

# LUZ NATURAL E SISTEMAS DE VEDAÇÃO NA PROPAGAÇÃO *in vitro* DE CRISÂNTEMO CV. RAGE: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS

## NATURAL LIGHT AND SEAL SYSTEMS ON *in vitro* PROPAGATION OF CHRYSANTHEMUM CV. RAGE: ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS

FRANCYANE TAVARES BRAGA<sup>1</sup>, MOACIR PASQUAL<sup>2</sup>, EVARISTO MAURO DE CASTRO<sup>3</sup>, SAMANTHA LÉA DIGNART<sup>4</sup>, GABRIEL COIMBRA RAFAEL<sup>5</sup>, CLAUDINÉIA FERREIRA NUNES<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Doutora em Agronomia/Fitotecnia - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais EPAMIG - Núcleo Tecnológico Uva e Vinho - 37780-000, Caldas, MG - ftbraga@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Professor - Departamento de Agricultura - Universidade Federal de Lavras - Caixa Postal 3037 - 37200-000 - Lavras, MG - mpasqual@ufla.br

<sup>3</sup> Professor - Universidade Federal de Lavras - Caixa Postal 3037 - 37200-000 - Lavras, MG - emcastro@ufla.br

<sup>4</sup> Mestre em Agronomia/Fisiologia Vegetal - Instituto Educacional Matogrosense - UNIVAG - 78118-900, Várzea Grande, MT - leadignart@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Graduando em Engenharia Florestal - Universidade Federal de Lavras - Caixa Postal 3037 - 37200-000 - Lavras, MG - gcoimbra\_ufla@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Doutora em Agronomia/Fitotecnia - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais/EPAMIG - Núcleo Tecnológico Uva e Vinho - 37780-000 - Caldas, MG - nunescf@yahoo.com.br.

### RESUMO

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de avaliar o efeito de dois ambientes de cultivo: (sala de crescimento e casa de vegetação com sombrite 50%) e de dois sistemas de vedação de frascos: (tampa convencional e tampa com ventilação) na propagação *in vitro* de crisântemo. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais cultivados *in vitro* contendo uma gema. Foi utilizado o meio MS, acrescido de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Após 60 dias de cultivo, para todas as variáveis fitotécnicas analisadas (número de folhas, brotos e raízes e comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz) constatou-se como, o melhor ambiente de cultivo, a casa de vegetação, associado ao sistema vedação com ventilação. Quanto aos aspectos anatômicos, para densidade estomática o melhor resultado foi obtido em casa de vegetação com a utilização do sistema de vedação. Para diâmetros polar e equatorial dos estômatos, casa de vegetação e vedação convencional foram mais eficientes. A espessura do mesofilo mostrou-se maior em casa de vegetação e vedação convencional.

**Termos para indexação:** Fotoautotrofia, micropropagação, anatomia vegetal, *Dendranthema grandiflorum*

### ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effects of two environments (growth room and greenhouse with 50%) and two seal systems (conventional and ventilated seal). Explants were made of nodal segments of chrysanthemum with one bud cultivated *in vitro*. MS medium supplemented with 15 g L<sup>-1</sup> sucrose was used. After 60 days of culture, for all the analyzed variables such as number of leaves, sprouts and roots, shoot length and length of the biggest root, the best culture environment was observed in greenhouse, under ventilated seal system. For

stomatal density, the best result was obtained in greenhouse using ventilated seal system. For stomatal diameters, greenhouse and conventional seal revealed to be more efficient. Mesophyll thickness was higher in greenhouse and conventional seal.

**Index terms:** photoautotrophy, micropropagation, plant anatomy, *Dendranthema grandiflorum*

### INTRODUÇÃO

O sistema de propagação *in vitro* fotoautotrófica representa um tipo de cultivo caracterizado por fornecer condições ambientais com aumento na disponibilidade de CO<sub>2</sub> e nos níveis de radiação, bem como redução na umidade relativa dentro dos frascos, induzindo a fotossíntese e conferindo capacidade de crescimento e multiplicação das plantas em meios sem ou com reduzida suplementação orgânica (GEORGE, 2008).

