

Caracteres anatômicos de fibras foliares de brotações de curauá propagadas *in vitro*

Flávia Dionísio Pereira^{1*}, José Eduardo Brasil Pereira Pinto¹, Luciana Domiciano Silva Rosado¹, Daniel Melo de Castro², Helen Cristina de Arruda Rodrigues¹, Luiz Alberto Beijo³ e Osmar Alves Lameira⁴

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, Brasil. ²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. ³Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. ⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Autor para correspondência. E-mail: flavia1808@hotmail.com

RESUMO. O curauá [*Ananas erectifolius* (L.B.Sm) - Bromeliaceae] é uma espécie com grande potencial de utilização na indústria automobilística, devido à sua resistência, maciez e peso reduzido. O objetivo deste trabalho foi comparar fibras presentes em brotações de curauá cultivadas *in vitro*, advindas ou não do estiolamento, bem como contribuir para a descrição anatômica das folhas. Foram comparadas brotações de curauá produzidas *in vitro*, pelo método convencional (T1) e pelo método de estiolamento (T2). Nas seções transversais, os feixes de fibras associadas e não às nervuras foram contados e tiveram os diâmetros medidos. O número e o diâmetro dos feixes de fibras associadas ou não às nervuras foram superiores no (T1). Este tratamento produziu 23,7 fibras não associadas às nervuras, enquanto que o (T2) produziu 14,3, e nas fibras associadas às nervuras, o (T1) produziu 14,6 e o (T2) produziu 11,3. No diâmetro das fibras associadas às nervuras em (T1) obteve-se 61,61 μm e em (T2), 53,17 μm . Para o diâmetro das fibras não associadas às nervuras, não houve diferença significativa. Quanto às características anatômicas, as maiores diferenças visuais foram constatadas no volume do clorênquima e do parênquima aquíífero, que foram maiores no (T2). Portanto, brotações de curauá cultivadas *in vitro* obtidas de brotos não estiolados possuem a tendência de produzir mais fibras.

Palavras-chave: *Ananas erectifolius*, anatomia foliar, brotos estiolados, fibras.

ABSTRACT. Anatomical characters of curauá foliar fibers from plantlets *in vitro* propagation. Curauá [*Ananas erectifolius* (L.B.Sm) - Bromeliaceae] is a species with great utilization potential in the car manufacture, due to its resistance, softness and reduced weight. The objective of this study was to examine the presence of fibers in curauá plantlet cultured *in vitro* deriving or not from elongation as well as to contribute to anatomical leaf description. curauá shoots produced *in vitro* were compared, by the conventional method (T1) and by the elongation method (T2). In the transversal cuts, fibers bundle related or not to the nervure were counted and fiber bundle diameters measured. The number and fiber bundle diameter related or not to vein were superior in (T1) that produced 23.7 fibers not related to vein while (T2) produced 14.3. The related fibers to vein (T1) produced 14.6 and (T2) 11.3. As for fibers diameter related to vein (T1) obtained 61.61 μm and (T2) 53.17 μm . For the fibers diameter not related to vein, there was no significant difference. For anatomical characteristics, higher visual differences are in the chlorchyma volume and in the aquíferus parenchyma that were higher in (T2). Therefore, curauá's shootlet cultured *in vitro* from shoot elongation tend to produce more fibers.

Key words: *Ananas erectifolius*, leaf anatomy, shoot elongation, fibers.

Introdução

O mercado de fibras naturais no Brasil representa cerca de 1 milhão de empregos em áreas economicamente deprimidas. O surgimento de novos materiais ecológicos cria uma perspectiva de melhoria da qualidade de vida dos pequenos produtores que ocupam estas áreas. O curauá

(*Ananas erectifolius*) é uma bromeliaceae que desponta como sucedâneo na fabricação de cordas, sacos e utensílios domésticos. Recentes estudos garantem o seu grande potencial de utilização na indústria automobilística, devido à sua resistência, maciez e peso reduzido. A espécie é nativa e rústica, ainda pouco conhecida e estudada. A planta é característica

da Amazônia paraense; cresce até em solo arenoso e pouco fértil chegando a atingir entre um metro e um metro e meio de altura. Cada planta produz entre 12 e 15 folhas, das quais são extraídos cerca de dois quilos de fibras (Rocha e Gheler Júnior, 2003; Ramalho, 2005).

