**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análises anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas
in vitro, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**

Katherine Derlene Batagin

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2008**

Katherine Derlene Batagin
Engenheira Florestal

**Análises anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas
in vitro, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**

Orientador:
Prof. Dr. MARCÍLIO DE ALMEIDA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Batagin, Katherine Derlene

Análise anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vitro* visando otimizar o protocolo de aclimatização / Katherine Derlene Batagin. - - Piracicaba, 2008.

107 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Aclimação 2. Fotossíntese 3. Histologia vegetal 4. Micropropagação vegetal
5. Pupunha I. Título

CDD 634.6
B328a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ofereço

Ao meu Deus, minha vida, meu refúgio e fortaleza.

Dedico

Aos meus pais Erivelto e Suefy que mesmo estando longe, em instante algum me deixaram sentir sozinha, por todo amor, carinho, dedicação e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa a concretização de um grande sonho, acalentado durante anos e seria impossível realizá-lo sem o apoio das pessoas e instituições que menciono a seguir, com enorme gratidão.

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as maravilhas que tem feito por mim;

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pela orientação, dedicação, amizade e confiança em mim depositados;

À Dra. Cristina Vieira de Almeida, por todo carinho, afeto, amizade, paciência e pela imensa colaboração nas correções deste trabalho;

À Cássia Regina Fernandes Figueiredo, pelo carinho, amizade e atenção, auxiliando-me em tudo;

Ao Senhor Júlio Cirino proprietário do viveiro de mudas “Flora pau-brasil”, por toda atenção e pelas mudas cedidas para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, pelo uso dos equipamentos para as análises fisiológicas, e pelo espaço cedido na casa de vegetação;

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka por toda amizade, atenção e colaboração na identificação dos patógenos;

À Maria Solizete Granziol Silva, pela atenção e carinho dedicados durante todo o curso;

Ao Sr. José Francisco Rodrigues, auxiliar agropecuário, pela ajuda nos tratos culturais das minhas plantinhas no ripado;

À Dra. Roberta Pierry Uzzo, do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) pelas sugestões, amizade e atenção prestadas no decorrer deste trabalho;

Aos colegas Fernando (Caju), Fabiana (Baguinha) e Luiza do laboratório de pós-colheita, pelo auxílio nas análises do teor de clorofila;

Aos colegas Fernando Evandro e Rafael, pelo auxílio nas análises fisiológicas;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Ciências Biológicas, a toda equipe de secretários e assistentes pela eficiência e colaboração nos serviços prestados em todos os momentos;

A CAPES pela bolsa concedida durante todo o curso;

À Faculdade de Ciência Sociais e Agrárias de Itapeva (FAIT) por contribuir na minha formação;

Ao Núcleo de Apoio a Pesquisa e Microscopia Eletrônica (NAP/ESALQ/USP), por permitir a execução das análises em microscopia eletrônica;

Aos meus pais, que são a razão do meu viver, por todo amor, confiança e incentivo, que me fizeram ser perseverante em busca desse sonho;

Aos meus amados e queridos irmãos Augusto e Gustavo, que sempre estiveram em meus pensamentos e no meu coração;

A todos os meus familiares, pela compreensão e amor;

As minhas queridas amigas de laboratório que se tornaram a minha segunda família: Érika, Gabriela, Maria Luisa, Marcela, Monita e Thais;

As minhas amadas amigas irmãs Débora, Vânia e Shirley, por todo carinho, afeto e amizade, permanecendo ao meu lado, tanto nos bons como nos maus momentos, fazendo da minha vida uma verdadeira festa;

Às amigas do coração Carolina, Lívia, Eveline, Daniela, Sol, Isabela, Alessandra, por todo afeto, carinho, amizade e companheirismo;

Ao Fernando por todo carinho, afeto e atenção, e pela colaboração na minha dissertação.

Sei que falhei muitas vezes em minha vida e poço estar falhando neste momento, esquecendo-me de alguém, por esse motivo peço desculpas, e agradeço aquele que por ventura tenha esquecido e por qualquer que tenha sido a sua contribuição, sou-lhe muito grata.