Por outro lado, o uso da luz natural em substituição à luz artificial comumente observada em salas de crescimento, permite expandir o uso da micropropagação em escala comercial na produção *in vitro* de crisântemo, diminuindo o custo das mudas, cujo gasto com energia elétrica em salas de crescimento é um dos fatores mais onerosos (DIGNART et al, 2009).

(Recebido em 19 de maio de 2010 e aprovado em 11 de novembro de 2010)

Uma alternativa viável seria o cultivo *in vitro* em ambiente de luz natural. Essa tecnologia não é muito adotada por não estarem esclarecidos seus efeitos sobre as culturas que, convencionalmente, são condicionadas em luz artificial, com intensidades luminosas inferiores e com fotoperíodo e temperatura controlada (ERIG & SCHUCH, 2005).

Algumas técnicas e metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de fornecer condições ambientais que promovam a capacidade fotossintética do material micropropagado e favoreçam a aquisição de fotoautotrofia *in vitro*. Como exemplo tem-se a utilização de filtros de membranas com microporos permeáveis a gases, que promovem aumento na transferência destes entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo, sendo a atmosfera ao redor do recipiente mantida sob concentrações normais de CO<sub>2</sub> (sistema de ventilação natural) ou enriquecida com CO<sub>2</sub> (sistema de ventilação forçado), e a utilização de maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) por meio da iluminação natural (DECCETTI et al., 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a micropropagação fotoautotrófica, ou seja, na ausência de sacarose e aumento de irradiação, tem apresentado algumas vantagens, quando comparada aos sistemas convencionais de micropropagação (ROCHA et al., 2007; COSTA et al., 2009; BRAGA et al., 2009). Isso porque promove maior crescimento e desenvolvimento *in vitro*, diminuindo o nível de contaminação; simplifica os meios de cultura, uma vez que permite a retirada de certos reguladores de crescimento e compostos orgânicos e promove rápido e vigoroso desenvolvimento das plantas durante a aclimatização (SILVA et al., 2008).

A eliminação total de uma fonte de carbono do meio de cultura deve ser questionada em algumas situações, uma vez que o processo de hiper-hidricidade ou vitrificação pode ser provocado em função do alto potencial hídrico do meio de cultura, o que disponibiliza mais facilmente água para os explantes (HAZARIKA, 2006).

Diante dessas considerações, neste estudo, objetivou-se avaliar um sistema de vedação para frascos que permite troca de gases do recipiente de cultivo com o meio externo,

bem como o uso de luz natural como fonte de irradiação luminosa na propagação *in vitro* de crisântemo cv. Rage.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado constituiu-se de propágulos de crisântemo cv. Rage já estabelecidos *in vitro*, dos quais foram retirados segmentos nodais contendo uma gema e inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com adição de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

O experimento foi conduzido em dois ambientes de luz: 1) casa de vegetação (CV), onde os frascos foram colocados diretamente sobre as bancadas sob proteção adicional de sombrite com 50% de retenção da radiação solar e 2) sala de crescimento convencional (SC), com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e DFFA de 45,5 W m<sup>-2</sup>, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Os frascos foram vedados com tampas convencionais de polipropileno e tampas provenientes da Samavidros®, modelo BioSama. Tais tampas possuem um orifício de borracha com furo de 1 mm de diâmetro preenchido com algodão hidrofílico e um filtro millipori com porosidade de 22 µm, permitindo trocas gasosas dentro dos recipientes.

A radiação dentro da casa de vegetação foi avaliada, com a utilização de um sensor de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA) acoplado a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor.Neb), a cada meia hora, durante 12 horas (das 06:00 às 18:00 horas). O valor médio de radiação recebida no ambiente casa de vegetação foi de 99,43 W m<sup>-2</sup>.

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas características fitotécnicas e anatômicas.