A crescente demanda de fibras do curauá por grupos empresariais a torna uma espécie estratégica, criando perspectivas socioambientais do seu uso. O grande problema é que não há suprimento suficiente de matéria-prima para atender à indústria automobilística, que pretende substituir a fibra de vidro pelo curauá na fabricação de peças como pára-choque, painel e friso de carros de passeio e de transporte (Silva, 2004; Ramalho, 2005).

Pouco se sabe sobre a anatomia de órgãos vegetativos de plantas micropropagadas, como são afetadas pelas condições ambientais de cultivo ou como a anatomia de plantas transplantadas é modificada durante a aclimatização antes de serem levadas para ambientes de campo. Frequentemente, estes tipos de plantas são afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degeneração metabólica e morfológica. A propagação em massa depende da suplementação de carboidratos como fonte de energia para o estabelecimento dos explantes, bem como para os estádios sucessivos de multiplicação. No entanto, o ambiente *in vitro* afeta a morfogênese dos explantes levando, algumas vezes, a consequências negativas para o crescimento e ao desenvolvimento das culturas, comprometendo, assim, a obtenção de taxas de estabelecimento e de multiplicação satisfatórias (Ziv, 1986; Campostrini e Otoni, 1996).

A anatomia interna e a ultra-estrutura das plantas regeneradas *in vitro* são, geralmente, diferentes daquelas crescidas em casa de vegetação ou em campo (Wetzstein *et al.*, 1981). Comparativamente às plantas desenvolvidas *in vitro*, em geral, apresentam-se pouco lignificadas, com células de paredes pouco espessadas, com abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de tecidos de sustentação (esclerênquima e colênquima) (Donnelly *et al.*, 1985), sujeitos a desordens morfológicas e fisiológicas (Ziv, 1986; Kozai e Kitaya, 1995).

Estudos histológicos demonstram que a excessiva perda de água, que contribui para a dessecação das mudas após transferência, tem sido atribuída a diversas anormalidades induzidas pelas condições *in vitro*, como: pobre formação de cêra epicuticular, aliada à alteração na composição química das ceras, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos; deficiência no mecanismo de

fechamento estomático; aumento na frequência de estômatos; localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha e reduzida diferenciação do mesofilo das folhas com alta proporção de espaços intercelulares (Kozai e Kitaya, 1995; Campostrini e Otoni, 1996).

Gavilanes (1981) relata que pesquisas de anatomia foliar podem conduzir a soluções para problemas relacionados com a multiplicação, melhoramento e cultivo dos vegetais. Plantas que eventualmente possam vir a apresentar interesses econômicos carecem de pesquisas dessa natureza, como é o caso do curauá.

O objetivo deste trabalho foi comparar as fibras existentes em brotações de curauá cultivadas *in vitro* por dois métodos de propagação, bem como contribuir com a descrição anatômica de seus tecidos, fornecendo subsídios para o melhor conhecimento da anatomia da espécie.

Material e métodos

O experimento foi feito por meio de dois tratamentos. No tratamento 1 (T1), brotações de curauá foram produzidas *in vitro* pelo método convencional de micropropagação; no tratamento 2 (T2), as brotações foram obtidas pelo método de estiolamento *in vitro*.

Tratamento (1): método convencional de micropropagação

Os explantes produzidos por esse método foram obtidos de gemas axilares provenientes de plantas matrizes. As gemas axilares foram excisadas e inoculadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) líquido sem regulador de crescimento. As brotações foram repicadas no mesmo meio de estabelecimento e permaneceram por 60 dias incubadas a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ em fotoperíodo de 16 horas de luz sob radiação fotossintética ativa de $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Quando as brotações atingiram comprimento médio de aproximadamente 10 cm, foram retiradas para as análises anatômicas.

Tratamento (2): método de estiolamento

Utilizaram-se propágulos de curauá preestabelecidos *in vitro* que estavam inoculados em meio MS sem regulador de crescimento. Selecionaram-se as brotações e os brotos obtidos destas foram desfolhados completamente. Esses brotos foram cultivados em meio MS sólido, com 50 mL de meio suplementado com $1,86\ \text{mg L}^{-1}$ de ANA, seguindo protocolo sugerido por Pereira *et al.* (2005). Mantidos em sala de crescimento os explantes foram incubados a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro. Após 40 dias, removeram-se o ápice e o sistema

radicular dos brotos estiolados, que foram colocados horizontalmente em frascos com meio MS líquido sob agitação de 85rpm em mesa agitadora orbital. Os brotos estiolados foram incubados a $26\pm1^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 16 horas luz sob radiação fotossintética ativa de $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Aos 60 dias, as brotações já estavam bem formadas e, assim que atingiram comprimento médio de aproximadamente 10 cm, foram também retiradas para as análises anatômicas.