Pupunha

*Lá no horizonte por cima da mata
o vento assanha a mais alta palmeira
que, embelezando a vista com balanços,
é conhecida como a pupunheira.*

*As pupunhas às vezes dão lá no alto.
mas o caboclo não perde o manjar,
sobe no tronco, vai buscar o cacho
e põe os frutos para cozinhar.*

*É com a unha que quem sabe se testa
o tanto de óleo que os frutos contêm;
entre tons de vermelho e amarelo
pintam as cascas, as polpas também.*

*Cozidos e sem casca na hora do lanche
é com café que fazem tradição,
mas se moídos dão boa farinha
que dá a receitas toques de inovação.*

*Da planta-mãe colhemos os perfilhos
para palmito de fino sabor,
que em saladas, assados ou cozidos
são novidades de grande valor.*

*Mas a pupunha já deixou a floresta,
mesmo se veio de nossos ancestrais
e assim as vemos por nossas estradas
com balanço mais manso nos quintais.*

Rosa Clement

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> KUNTH-ARECACEAE)	15
2.1.1 Características gerais.....	15
2.1.2 Aspectos ecológicos.....	18
2.1.3 Relação microrganismos x pupunheiras.....	19
2.1.4 Importância econômica	21
2.2 Micropropagação.....	24
2.3 Aclimatização	25
2.4 Plasticidade Fenotípica (Anatomia e Fisiologia Foliar)	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Local de realização do experimento	35
3.2 Material vegetal	35
3.3 Condições de cultivo	35
3.3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	35
3.3.2 Cultivo <i>ex vitro</i> (Processo de aclimatização)	36
3.3.2.1 Testes preliminares	36
3.3.2.2 Etapas de rustificação	36
3.3.3 Cultivo <i>in vivo</i>	37
3.4 Tratos culturais.....	39
3.4.1 Adubação	39
3.4.2 Irrigação	39
3.4.3 Tratamento profilático.....	39
3.4.4 Aspecto sanitário das plantas.....	39
3.5 Coleta de dados	40

3.5.1 Análises anatômicas	40
3.5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	401
3.5.1.2 Microscopia de luz.....	401
3.5.1.2.1 Impressão epidérmica	401
3.5.1.2.2 Análise histológica.....	402
3.5.1.2.3 Análise histoquímica.....	402
3.5.2 Análises fisiológicas	43
3.5.2.1 Fotossíntese, transpiração e condutância estomática.....	43
3.5.2.2 Avaliação indireta do teor de clorofila.....	43
3.6 Delineamento estatístico	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Condições de Cultivo	45
4.1.1 Cultivo <i>in vitro</i>	45
4.1.2 Cultivo <i>ex vitro</i> (Processo de aclimatização)	45
4.1.2.1 Testes preliminares	45
4.1.2.2 Etapas de rustificação	45
4.1.3 Cultivo <i>in vivo</i>	48
4.2 Tratos culturais.....	49
4.3 Coleta de dados	51
4.3.1 Análises anatômicas	51
4.3.2 Análises fisiológicas	66
5. DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

Análises anatomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização

A pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth-Arecaceae) é uma palmeira de extrema importância ecológica e na agroindústria palmiteira, sendo essencialmente propagada por sementes, uma vez que, devido às sérias dificuldades na aclimatização, a micropropagação dessa espécie é prejudicada. Neste contexto, foram comparadas por meio de análises anatômicas e fisiológicas, folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*, com o intuito de verificar as prováveis alterações, que possam influenciar na adaptação das microplantas às condições *ex vitro*, uma vez que a lâmina foliar é o órgão que mais se modifica em resposta as alterações ambientais. As plantas cultivadas *in vitro* e posteriormente transferidas para ambiente *ex vitro*, passaram por um processo de aclimatização constituído de três etapas de rustificação, onde na 1ª etapa as microplantas foram mantidas por três dias na sala de crescimento com os tubos de ensaio abertos, apresentando 100% de sobrevivência. Na 2ª etapa (50 dias de aclimatização) as microplantas permaneceram por quarenta e sete dias em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas, apresentando 95% de sobrevivência. Na 3ª etapa (180 dias de aclimatização), onde as microplantas permaneceram por 130 dias no ripado sob condições de sombra (sombrite com malha 50%), com percentual de 70% de sobrevivência. Durante o processo de aclimatização foram coletadas amostras de folhas sob condição *in vitro*, *ex vitro* (aos 50, 90 e 180 dias de aclimatização) e *in vivo*, onde foram realizadas análises anatômicas por meio de microscopia eletrônica de varredura e de luz, e fisiológicas, pela taxa de condutância estomática, transpiração e fotossíntese, obtidas pelo IRGA (analisador de gás infravermelho), e o teor de clorofila, obtida pelo SPAD-502 (Soil and Plant Analysis Development). Os dados analisados foram comparados entre si, e suas médias submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey. As folhas das pupunheiras apresentaram as mesmas estruturas anatômicas básicas em todas as condições de cultivo, e como resposta a aclimatização observou-se o aumento na espessura do mesofilo e na quantidade fibras vasculares (área ocupada pelas fibras na lâmina foliar). Também foram observadas alterações fisiológicas, como a diminuição da condutância estomática, com conseqüente queda na taxa de transpiração e fotossíntese logo após o transplante das microplantas para as condições *ex vitro*; sendo que no decorrer do processo de aclimatização observou-se a recuperação destes fatores com a taxa de fotossíntese se igualando as das plantas *in vivo*. O mesmo verificou-se em relação ao teor de clorofila que apresentou um aumento gradativo em relação ao tempo de aclimatização. As alterações anatômicas e fisiológicas não afetaram de forma significativa o processo de aclimatização, ao contrário evidenciaram um mecanismo de adaptação da espécie às condições de cultivo, permitindo considerar como fatores determinantes para o estabelecimento do protocolo de aclimatização, o ambiente com elevada umidade relativa do ar (*ex vitro*), o substrato composto de solo tipo latossolo vermelho-amarelo e o tratamento profilático com fungicidas.

