidos 3 estômatos para obter o diâmetro polar e equatorial. As fotomicrografias foram realizadas utilizando-se um fotomicroscópio OLYMPUS BX – 60.

O delineamento foi o de blocos casualizados (DBC), constando de um fatorial de 4 (concentrações de sacarose) x 2 sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), mantidos sob luz natural, resultando em 8 tratamentos. Foram realizados dois tratamentos controle adicionais constando de sistema de micropropagação (convencional e ventilação natural), mantidos em luz artificial, totalizando 10 tratamentos, com 4 repetições e 4 plantas por frasco, sendo realizada a análise conjunta dos dados. A análise de variância foi realizada com o emprego do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias foram comparadas com o teste Skoot & Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre o fator sacarose e os sistemas de micropropagação (convencional e ventilação natural), com as plantas mantidas em luz natural, para todas as variáveis em

estudo. Maior comprimento da parte aérea foi observado com as plantas mantidas no ambiente de sala de crescimento em ambos os sistemas de micropropagação (Tabela 1). Entretanto, bom desempenho nesta variável foi observado em plantas cultivadas em ventilação natural, em meio de cultura com 30 ou 45 g.L⁻¹ de sacarose, sob luz natural, sendo superior quando comparado com as plantas

em sistema de micropropagação convencional em luz natural (Tabela 1). Mills et al. (2004) relataram que maior crescimento de plantas de jojoba foi obtido em ventilação natural em sala de crescimento quando comparado com a micropropagação convencional, em meio de cultura contendo sacarose.

Tabela 1. Comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MFP) e seca (MSECA) da planta em função dos diferentes tratamentos.

	Sacarose (g.L ⁻¹)	CPA (cm)		MFP (g)		MSECA (g)	
		VN ⁽¹⁾	Convencional ⁽²⁾	VN	Convencional	VN	Convencional
Luz natural	0	2,87 Da	2,50 Db	0,98 Ca	0,99 Ea	0,08 Ca	0,04 Ca
	15	6,90 Cb	7,40 Ba	1,97 Ba	1,73 Da	0,18 Ba	0,12 Bb
	30	9,42 Ba	2,82 Db	1,74 Bb	2,18 Ba	0,28 Aa	0,17Ab
	45	9,37 Ba	5,95 Cb	1,70 Bb	2,21Ba	0,26 Aa	0,17 Ab
Sala cresc. ⁽³⁾		10,94 A	10,44 A	2,10 A	2,42 A	0,19 B	0,19 A
CV (%)		2,88		4,75		6,50	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Skoot & Knott, a 5% de probabilidade. Ventilação Natural⁽¹⁾; Micropropagação Convencional⁽²⁾; Tratamentos adicionais, micropropagação convencional e ventilação natural, mantido na sala de crescimento, em meio de cultura contendo 30g.L⁻¹ de sacarose⁽³⁾.

A micropropagação em sala de crescimento proporcionou maior acumulo de massa fresca das plantas (Tabela 1). Este fato pode ser atribuído as condições ambientais da sala de cultivo com temperatura amena e baixa irradiância. Em condições de luz natural, a micropropagação convencional apresentou plantas com maior massa fresca quando comparado com a ventilação natural (Tabela 1). Este resultado já era esperado pela maior umidade relativa do ar devido a vedação total dos frascos, no cultivo *in vitro*, possibilitando maior acumulo de água pelos tecidos, o qual pode gerar distúrbios fisiológicos como hiperidricidade. Entretanto, no presente estudo não foram observadas plantas com hiperidricidade. A micropropagação em ventilação natural pode prevenir este distúrbio fisiológico por reduzir a umidade relativa do frasco de cultivo. Ivanova e Van Staden (2010) afirmaram que a ventilação natural eliminou os problemas com hiperidricidade em plantas de *Aloe polyphylla*.