Estudos anatômicos: seções transversais

Foram retiradas amostras da porção mediana do limbo de folhas maduras provenientes dos tratamentos descritos anteriormente. As folhas de curauá foram então, colocadas para fixação em F.A.A. (50%) durante 120 horas (5 dias), sendo posteriormente conservadas em álcool etílico 70% (Johansen, 1940). Em seguida, retirou-se um segmento da folha, incluindo nervura mediana e um dos lados do limbo foliar. Esse segmento foi incluído em historesina (Leica Historesina, Embedding Kit). As seções transversais com espessura de $12\ \mu\text{m}$, foram realizadas em micrótomo rotativo automático (Leica 2045, Multicut) e distendidos em lâminas de vidro.

Coloração

As lâminas contendo as seções de curauá foram coradas com azul de toluidina por 15 segundos. O excesso do corante foi retirado com água, sendo, depois, utilizada resina Permunt para montar as lâminas permanentes.

Determinação das variáveis

Nas seções transversais foram realizadas as contagens dos feixes de fibras em toda a extensão da folha, sendo contados os feixes de fibras associadas às nervuras (FAN) e fibras não associadas às nervuras (FNAN).

Foi também medido o diâmetro das FAN e das FNAN, tomando-se como base os sete primeiros feixes ao lado da nervura mediana.

As medições foram realizadas utilizando-se ocular micrometrada aferida com lâmina micrometrada, em cinco cortes por repetição, sendo utilizados dois tratamentos com quatro repetições. Os valores foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Todas as medições e contagens, assim como o registro fotográfico das lâminas, foi realizado em fotomicroscópio Olympus modelo BX-60 e o programa utilizado para análise dos dados foi o software Sisvar (Ferreira, 2003).

Resultados e discussão

Quanto à viabilidade de multiplicação *in vitro* de curauá, ambos tratamentos utilizados produziram brotos bem formados, vigorosos, com a coloração verde-escura característica das plantas matrizes. Eram rígidas ao serem excisadas, devido à presença das fibras nas folhas que tinham a coloração branca, podendo-se observá-las a olho nu.

Houve diferença significativa nos feixes de fibras associadas às nervuras e não associadas às nervuras entre os tratamentos. Os valores das variáveis no tratamento o qual as brotações foram obtidas pelo método convencional foi superior nas duas variáveis estudadas, o que era previsto, tendo em vista que, no processo de estiolamento, a regeneração das gemas axilares dos brotos estiolados em brotações é mais demorada e ocorre gradativamente, à medida em que é exposta à luz. Brotações sob o tratamento convencional produziram 23,7 feixes de fibras não associadas às nervuras e aquelas sob tratamento no qual foi adotado o método de estiolamento produziram 14,3. Para a variável fibras associadas às nervuras, pelo método convencional as brotações produziram 14,6 feixes de fibras e pelo método de estiolamento produziram 11,3 (Figura 1).

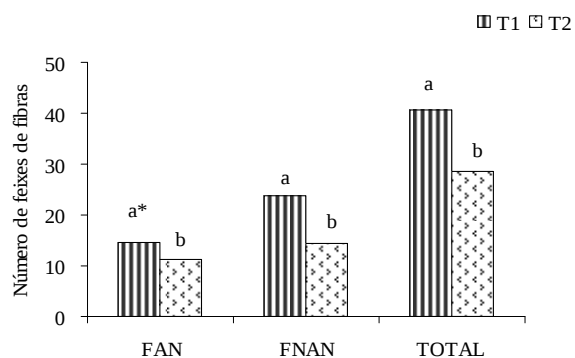


Figura 1. Número médio de fibras associadas às nervuras (FAN), não associadas às nervuras (FNAN) e número total de fibras (TOTAL). T1. Brotações obtidas pelo método convencional e T2. Brotações obtidas pelo método de estiolamento. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2006.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott.

Quanto ao diâmetro dos feixes de fibras associadas às nervuras também ocorreu diferença significativa e assim como para a variável número de feixes de fibras o T1, que utilizou o método convencional, foi superior ao T2, que utilizou o método de estiolamento. O diâmetro obtido em T1 foi de $61,61\ \mu\text{m}$ e em T2 de $53,17\ \mu\text{m}$. Já para o diâmetro dos feixes de fibras não associadas às nervuras não houve diferença significativa; em T1 obteve-se $35,89\ \mu\text{m}$ e em T2, $34,29\ \mu\text{m}$ (Figura 2).