Palavras-chave: Pejibaye; Rustificação; Histologia; Fotossíntese

ABSTRACT

Anatomical and physiological analyses of peach palm leaves from *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* cultivated plants designed to optimize the acclimatization protocol

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth-Arecaceae) is a palm of extreme importance in ecological and palm tree agribusiness and is being mainly propagated by seed, once; due to serious difficulties in acclimatization, the micropropagation of this species is a hard process. In this context, pejobaye leaves from *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* cultivated plants were compared using anatomical and physiological analysis in order to detect probable alterations that would influence the microplants adaptation to *ex vitro* conditions, since the leaf blade is the plant organ that more is modifying in response to environmental changes. The *in vitro* cultivated plants that were subsequently transferred to *ex vitro* environment went through an acclimatization process that consisted of three rustification phases. In the first stage the microplants were maintained in the growth room for three days in opened test tubes, featuring 100 % of survival. In the second stage (50 days of acclimatization) the microplants remained for forty-seven days in the growth room with controlled lighting and temperature, resulting in 95% of survival. In the third stage (180 days of acclimatization) the microplants remained for 130 days covered with black shadow screen ("sombrite" mesh with 50%) on the sides, resulting in 70% of survival. During the acclimatization process leaves samples of *in vitro*, *ex vitro* (to 50, 90 and 180 days of acclimatization) and *in vivo* cultivated plants were collected and used for anatomical analyses using light and scanning electron microscopy and for physiological analyses using stomatal conductance, transpiration and photosynthesis rates, obtained by IRGA (infrared gas analyzer), and the content of chlorophyll, obtained by the SPAD-502 (Soil and Plant Analysis Development). The analyzed data were compared with each other, and their average subjected to analysis of variance and compared by Tukey test. The peach palm had the same basic anatomical structures in all conditions of cultivation, and in response to the acclimatization process there was an increase in the thickness of the mesophyll and in quantity of vascular fibers (area occupied by the fibers in leaf blade). Physiological changes were also observed, as the decrease in stomatal conductance, with a consequent fall in the photosynthesis and transpiration rates soon after the microplants transplant to *ex vitro* conditions. During the acclimatization process was the recovery of these factors with the photosynthesis rate equaling the rate of *in vivo* plants. The same occurred in relation to the level of chlorophyll which showed a gradual increase in relation to the period of acclimatization. These anatomical and physiological changes did not affect significantly the acclimatization process, on the contrary, showed a adaptation mechanism of the species to the cultivation conditions, allowing consider as determining factors for the establishment of a acclimatization protocol, the environment with high relative humidity (*ex vitro*), the substrate consisting of Red Yellow latosol and the fungicide prophylactic treatment.