A micropropagação em ventilação natural, com as plantas mantidas sob luz natural, em meio de cultura contendo 30 ou 45 g.L⁻¹ de sacarose, promoveu maior acumulo de massa seca (Tabela 1). Aumento da massa seca tem sido relatado em cultivo *in vitro* sob alta irradiância de coco (TALAVERA et al., 2005), mandioca (JORGE et al., 2001), eucalipto (KHAN et al., 2003), e abacaxi

(SILVA et al., 2008). Respostas semelhantes em acumulo de massa seca foram observadas também na micropropagação em ventilação natural com tomate e couve flor (KANECHI et al., 1998; MILLS; TAL, 2004). Mills et al. (2004) verificaram maior acumulo de massa seca em plantas crescendo em ventilação natural quando comparado a micropropagação convencional. O aumento das trocas gasosas no sistema de micropropagação em ventilação natural pode estar relacionado com incremento da taxa fotossintética neste sistema, podendo ainda causar aumento dos cloroplastos e melhor organização da grana (MAJADA et al., 2002).

A luz natural em combinação com sistema de micropropagação convencional ou de ventilação natural promoveu maior espessura da epiderme adaxial e adaxial quando comparado com os sistemas de micropropagação mantidos em sala de crescimento (Tabela. 2). O comportamento da epiderme não evidenciou nenhum outro padrão de comportamento em relação aos fatores em estudo. O emprego da luz natural na micropropagação de plantas gera alterações morfológicas na anatomia foliar das plantas e o primeiro tecido a sofrer esta alteração adaptativa é a epiderme, sendo que em ambientes com alta irradiância observam-se epidermes mais espessas (SILVA et al., 2008).

Tabela 2. Espessura da epiderme adaxial (Ead) e abaxial (Eab), espessura do parênquima aquífero (Paq) em função dos diferentes tratamentos.

	Sacarose (g.L ⁻¹)	Ead (µm)		Eab (µm)		Paq (µm)	
		VN ⁽¹⁾	Convencional ⁽²⁾	VN	Convencional	VN	Convencional
Luz natural	0	20,60 Ab	26,97 Aa	18,40 Bb	20,60 Aa	249,63 Db	298,75 Da
	15	17,09 Cb	20,27 Ca	18,03 Bb	19,09 Ba	279,77 Ab	360,13 Ba
	30	20,60 Aa	17,29 Db	19,20 Aa	18,40 Bb	249,63 Db	397,28 Aa
	45	17,06 Cb	24,00 Ba	18,40 Bb	20,60 Aa	259,88 Bb	360,37 Ba
Sala cresc. ⁽³⁾		14,23 D	13,09 E	17,30 C	17,20 C	253,98 C	350,44 C
CV (%)		0,75		0,86		0,97	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Skoot & Knott, a 5% de probabilidade. Ventilação Natural⁽¹⁾; Micropropagação Convencional⁽²⁾; Tratamentos adicionais, micropropagação convencional e ventilação natural, mantido na sala de crescimento, em meio de cultura contendo 30g.L⁻¹ de sacarose⁽³⁾.

O parênquima aquífero mostrou-se mais espesso em condições de micropropagação convencional do que em ventilação natural (Tabela 2). Provavelmente, o efeito da total vedação dos frascos de cultivo na micropropagação convencional e a maior umidade relativa desse ambiente, proporcionou maior acúmulo de água por este tecido especializado. A ventilação natural pode diminuir a umidade relativa, bem como a disponibilidade de água do cultivo *in vitro*, e aumentar as trocas gasosas (PARK et al., 2004; CASANOVA et al., 2008; IVANOVA; STADEN, 2010), resultando, no presente trabalho, provavelmente na menor espessura do parênquima aquífero nos tratamentos

de ventilação natural quando comparado com os de micropropagação convencional (Tabela 2).