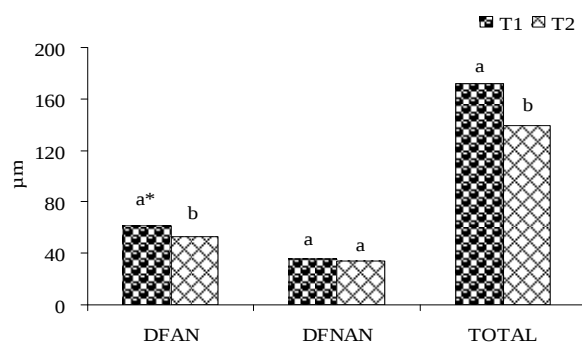


Figura 2. Diâmetro médio de fibras associadas às nervuras (FAN), não associadas às nervuras (FNAN) e número total de fibras (TOTAL). T1. Brotações obtidas pelo método convencional e T2. Brotações obtidas pelo método de estiolamento. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2006.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott.

Quando verificado os valores totais dos números de feixes de fibras e o diâmetro delas, verificou-se que houve diferenças significativas. O método convencional, T1, foi superior ao método de estiolamento, T2, nas duas variáveis. O número total de feixes de fibras no T1 foi de 40,72 e no T2 de 28,50. Quanto ao diâmetro total o T1 obteve 171,66 μm e o T2 139,71 μm (Figuras 1 e 2).

Conforme os resultados obtidos, o estiolamento causa redução nos feixes de fibras das mudas produzidas, tanto no número quanto no diâmetro dos feixes. Entretanto, não se pode afirmar que esta redução irá determinar também a redução das fibras nas plantas terminadas (plantas aptas para serem levadas para o plantio no campo), sendo necessário que se realizem estudos semelhantes em plantas produtivas (plantas adultas) no campo. Isso porque a capacidade de recuperação de plantas produzidas *in vitro* na fase de aclimatização e no campo é grande e é observada em diversas espécies como, por exemplo, *Lychnophora pinaster* (Souza, 2003), *Fragaria x ananassa* (Calvete et al., 2005), *Brosimum gaudichaudii* (Fideles, 1998) e *Tridax procumbens* (Cerqueira, 1999).

Quanto às características anatômicas, tanto no tratamento que utilizou o método convencional (T1) como no que utilizou o método de estiolamento (T2), pôde-se constatar que todas as folhas estudadas são revestidas por epiderme unisseriada. Observa-se cutícula relativamente espessa. O mesófilo é homogêneo, com células isodiamétricas a ovaladas (Figuras 3.1-2).

As folhas são hipostomáticas e os estômatos se localizam um pouco acima do nível das células epidérmicas (Figura 3.3-4). Esta última característica se deve, provavelmente, ao ambiente de cultivo das brotações, *in vitro*, no qual existe água em abundância.

Abaixo da epiderme, nas duas superfícies foliares, observa-se a ocorrência de uma provável hipoderme, mais desenvolvida na face adaxial, e constituída por uma camada de células bastante distintas. Abaixo da hipoderme, na face adaxial, nota-se a presença de parênquima aquífero, formado por uma a duas camadas de células grandes, com paredes delgadas (Figuras 3.5-6 e 4.7-8). Nota-se, ainda, nas células desse tecido, que as paredes possuem algumas deformações que ocorrem, provavelmente, devido à pouca resistência mecânica dessas paredes, uma vez que brotações originadas de cultivo *in vitro* possuem, geralmente, células com paredes mais delgadas. Alia-se a este o fato das células que compõem esse tecido serem grandes e com paredes muito extensas o que, por si, já causa certa redução na resistência mecânica de parênquimas aquíferos.