Keywords: Pejobaye; Rustification phases; Histology, Photosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Pupunheiras acondicionadas em diferentes condições de cultivo.....	38
Figura 2-	Plantas de pupunheiras evidenciando a região onde foram coletados os dados para análises anatômicas e fisiológicas.....	40
Figura 3-	Número de microplantas de pupunheiras sobreviventes ao processo de aclimatização em diferentes substratos.....	45
Figura 4-	Percentual de sobrevivência de microplantas de pupunheiras transferidas para ambientes não assépticos <i>ex vitro</i> , ao final de cada etapa do processo de rustificação.....	46
Figura 5-	Microplanta de pupunheira acondicionada <i>ex vitro</i> (90 dda) no ripado, apresentando sintomas de ocorrência de fungos.....	47
Figura 6-	Plantas de pupunheiras provenientes de sementes, apresentando sintomas de ocorrência de fungos.....	48
Figura 7-	Características morfológicas dos fungos isolados das lesões foliares de pupunheiras em condições <i>ex vitro</i> e <i>in vivo</i> observadas por meio de microscopia de luz.....	50
Figura 8-	Eletromicrografia de varredura da superfície foliar de pupunheira.....	52
Figura 9-	Eletromicrografias de varredura da superfície adaxial de folhas de pupunheiras evidenciando a presença de tricomas e estômatos e ausência de cera epicuticular nas microplantas <i>in viro</i> e <i>ex vitro</i> , e a presença desta nas planas <i>in vitro</i>	53

- Figura 10- Eletromicrografias de varredura da superfície abaxial de folhas de pupunheiras evidenciando a presença de tricomas e estômatos e ausência de cera epicuticular nas microplantas *in viro* e *ex vitro*, e a presença desta nas planas *in vivo*.....54
- Figura 11- Vista frontal da lâmina foliar em microscopia eletrônica de varredura e impressão epidérmica evidenciando a presença de estômato tipo tetracítico.....56
- Figura 12- Eletromicrografia de varredura destacando a superfície foliar de pupunheira cultivada *in vivo* evidenciando os tipos de tricomas.....56
- Figura 13- Médias das áreas ocupadas pelos diferentes tecidos foliares nas folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....58
- Figura 14- Médias das espessuras dos tecidos (μm^2) na lâmina foliar, de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....59
- Figura 15- Cortes transversais das lâminas foliares de pupunheiras nas diferentes condições de cultivo.....60
- Figura 16- Corte transversal da lâmina foliar de pupunheira cultivada *in vivo*, evidenciando o complexo estomático.....61
- Figura 17- Eletromicrografia em vista lateral da lâmina foliar de pupunheira cultivada *in vivo* evidenciando a presença de hipoderme uniestratificada com forma irregular.....61

Figura 18- Corte transversal de folhas de pupunheiras em microscopia de luz e eletrônica de varredura.....	62
Figura 19- Eletromicrografia de varredura evidenciando a presença de idioblastos (Id) com ráfides (Rf) no mesofilo de microplantas de pupunheira.....	63
Figura 20- Eletromicrografia de varredura da lâmina foliar de microplantas de pupunheiras, evidenciando os diferentes tamanhos de feixes vasculares.....	64
Figura 21- Corte transversal da lâmina foliar de pupunheiras acondicionadas em diferentes condições ambientais, evidenciando a região do feixe vascular.....	65
Figura 22- Dados relativos as análises fisiológicas das microplantas de pupunheiras acondicionadas nas diferentes condições <i>ex vitro</i> (com 50, 90 e 180 dias de aclimatização).....	67
Figura 23- Dados relativos as análises fisiológicas em plantas de pupunheiras cultivadas <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> (180 dda) e <i>in vivo</i>	68
Figura 24- Teores de clorofila total em função dos valores de clorofilômetro (SPAD-502), obtidos do folíolo da folha mais estendida de pupunheira oriundas de sementes.....	69
Figura 25- Representação gráfica da média dos valores obtidos pelo clorofilômetro (SPAD-502) em folhas de pupunheira em diferentes condições de cultivo.....	70
Figura 26- Microplanta de pupunheira acondicionada <i>ex vitro</i> (90 dda) apresentando clorose foliar.....	70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Médias da densidade e dos diâmetros polares e equatoriais dos estômatos nas faces adaxial e abaxial de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....55
- Tabela 2 - Médias do número de tricomas.mm⁻² presentes nas faces adaxiais e abaxiais de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....57
- Tabela 3 - Médias das áreas dos tecidos (µm²) ocupadas na lâmina foliar de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....57
- Tabela 4 - Média das espessuras dos tecidos (µm²) constituintes da lâmina foliar, de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....58
- Tabela 5 - Média dos valores obtidos pelo clorofilômetro (SPAD-502) em folhas de cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*.....69