Como características fitotécnicas avaliou-se o número de folhas e raízes por propágulo e comprimento da parte aérea e de raízes. Para os estudos anatômicos, seguiu-se o protocolo definido por Kraus & Arduin (1997), avaliando-se a espessura dos tecidos do limbo foliar. Em relação às características paradérmicas avaliou-se número de estômatos/mm<sup>2</sup> e diâmetro polar e equatorial dos mesmos, de acordo com a técnica descrita por Laboriau et al. (1961).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 (ambiente de luz) x 2 (Tampas), totalizando quatro tratamentos, com 10 repetições. Cada qual composta por um frasco contendo cinco segmentos nodais.

Os dados foram submetidos ao programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2000), para a realização das análises de variância. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados não foram significativos para a interação dos fatores ambiente de luz e sistema de vedação. Para ambiente de luz, foram observadas diferenças significativas para todas as variáveis, exceto número de brotações, onde o melhor resultado foi apresentado pelo ambiente casa de vegetação (Tabela 1).

Quanto ao sistema de vedação, houve diferenças significativas apenas para as variáveis, número de folhas e comprimento de raízes, sistema de vedação com ventilação natural proporcionou os maiores resultados (Tabela 1).

Contrariando os resultados obtidos neste trabalho com o uso de maior irradiância em casa de vegetação, Kanechi & Ochi (1998) trabalhando com *Brassica oleracea* L., avaliaram diferentes condições de cultivo *in vitro*, a fotomixotrófica e a fotoautotrófica e observaram que baixas intensidades de irradiância e sistema de vedação com ventilação natural promoveram maior área foliar, bem como maior massa de raízes e brotos nos propágulos.

Uma das formas de facilitar o processo de aclimatização de propágulos cultivados *in vitro* seria aumentar a intensidade luminosa, promovendo a fotossíntese e melhorando as relações hídricas. Ibaraki & Nozaki (2005) afirmam que se houver necessidade de desenvolver capacidade fotossintética nos tecidos, um dos fatores mais importantes que devem ser considerados é o ambiente de luz, especialmente a intensidade.

O emprego de luz natural é uma forma de aumentar a irradiância no ambiente de cultivo *in vitro*. A alta irradiância altera a divisão celular, a diferenciação do mesofilo e o desenvolvimento de estômatos na lâmina foliar (ERIG & SCHUCH, 2005).

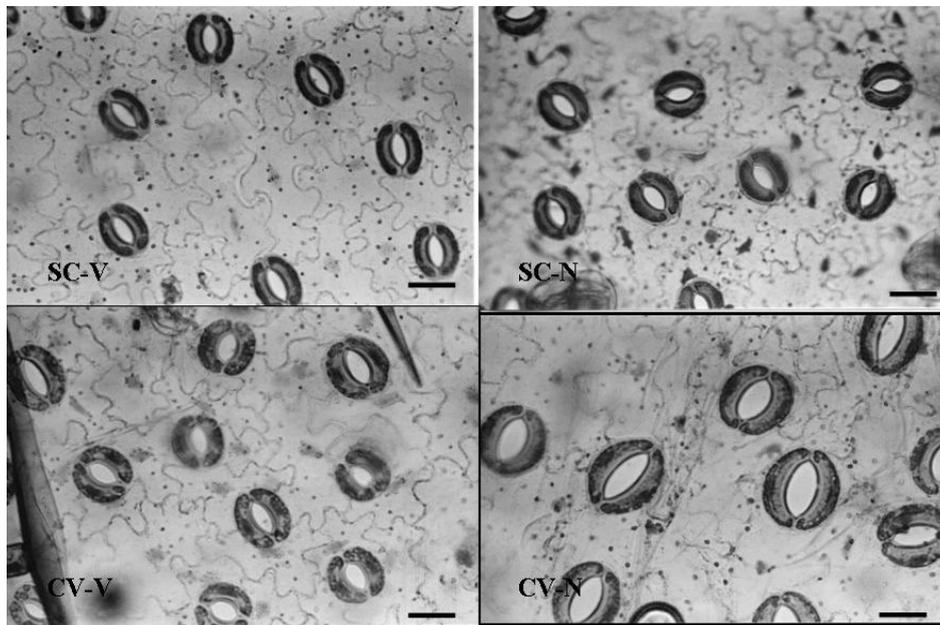
O aumento dos níveis de irradiância durante o crescimento *in vitro* e a concentração de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos, são fatores críticos na promoção de altas taxas fotossintéticas em plantas cultivadas em condições fotoautotróficas (SILVA et al., 2008). Por outro lado, a fixação de carbono pelas folhas desenvolvidas *in vitro* em meios sem adição extra de sacarose é insuficiente para que ocorra um crescimento autotrófico, principalmente após transferência para aclimatização, sendo necessária uma adição desse carboidrato ao meio de cultura (GEORGE, 2008).