O parênquima clorofiliano, tecido responsável pela fotossíntese, apresentou maior espessura com o emprego do sistema de micropropagação em ventilação natural com as plantas sob luz natural, em meio de cultura acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, sendo seguido pelo tratamento de ventilação natural mantido em sala de crescimento (Tabela 3). Outro tratamento que apresentou bom desempenho foi o de micropropagação convencional, sob luz natural, acrescido com 30 ou 45 g.L⁻¹ de sacarose.

Tabela 3. Espessura do parênquima clorofiliano (Pcl) e espessura foliar total (Ef) em função dos diferentes tratamentos.

	Sacarose (g.L ⁻¹)	Pcl (µm)		Ef (µm)	
		VN ⁽¹⁾	Convencional ⁽²⁾	VN	Convencional
Luz natural	0	290,96 Ca	279,56 Bb	583,25 Db	630,18 Da
	15	274,96 Da	273,17 Ba	594,65 Cb	674,60 Ca
	30	373,62 Aa	293,88 Ab	654,40 Ab	719,32 Aa
	45	293,75 Ca	300,31 Aa	594,53 Cb	702,40 Ba
Sala cresc. ⁽³⁾		330,53 B	235,04 C	610,30 B	620,40 C
CV (%)		2,34		26,4	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Skoot & Knott, a 5% de probabilidade. Ventilação Natural⁽¹⁾; Micropropagação Convencional⁽²⁾; Tratamentos adicionais, micropropagação convencional e ventilação natural, mantido na sala de crescimento, em meio de cultura contendo 30g.L⁻¹ de sacarose⁽³⁾.

A maior espessura do parênquima clorofiliano em plantas submetidas à micropropagação com ventilação natural e em ambiente com luz natural demonstra a plasticidade do abacaxizeiro em cultivo *in vitro* e maior capacidade adaptativa. A maior espessura desse tecido pode resultar em maior capacidade fotossintética. Incremento nas taxas de fotossíntese *in vitro* têm sido relatadas pelo aumento da irradiância (KHAN et al., 2003; NGUYEN et al., 2001), e possibilidade de trocas gasosas com

meio ambiente (PARK et al., 2004; CASANOVA et al., 2008; IVANOVA; STADEN, 2010).

A maior espessura de tecido foliar foi observada na micropropagação convencional, sob luz natural, em meio de cultura com 45 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 3). Esse comportamento foi influenciado pelo maior acúmulo de água pelo parênquima aquífero (Tabela 2). Entretanto, folhas mais espessas foram observadas em cultivos sob alta irradiância, sendo considerada uma resposta padrão

e relacionada com maior sucesso na fase de aclimatização (SILVA et al., 2008).

Maior diâmetro polar e equatorial foi obtido em sistema de ventilação natural, sob luz natural, em meio de cultura na ausência de sacarose (Tabela 4). Estômatos mais elípticos são relatados como mais funcionais, enquanto a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionamento normal (CAPELLADES et al., 1990; KHAN et al., 2003) e menores perdas da aclimatização. No presente trabalho, existe a tendência da forma mais elíptica nos tratamentos sob luz natural (Tabela 4) devido o diâmetro polar tender a ser maior que o equatorial. Nos tratamentos mantidos em sala de crescimento este

comportamento foi observado somente em ventilação natural (Tabela 4).

A ventilação natural proporcionou maior controle estomático em espécies como *Annona glabra* (DECETTI et al., 2008), jujuba (MILLS et al., 2004) e *Aloe polyphylla* (IVANOVA; STADEN, 2010). O aumento da irradiância também está relacionado com estômatos mais funcionais no cultivo *in vitro* de diversas espécies (DECETTI et al., 2008; SILVA, 2006; KHAN, 2003). Em cortes paradérmicos, na superfície inferior da epiderme, observaram-se estômatos do tipo tetracítico, envolvido por quatro células subsidiárias, duas delas paralelas às células guarda, sendo o par restante polar e frequentemente menor (Figura 1C).