1 INTRODUÇÃO

Os métodos de produção de palmito mais freqüentes são realizados por explorações extrativistas e irracionais, ocasionando a extinção das espécies produtoras *Euterpe oleracea* e *E. edulis*. Essa é uma das razões pela qual o cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth–Arecaceae) vem se expandindo consideravelmente, tornando a principal produção de palmito no mercado interno e externo. Sua produção vem se destacando devido a suas qualidades agrônômicas, industriais e comerciais, levando-se em consideração que seu cultivo apresenta excelente alternativa para o pequeno agricultor devido sua alta rentabilidade.

Entretanto, muitas são as dificuldades encontradas para a expansão dessa cultura no Brasil, como por exemplo, a ausência de campos de produção de sementes de matrizes que apresentem superioridade agrônômica para produção do palmito, pois, normalmente as sementes comercializadas não são de plantas selecionadas, resultando em plantios heterogêneos, onde as plantas apresentam variação no número de perfilhos, presença de espinhos no pecíolo, diâmetro irregular do estipe, baixa produção e qualidade do palmito.

Por essa razão, a técnica de micropropagação pode ser considerada uma excelente ferramenta para a produção maciça desta espécie, uma vez que, além da clonagem de plantas selecionadas, há uma produção contínua de mudas, independentemente da disponibilidade de sementes no mercado. Entretanto, essa técnica, até o prezado momento mostra-se prejudicada pela eleva perda de microplantas quando transferidas para as condições *ex vitro*.

Poucos são os trabalhos sobre aclimatização de pupunheiras, bem como estudos relacionados à anatomia e fisiologia desta espécie, no entanto o conhecimento da anatomia foliar bem como de seus aspectos fisiológicos pode ser relevante, por exemplo, para relacionar as estratégias de adaptação destas plantas a diferentes ambientes.

Não obstante, sendo a lâmina foliar a estrutura que mais se modifica em resposta às alterações ambientais, constituindo o principal sítio de produção de fotossimilados, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as características anatômicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*, bem como verificar as alterações

fisiológicas constatadas pelas análises da taxa de fotossíntese, taxa de transpiração, condutância estomática e teor de clorofila, com o intuito de melhor compreender as dificuldades adaptativas das microplantas quando submetidas às condições *ex vitro*, visando o estabelecimento de um protocolo de aclimatização para esta espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pupunheira (*Bactris gasipaes* KUNTH-ARECACEAE)

2.1.1 Características gerais

A espécie *Bactris gasipaes* (Kunth-Arecaceae) é nativa da região Amazônica, mais especificamente da Amazônia Peruana, conhecida popularmente no Brasil como pupunha ou pupunheira. Durante o decorrer dos séculos, a pupunha tornou-se a palmeira mais domesticada nas Américas, tendo como testemunha da grande diversidade, os vários nomes da planta, os diversos tamanhos e composição dos frutos, além de suas inúmeras utilidades. Seu uso principal, inicialmente foi o fruto amido na forma cozida (para consumo direto), fermentado para fazer “chicha” (bebida alcoólica), ou moído e seco para produção de farinha. Os usos potenciais dessa planta são dirigidos à exploração mais ampla dos usos indígenas do palmito e do fruto para consumo direto pelo homem, para ração animal, farinha e extração de óleo (CLEMENT; CHAVEZ FLORES; GOMES, 1987).

Embora o maior uso da pupunha na Amazônia seja o fruto, por ser rico em energia e β -caroteno (YUYAMA *et al.*, 1999), atualmente o palmito é o principal motivo de seu plantio em larga escala. As pesquisas com pupunheiras, visando à produção de palmito tiveram início na Costa Rica durante a década de 60 (século passado) sendo que nesta época a extração predatória já havia inviabilizado a colheita econômica de palmitos das populações silvestres de *Euterpe precatoria* (Mart.) (CAMACHO; SORIA, 1970).

Ao longo da década de 70, os plantios costarriquenhos expandiram lentamente e ensaios foram instalados em numerosas áreas da América tropical. As pesquisas no Brasil com a pupunheira para esta finalidade se iniciaram nesta mesma década no Instituto Agrônomo de Campinas estendendo-se para o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MOREIRA GOMES; ARKCOLL, 1988).