Observou-se que as folhas de crisântemo cv. Rage são do tipo hipostomática, apresentando estômatos do tipo anomocíticos, com células-guardas de formato elíptico, e grande quantidade de tricomas tectores multicelulares não ramificados em toda a extensão da superfície abaxial (Figura 1).

**TABELA 1** – Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e número de brotações (NB), de propágulos de crisântemo cv. Rage, cultivado em diferentes ambientes de luz e sistemas de vedação.

AMBIENTE DE LUZ	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
Casa de vegetação	27,85a	7,36a	15,32a	13,57a	2,62a
Sala de crescimento	20,32b	6,21b	11,27b	10,11b	2,27a
SISTEMA DE VEDAÇÃO	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
Ventilação natural	26,55a	6,92a	13,95a	10,99b	2,57a
Convencional	21,62b	6,61a	12,65a	12,68a	2,32a

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**FIGURA 1** – Fotomicrografias da superfície abaxial de folhas de crisântemo. SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = sistema de vedação com ventilação e N = sistema de vedação convencional. Barra = 25µm. UFLA, Lavras, MG, 2009.

Ocorreu interação significativa entre os fatores ambiente de luz e sistema de vedação para as variáveis, número de estômatos e diâmetro polar. Para diâmetro equatorial, não foi observada interação entre os fatores (Tabela 2). Maior número de estômatos foi verificado com a interação de casa de vegetação com sistema de vedação com ventilação natural.

O aumento no número de estômatos sob maiores níveis de irradiância e ventilação natural demonstra que plantas cultivadas *in vitro* têm tendência semelhante à de plantas cultivadas em outros ambientes, que é de aumentar a frequência de estômatos sob maior disponibilidade de luz e CO<sub>2</sub>. Maior número de estômatos em plantas cultivadas *in vitro*, quando comparadas a plantas cultivadas em ambientes naturais, tem sido reportado em diversos estudos que têm associado esse aumento, principalmente, à alta umidade relativa dentro dos frascos (KHAN et al., 2003; COSTA et al., 2009).

Os estômatos das folhas que se desenvolveram em casa de vegetação apresentaram formato elíptico e mostraram-se maiores em sistema de vedação convencional. Os desenvolvidos em casa de vegetação com ventilação natural apresentam-se menores e de formato elíptico (Figura 1).

**TABELA 2** – Número de estômatos, diâmetros polar e equatorial dos estômatos de folhas de propágulos cultivados sob diferentes ambientes de luz (sala de crescimento-SC e casa de vegetação-CV) e sistema de vedação com ventilação natural e convencional.

	Número de Estômatos (mm <sup>2</sup> )	
	Ventilação	Convencional
<b>CV</b>	163,54aB*	91,74bA
<b>SC</b>	150,96aA	141,34aA
	Diâmetro polar (µm)	
	Ventilação	Convencional
<b>CV</b>	49,45aB	56,81aA
<b>SC</b>	39,15bA	41,54bA
	Diâmetro equatorial (µm)	
	CV	SC
	39,09a**	29,13b
	Ventilação	Convencional
	34,08a	34,14a

\* Letras minúsculas correspondem às colunas e letras maiúsculas às linhas.