Tabela 4. Diâmetro polar (Dpolar) e equatorial (Dequatorial) de estômatos em função de diferentes tratamentos.

	Sacarose (g.L ⁻¹)	Dpolar (µm)		Dequatorial (µm)	
		VN ⁽¹⁾	Convencional ⁽²⁾	VN	Convencional
Luz	0	27,59 Aa	26,47 Ab	24,16 Aa	22,18 Cb
	15	25,98 Ba	25,99 Ba	21,20 Ea	21,13 Da
	30	24,61 Da	24,84 Da	23,25 Ca	23,42 Ba
	45	25,31Cb	24,30 Ca	22,17 Da	22,03 Ca
Sala cresc. ⁽³⁾		25,94 B	25,94 Ba	23,93 B	25,29 A
CV(%)		1,2		0,95	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Skoot & Knott, a 5% de probabilidade. Ventilação Natural⁽¹⁾; Micropropagação Convencional⁽²⁾; Tratamentos adicionais, micropropagação convencional e ventilação natural, mantido na sala de crescimento, em meio de cultura contendo 30g.L⁻¹ de sacarose⁽³⁾.

O parênquima clorofiliano das plantas em sistema de ventilação natural, sob luz natural, apresentou inúmeros cloroplastídeos, o que pode estar relacionado diretamente com maior capacidade fotossintética (Figura 1B). Os tecidos sob luz e ventilação natural apresentaram boa organização

celular no mesofilo foliar, bem como sistema vascular quando comparado com a micropropagação convencional em sala de crescimento (Figura 1A e B).

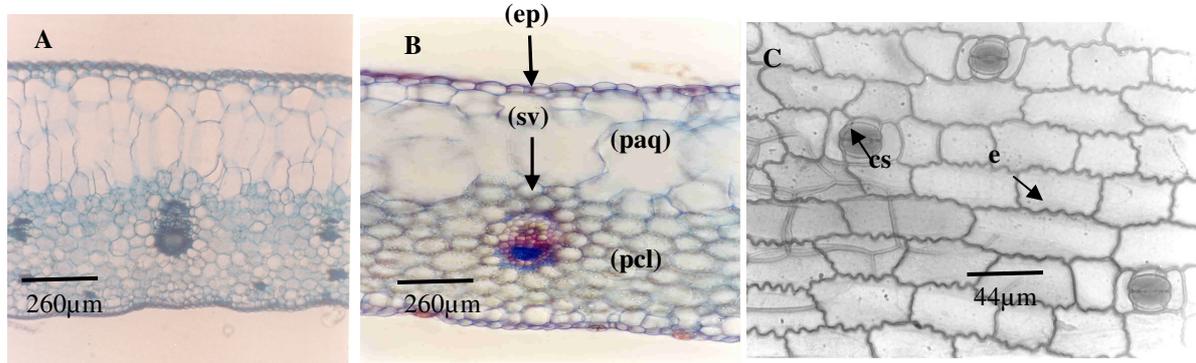


Figura 1. Anatomia foliar das plantas cultivadas *in vitro* em micropropagação convencional em sala de crescimento e com meio de cultura com 30 g.L⁻¹ de sacarose (A); e em sistema de ventilação natural, sob luz natural, meio de cultura com 30 g.L⁻¹ de sacarose (B); epiderme (ep); sistema vascular (sv); parênquima clorofiliano (pcl); parênquima aquífero (paq). Secções paradérmicas da face abaxial de folhas de abacaxizeiro (C), apresentado estômato tetracítico (e), quatro células subsidiárias (cs).

A micropropagação fotoautotrófica testada nos tratamentos sem adição de sacarose no meio de cultura, não apresentou bom desempenho (Tabela 1), sendo assim necessária a adição de sacarose no meio de cultura para o crescimento *in vitro* do abacaxizeiro. Entretanto, o cultivo mantido em condições de luz natural, bem como o de ventilação natural, resulta em alterações na anatomia foliar, que aproxima este cultivo a micropropagação fotoautotrófica.