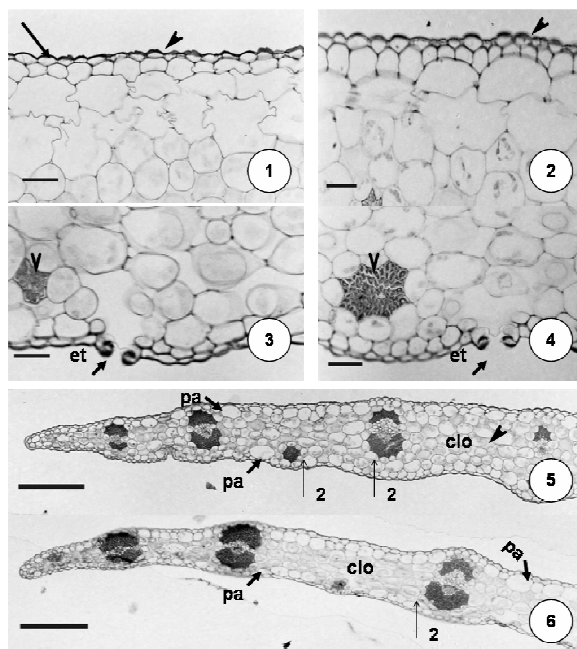


Figura 3. Secções transversais de folhas de *Ananas erectifolius* 1-2. epiderme da superfície adaxial (seta), mostrando cutícula (cabeça de seta) 1. (T2). 2. (T1). 3. Estômatos (et) localizados abaixo do nível das demais células epidérmicas com câmara subestomática e agrupamentos de fibras (cabeças de seta) 3. (T2). 4. (T1). 5. Parênquima aquífero (pa) (seta), calotas de células com paredes espessadas junto ao xilema e ao floema e aos grupos de fibras (seta 2), clorênquima (clo) situado entre os parênquimas aquíferos subepidérmicos (cabeça de seta) (T2). 6. (T1). Barra= 10 μm . Lavras, Estado de Minas Gerais, 2006.

Embora seja comum não só em bromélias, como em outras espécies com parênquima aquífero, mostrarem células periféricas menores e as mais internas amplas, na literatura referente a bromeliaceae muitos autores referem-se à hipoderme aquífera. Porém, estudos ontogênicos são necessários para que se saiba se o tecido descrito

pode ser denominado de hipoderme aquífera.

Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Tomlinson (1969), quando estudou outros representantes da família. Segundo este autor, este tecido, mais desenvolvido na face adaxial, é constituído por várias camadas celulares; dependendo da forma e do grau de espessamento parietal, ele pode ser reconhecido como um tecido mecânico ou armazenador de água (aquéifero). Aoyama e Sajo (2003), estudando espécies de bromélias, também observaram semelhante ocorrência, a qual denominaram de hipoderme aquífera em *Ronnbergia brasiliensis* e *R. neoregeloides*.

O mesófilo é formado por parênquima clorofiliano do tipo homogêneo. As células apresentam diâmetro variável. Ao se realizar uma análise visual parece que, nas brotações não estioladas, as células do clorênquima são menos volumosas quando comparadas com as células das plantas estioladas (Figura 4.7-8).

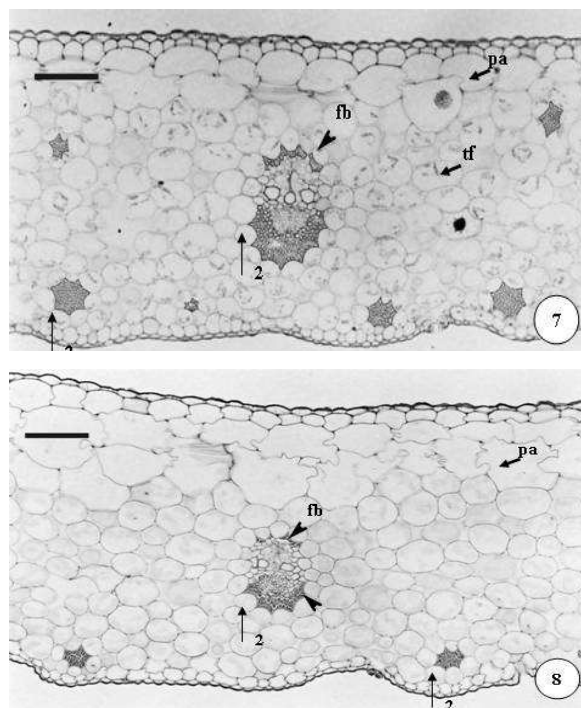


Figura 4. Secções transversais de folhas de *Ananas erectifolius*: 7. Parênquima aquífero bastante desenvolvido (pa) (seta), tecido fotossintetizante (tf), grupos de fibras (fb), calotas de células com paredes espessadas adjacentes ao xilema e ao floema e aos grupos de fibras (seta 2) (T2). 8. (T1). Barra= 10 µm. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2006.

Pôde ser observado que os feixes vasculares têm um arranjo colateral e são delimitados por calotas de fibras junto ao floema e ao xilema (Figuras 4.7-8). Também há cordões de fibras entre as nervuras.