\*\*Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

**TABELA 3** – Número de estômatos, diâmetros polar e equatorial dos estômatos de folhas de propágulos cultivados sob diferentes ambientes de luz (sala de crescimento-SC e casa de vegetação-CV) e sistema de vedação com ventilação natural e convencional.

	<b>EAb</b> (µm)	<b>EAd</b> (µm)	<b>PE</b> (µm)	<b>PP</b> (µm)
<b>CV</b>	24,00a	31,95a	110,70a	55,80a
<b>SC</b>	20,40b	27,50b	89,10b	33,50b

\* Letras minúsculas correspondem às colunas e letras maiúsculas às linhas.

\*\*Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Maior diâmetro polar foi verificado em estômatos de propágulos cultivados em casa de vegetação com vedação convencional. Quanto ao diâmetro equatorial, não houve interação significativa entre os fatores estudados, tendo sido observada diferença apenas para o ambiente de luz. Os maiores resultados foram observados em casa de vegetação.

Alguns trabalhos demonstraram que a presença de uma fonte de carboidrato no meio, bem como o acúmulo de etileno no interior do frasco e, principalmente, a alta umidade relativa nos recipientes vedados convencionalmente resultam no desenvolvimento anormal dos estômatos e na reduzida capacidade de fechamento destes em resposta às condições severas do ambiente natural, como, por exemplo, a demanda evaporativa das plantas em ambientes *ex vitro* (DECETTI et al., 2008; ROCHA et al., 2007; BRAGA et al., 2009; COSTA et al., 2009).

A funcionalidade dos estômatos sob diferentes condições de cultivo, condições estas que se aproximem do ambiente natural, pode impedir a excessiva dessecação das plantas micropropagadas após o transplante, aumentando as taxas de sobrevivência durante o processo de aclimatização.

Não houve interação entre os fatores estudados para o espessamento das epidermes abaxial e adaxial, bem como para os parênquimas paliçádico e esponjoso (Tabela 3 e 4). Analisando-se os ambientes de cultivo separadamente, observaram-se diferenças significativas.

Para as epidermes abaxial e adaxial e os parênquimas paliçádico e esponjoso, a maior espessura foi observada em folhas de propágulos mantidos em casa de vegetação.

Para o sistema de vedação, foram observadas diferenças significativas apenas para as variáveis, epiderme abaxial e parênquima esponjoso. As demais não diferiram

significativamente entre si. Porém, os maiores valores, foram obtidos em sistema de vedação convencional.

Em todas as condições de cultivo, as epidermes apresentaram apenas uma camada de células (epiderme uniestratificada) que não apresentaram um formato definido, sendo revestidas por uma fina camada de cutícula. O mesofilo, nos dois ambientes de luz, mostrou-se dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial). O parênquima paliçádico apresentou apenas uma camada de células, com células de formato indefinido e arranjas desorganizadamente, o parênquima esponjoso mostrou células também desuniformes e espaçadas (Figura 2).