No início da década de 90, o plantio da pupunheira no Brasil visando a produção de palmito, apresentou grande expansão e o número de grupos de pesquisa e produção dessa espécie cresceu rapidamente (KULCHETSKI; CHAIMSOHN; GARDINGO, 2001).

A pupunha é uma planta perenifólia, com estipe ereto com diâmetro que varia entre 15 e 30 centímetros, 15 a 20 metros de altura, e em alguns casos, até 25 m (CAVALCANTE, 1991). A espécie apresenta notável perfilhamento, ou seja, brotações múltiplas formadas a partir da base do seu caule. Entretanto, à medida que a planta envelhece, o rizoma perde a capacidade de produzir novas brotações. No entanto, tal capacidade pode ser mantida e preservada indefinidamente através de podas sucessivas (MORA-URPI *et al.*, 1984). Segundo Villachica (1996), pode ocorrer de 1 a 20 perfilhos por planta, e raramente são encontradas plantas que não perfilham.

Outro caráter marcante em pupunheira é a presença de espinhos nos entrenós, recobrando também as folhas nas duas porções, superior e inferior. Mesmo esta sendo uma característica dominante na espécie há, entretanto, plantas com poucos ou nenhum espinhos (MORERA MONGE, 1981; BONACCINI, 1997; CLEMENT; MANSHARDT, 2000; KALIL FILHO *et al.* 2002). A madeira de seu caule é moderadamente pesada, dura e dotada de grande resistência contra as intempéries da região tropical, especialmente quando mantida em ambiente seco ou moderadamente seco (KULCHETSCKI; CHAIMSOHN; GARDINGO, 2001).

A copa tem forma de coroa e possui uma média de 20 folhas que medem de 3 a 4 metros, com 1 a 1,5 metros de largura (BONACCINI, 1997, BERGO; LUNZ, 2000). A coroa é formada de folhas pinadas, curvadas, em arranjo espiral. O pecíolo é canaliculado, variando de 70 a 130 cm de comprimento. A ráquis inicialmente côncava na superfície torna-se bifacial após o primeiro terço de seu comprimento, o qual pode variar de 1,5 a 3 metros, com numerosos espinhos no pecíolo e na ráquis (MORERA MONGE, 1981; CLEMENT; MANSHARDT, 2000).

Qualquer que seja a idade da planta, todas as folhas apresentam uma gema axilar, dormente ou não. Isso vale mesmo para as folhas que ainda se encontram em estado embrionário. Essa gema desenvolve-se concomitantemente com a folha que a protege, e ambas são originárias dos tecidos meristemáticos da planta, em seu crescimento apical. As gemas axilares situadas na altura do rizoma das plantas juvenis se diferenciam, formando novos perfilhos (FERREIRA *et al.*, 1995)

Na época de florescimento seus cachos apresentam as flores femininas e masculinas juntas, sendo classificada como espécie monóica. Os cachos medem de 50

a 80 cm de comprimento, com 20 a 60 espigas, produzindo de 50 a 1.000 flores femininas e de 10 mil a 30 mil masculinas, aparecendo após três ou quatro anos da germinação da semente (BONACCINI, 1997). A inflorescência é do tipo racemo, com flores estaminadas de cor branco-amarelada distribuídas geralmente em tríades, com bractéolas florais diminutas, sésseis ou raramente com pedicelos desiguais. O androceu é constituído por seis estames de filete delgado, com anteras curtas e dorsifixas. As flores pistiladas são de cor branca-amarelada; normalmente solitárias entre as tríades masculinas (UHL, 1987).

A pupunheira apresenta fruto normalmente monospérmico, com tamanho variável, ovóide, podendo apresentar cor verde quando jovem. Quando maduro é amarelo, vermelho ou de alguma combinação destas cores. O epicarpo é liso, o mesocarpo farináceo com fibras e o endocarpo liso com três poros (MORA-URPI, 1982; MORA-URPI, 1983). A produção de frutos é determinada pelos períodos de chuva e seca, razão pela qual a época de colheita pode variar de ano para ano em uma mesma região. A semente tem coloração marrom-escura, com um tamanho médio de 2cm, e sua polpa assemelha-se com cor e sabor ao coco-da-baía (BONACCINI, 1997; YUYAMA *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que, de acordo com o tamanho dos frutos a pupunheira é agrupada em três raças distintas, microcarpa, que produz frutos pequenos pesando até 20 g; mesocarpa, cujo tamanho dos seus frutos são intermediários, com peso entre 20 e 70 g e macrocarpa, cujos frutos variam entre 70 e 150 g.