CONCLUSÃO

O sistema de micropropagação em ventilação natural, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, sob luz natural promove o melhor crescimento *in vitro* de plantas de abacaxizeiro, bem como alterações positivas na anatomia foliar das plantas, sendo superior a micropropagação convencional.

ABSTRACT: The natural light application on natural ventilation micropropagation systems makes a bigger irradiance and gaseous exchanges on *in vitro* culture, occasioning foliar anatomy alterations and possibiliting the culture more close of photoautotrophic conditions. The present study had the purpose to evaluate growth *in vitro* and foliar anatomy of pineapple plants (*Ananas comosus* L.) incubated in natural or artificial light, using two micropropagation systems (conventional and natural ventilation) with different sucrose concentrations. The treatments were composed of different sucrose concentrations (0; 15; 30 e 45 g. L⁻¹) combined with different micropropagation systems (conventional and natural ventilation), incubated under natural light. Two additional treatments were made with conventional and natural ventilation micropropagation system incubated on growth room with control of irradiance and temperature. The biggest *in vitro* growth were observed on natural ventilation under natural light with 30 g. L⁻¹ of sucrose on culture media, as well as the foliar anatomy alterations that made bigger chlorophyll parenquimata during *in vitro* culture. Natural ventilation micropropagation system in combination with natural light produces the greatest biomass production and the better foliar anatomy.

KEYWORDS: *Ananas*. Natural light. Gas exchanges . Tissue culture.

REFERÊNCIAS

- ALBANY, N. R.; VILCHEZ, J. A.; GARCIA, L.; JIMENEZ, E. Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. **Plant cell, Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v. 83, p. 357-361, 2005.
- BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 185-194, 2006.
- CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C. DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue culture *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, 1990.
- CASANOVA, E.; MOYSETT, L.; TRILLAS, M. I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 52, p. 1-8, 2008.
- DECCETTI, S. F. C.; SOARES, A. M.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, p. 341-344, 2008.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Pelotas, v. 35, p. 961-965, 2005.
- FERREIRA, D. F.; SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

- FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIÁ, J. M. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Plant Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v. 41, p. 69–76, 2005.
- IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, Coverage, v. 60, p. 143–150, 2010.
- JORGE, M. A. B.; ROBERTSON, A. I.; MASHINGAIDZE, A. B.; KEOGH, E. Distinguishing the effects of light and temperature variations on the growth, development, multiplication potential and *ex vitro* survival rates of *in vitro* cassava. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 138, p. 363-370, 2001.
- KANECHI, M.; OCHI, M.; ABE, M.; INAGAKI, N.; MAEKAWA, S. The effects of Carbon Dioxide Enrichment, Natural Ventilation, and Light Intensity on Growth, Photosynthesis, and Transpiration of Cauliflower Plantlets Culture *in vitro* Photoautotrophically and Photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, 1998.
- KHAN, S. V.; KOZAI, T.; NGUNYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia plantarum**, Prague, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.
- MAJADA, J. P.; FAL, M. A.; TADEO, F.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Berlin, v. 38, p. 272-278, 2002.
- MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZION, A. Improvement of Jojoba shoot Multiplication *in vitro* by Ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Berlin, v. 40, p. 396–402, 2004.
- MILLS, D.; TAL, M. The effect of ventilation on *in vitro* response of seedlings of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt stress, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, p. 209-216, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; NGUYEN, U. V. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, n. 3, p. 215-225, 2001.
- PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 199–205, 2004.
- SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y.; MELO, L.A.; BRAGA, F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. **Interciencia**, Caracas, v. 33, n. 11, p. 839-843, 2008.
- TALAVERA, C.; CONTREIRAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARIA, J.M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glanhouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant cell, Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v. 83, p. 287-292, 2005.