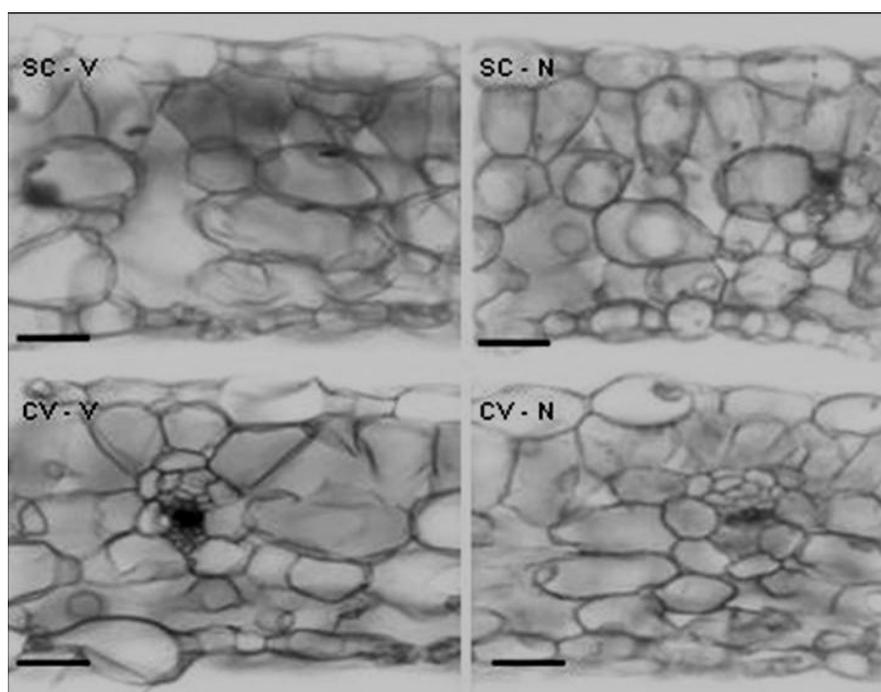
O aumento na espessura da folha e células paliçádicas mais alongadas constituem um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz e evidenciam a plasticidade adaptativa da planta. A capacidade de alterar a estrutura da folha em resposta ao ambiente, principalmente ao nível de irradiância, tem sido comumente observada em diversas espécies cultivadas *in vitro* (LEE et al., 2000; SILVA et al., 2008; BRAGA et al., 2009; COSTA et al., 2009).

Os resultados deste trabalho demonstram que diferentes ambientes de cultivo, principalmente diferentes níveis de irradiância, podem modificar o desenvolvimento da folha *in vitro*, tornando a anatomia desta mais semelhante à das plantas cultivadas em ambiente *in vivo*. Dessa maneira, o aumento na capacidade fotossintética de crisântemo em estágios do desenvolvimento *in vitro*, principalmente sob alta irradiância, pode estar associado ao maior desenvolvimento das características estruturais relacionadas ao processo fotossintético, como a maior diferenciação do mesofilo, principalmente do parênquima paliçádico.

**TABELA 4** – Espessura dos tecidos epidérmicos e dos parênquimas paliçádico e esponjoso de folhas crisântemo desenvolvido durante cultivo *in vitro* sob ambiente de casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC).

	EAb <sub>a</sub> (µm)	EAd <sub>a</sub> (µm)	PE (µm)	PP (µm)
Ventilação	19,95b	29,10a	85,85b	44,45a
Convencional	24,45a	30,45a	112,95a	44,85a

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% probabilidade.



**FIGURA 2** – Fotomicrografias de cortes transversais de folhas de crisântemo desenvolvidas durante o cultivo *in vitro* sob SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = ventilação natural e N = convencional. Barra = 70µm UFLA, Lavras, MG, 2009.

### CONCLUSÕES

O cultivo em ambiente casa de vegetação proporciona um aumento no número de folhas, raízes, brotos e comprimento de parte aérea e raízes, o uso de vedação que permite ventilação natural não interfere no crescimento dos propágulos.

O uso de casa de vegetação como ambiente de cultivo *in vitro* proporciona maior formação de número de estômatos com formato elíptico.

Maior espessura dos tecidos que compõem o limbo foliar é obtida quando propágulos de crisântemo são cultivados *in vitro* em casa de vegetação.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro recebido.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; DIGNART, S. L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J. M. P. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n.2, p. 502-508, 2009.

- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 742-748, 2009.
- DECSETTI, 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.
- DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, 2005.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Great Britain: Exegetics, 2008. 479p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.0**: Sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 105-120, 2006.
- IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 111-113, 2005.
- KANECHI, M.; OCHI, M. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration for cauliflower plantlets cultured *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.; NGUYEN, O. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.46, n.2, p. 161-166, 2003.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 198p.
- LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABORIAU, M. I. 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, 1961.
- LEE, D. W. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, New York, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAÚJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação *in vitro* de bananeira 'Prata anã (AAB)': Intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell culture and Micropropagation**. Lavras, v.3, n.1, p. 10-17, 2007.
- SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. de; MIYATA, L. Y.; MELO, L. A. de.; BRAGA, F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, Caracas, v. 33, p. 839-843, 2008.