As sementes apresentam dimensões e formas que variam consideravelmente, devida à condição alógama da planta, com variada segregação genética. Apresentam formatos diversos, podendo ser delgado, ovóide, elíptico, cuneiforme, oblongo, ou arredondados (MORA-URPI; WEBER; CLEMENT, 1997).

O sistema radicular da pupunha apresenta na literatura resultados contraditórios, pois, segundo Morales; Vargas (1990) o sistema radicular é superficial e expandido, apresentando maior concentração de raízes da planta estudada num raio e profundidade de 40 cm, e segundo Ferreira *et al.* (1995) a partir do centro da planta o sistema radicular das pupunheiras é mais extenso e mais profundo, embora a maior

biomassa radicular tenha sido encontrada dentro da área de projeção da copa, a maior área superficial absorvente foi encontrada fora desta área.

É importante ressaltar que o sistema radicular desta espécie é bastante fibroso e sua regeneração após qualquer injúria é muito difícil (KULCHETSKI; CHAIMSOHN; GARDINGO, 2001).

2.1.2 Aspectos ecológicos

Embora a pupunheira tenha ocorrência original em floresta, ela necessita de ampla exposição ao sol para seu desenvolvimento. Quando se desenvolve naturalmente na floresta, sob condição de sombra, seu crescimento é lento e pouco vigoroso, de forma que são necessários muitos anos para que atinja seu estado adulto. É uma planta umbrófila somente nos primeiros estádios de desenvolvimento em condições naturais na floresta, mas quando cultivado em plantios artificiais, em regime de monocultura, não requer sombra em nenhuma etapa de seu desenvolvimento (KULCHETSKI; CHAIMSOHN; GARDINGO, 2001).

A pupunheira é encontrada naturalmente em extensas porções geográficas, sendo que a densidade desta palmeira se concentra entre os limites das regiões baixas do neotrópico úmido da Amazônia circunscrito pelos paralelos 16º - 17º N (região noroeste de Honduras) e 17º S (região central boliviana), que atinge a foz do Rio Amazonas e se estende até as Guianas, chegando à costa do Pacífico, no Equador, e as regiões da costa colombiana (MORA-URPÍ; CLEMENT, 1981). No território brasileiro, esta espécie, com suas variedades e ecótipos, é encontrada comumente, na forma nativa, em toda a Bacia Amazônica, compreendendo os Estados do Acre, Amazonas, Pará, Maranhão, Amapá, Roraima e Rondônia, bem como o norte do Mato Grosso (MOTA, 1994).

Devido originar-se em regiões tropicais de alta densidade pluviométrica, com solos ácidos de baixa fertilidade, desenvolve-se bem em regiões onde há abundância de chuva (1900 a 6000 mm anuais) e apresenta relativa resistência a períodos secos ou de baixa pluviosidade de três a quatro meses (KULCHETSKI; CHAIMSOHN; GARDINGO, 2001). Embora o cultivo da pupunha possa ser implantado nas mais diferentes condições climáticas, é nas regiões de clima quente e úmido, com temperatura média anual de 22º C e precipitação bem distribuída, que se obtém maior

desenvolvimento vegetativo e peso em palmito por planta e por área (BOVI, 1998; DEENIK *et al.*, 2000; GUERREIRO, 2002).

De maneira geral, a pupunha se desenvolve melhor em solos mais arenosos e friáveis, do que em solos pesados e argilosos, e mesmo sendo exigente em água, não resiste a solos encharcados, exigindo local com boa drenagem (FERREIRA, 1987).

2.1.3 Relação microrganismos x pupunheiras

2.1.3.1 Patógenos

Os principais agentes etiológicos causadores de doenças em plantas em geral são fungos, bactérias, vírus e nematóides, responsáveis por pequenas ou grandes perdas que podem ser fatores limitantes a uma determinada cultura (POZZA *et al.*, 1999)

No caso específico de pupunheiras, noventa por cento das sementes distribuídas para todo Brasil são provenientes do Peru, e eventualmente não recebem tratamento fitossanitário, resultando muitos problemas no período de germinação e formação de mudas. Dentre os patógenos já isolados de pupunheiras, destacam-se: o fungo *Monilia* spp, causador da podridão branca em frutos, *Diplodia* spp., responsável pela podridão basal dos frutos; *Ceratocystis* spp., o fungo da ráquila negra; *Thielaviopsis paradoxa* e *Chalaropsis* spp. causadores da podridão negra dos frutos colhidos que destroem também as sementes.