Analisando-se os caracteres foliares estudados,

nota-se que as estruturas desenvolvidas em brotações de curauá no método convencional e no método de estiolado apresentam organizações anatômicas semelhantes (Figuras 3 e 4). Visualmente, as maiores diferenças estão no volume do clorênquima e do parênquima aquífero, que são maiores no método de estiolamento. Provavelmente, este pode ter sido um mecanismo de defesa encontrado para que as plantas submetidas ao método de estiolamento pudessem desenvolver melhor nas condições impostas, que eram mais severas que as do método convencional. Faz-se necessário, porém, o desenvolvimento de estudos complementares, necessários para comprovar tal hipótese. Além destas diferenças percebe-se a diferença quantitativa das fibras, analisando as Figuras 4.7-8, ou seja, entre os tratamentos.

Conclusão

Brotações produzidas *in vitro* pelo método convencional produzem mais feixes de fibras e com diâmetro maior do que aquelas obtidas pelo método de estiolamento.

Os volumes do clorênquima e do parênquima aquífero apresentam-se visualmente maiores em brotações obtidas pelo método de estiolamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos estudantes Lucas Amaral de Melo e José Fábio Camolesi, pela colaboração na confecção das fotomicrografias, e à professora Renata Maria Strozi Alves Meira, da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração.

Referências

- AOYAMA, E.M.; SAJO, M.G. Estrutura foliar de *Aechmea Ruiz* e Pav. subgênero *Lamprococcus* (Beer) Baker e espécies relacionadas (Bromeliaceae). *Rev. Bras. Bot.*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 461-473, 2003.
- CALVETE, E.O. et al. *Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas in vitro e ex vitro*. [S.l.: s.n.], 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>>. Acesso em: abr. 2005.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. *Aclimação de plantas: Abordagens recentes*. [ABCTP NOTÍCIAS, 25], [S.l.: s.n.], 1996. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/laborato/biocel/abctp25.htm>>. Acesso em: abr. 2006.
- CERQUEIRA, E.S. *Propagação e calogênese in vitro em erva-de-touro (Tridax procumbens L.), uma planta medicinal*. 1999. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- DONNELLY, D.J. et al. The anatomy of tissue cultured raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant. Cell*.

- Tissue Organ. Cult.*, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, 1985.
- FERREIRA, D.F. *Sisvar* - versão 4,3. Lavras: DEX/Ufla, 2003.
- FIDELIS, I. *Micropropagação de Brosimum gaudichaudii Tréc. (Mamacadela), uma espécie medicinal*. 1998. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- GAVILANES, M.L. *Anatomia e nervação foliar de espécies nativas do gênero Gomphera L. (Amaranthaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil*. 1981. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1981.
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. 3.ed. New York: Paul B. Hoeber, Inc., 1940.
- KOZAI, T.; KITAYA, Y. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In: TERZI, M. et al. (Ed.). *Current issues in plant molecular and cellular biology*. London: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 659-667.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.15, n. 3, p 473-479, 1962.
- PEREIRA, F.D. et al. Diferentes condições de cultivo de brotos estiolados para obtenção de mudas de *curauá*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45., 2005. CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15., 2005. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 23., 2005, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: Horticultura Brasileira, 2005. p. 632.
- RAMALHO, E. *A folha amazônica que virou arte*. [S.l.: s.n.], 2005. Disponível em: <http://www.rfi.fr/actubr/articles/068/article_124.asp>. Acesso em: ago. 2005.
- ROCHA, E.C.; GHELER JÚNIOR, J. *Aproveitamento de resíduos gerados na aglomeração de fibras de coco com Látex natural*. Matéria Técnica. [S.l.: s.n.], 2003. Disponível em: <<http://www.biologo.com.br>>. Acesso em: jun. 2003.
- SILVA, C. *País pesquisa mais fibras naturais para carros*. [S.l.: s.n.], 2004. Disponível em: <http://www.sebrae_sc.com.br/novos_destaque/opportunidade/mostra_matéria.asp?cd_noticia=8356>. Acesso em: out. 2004.
- SOUZA, A.V. *Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica (Lychnophora pinaster)*. 2003. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- TOMLINSON, P.S. *Anatomy of the Monocotyledons*. III Commelinales - Zingiberales. Oxford: Oxford University Press, 1969.
- WETZSTEIN, H.Y. et al. Anatomical changes in tissue cultured sweet gum leaves during hardening off period. *Hortscience*, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 290, 1981.
- ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Hortic.*, Wageningen, v. 393, p. 25-38, 1986.

Received on September 13, 2006.

Accepted on March 20, 2007.