Não obstante, foram isolados das folhas outros fungos, tais como o *Pestalotiopsis* spp. (fungo da mancha amarela), *Mycosphaerella* spp. (fungo da mancha parda), *Colletotrichum* spp. (fungo da mancha negra), *Desclera incurvata* (fungo da mancha anelar) e *Fusarium moniliformae* (fungo do espessamento das nervuras). A ocorrência de antracnose nas folhas mais jovens das pupunheiras, caracteriza-se por causar manchas arredondadas e deprimidas, coloração marrom, com anéis concêntricos onde aparecem as estruturas do fungo. Além disso, condições abióticas adversas como vento frio, substratos inapropriados, falta d'água e correta fertilização do solo parecem favorecer sua ocorrência.

No caso específico de palmeiras, a podridão da medula é causada pelo fungo *Fusarium* sp., causando a perda do palmito. Este sintoma assemelha-se ao do *Phytophthora* sp. (SANTOS *et al.*, 2001), descrito por Pizzinatto *et al.* (2002) no

Município de Mogi Mirim – SP, cujos sintomas são de podridão do estipe e amarelecimento de folhas de pupunheiras no campo.

No caule foi relatado por Santos *et al.* (2004) a primeira ocorrência no estado do Paraná de *Phytophthora palmivora*, responsável pela podridão do estipe, resultado confirmado pelo teste de patogenicidade com subsequente re-isolamento do fungo. A maioria das doenças que são observadas em pupunheiras no Brasil e também em outros países é atribuída principalmente a fungos do gênero *Fusarium* ou *Colletotrichum*, além de algumas bactérias como a *Erwinia* que também ocasionam a podridão do estipe (BOVI, 1997).

2.1.3.2 Endófitos

De acordo com as observações de Azevedo (1998), foi Bary em 1866, quem primeiro propôs uma possível distinção entre endófitos e patógenos de plantas. Embora eles tenham sido descritos há dois séculos, os microrganismos endofíticos somente receberam considerável atenção a partir dos anos 80, quando foi reconhecida sua capacidade de proteger as plantas contra patógenos e insetos (JACOBS; BUGBEE; GABRIELSON, 1985; MISAGHI; DONNDELINGER, 1990; HALLMANN *et al.*, 1997; AZEVEDO *et al.*, 2000). Esses microrganismos são, portanto, definidos como aqueles que colonizam os tecidos internos de plantas sem causar danos ao hospedeiro e sem desenvolver estruturas externas (AZEVEDO; MACCHERONI JUNIOR; ARAÚJO, 2003).

A constatação de bactérias endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido relatada para muitas espécies cultivadas, e em diferentes estádios de desenvolvimento (JACOBS; BUGBEE; GABRIELSON, 1985; STURZ, 1995; PALUS *et al.*, 1996). As plantas fornecem um *habitat* para inúmeras populações de bactérias endofíticas, muitas das quais não são cultiváveis e, portanto não são identificadas. A presença dos endófitos pode afetar a fisiologia do hospedeiro, consumindo produtos de fotossíntese (considerando-se que endófitos são heterótrofos) ou metabólitos tóxicos.

Inúmeros endófitos foram isolados de espécies da família Arecaceae, sendo a primeira ocorrência citada por Rodrigues; Samuels (1990).

Dentre as palmeiras a espécie *Bactris gasipaes* já teve os seguintes microrganismos endofíticos isolados: *Thielaviopsis paradoxa*, *Ceratocystis paradoxa*,

Phomopsis sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. (COSTA NETO, 2002) de plantas cultivadas no campo (*in vivo*); *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Neotyphodium* sp., *Epicoccum nigrum*, *Colletotrichum* sp. e *Alternaria gaisen* de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*, além das leveduras *Rhodothurula mucilaginosa*, *Debaromyces hansenii* var. *fabryi*, *Pichia guilliermondii*, *Candida xestobii*, *Candida fermentati* e as bactérias *Bacterium* sp., *Staphylococcus xylosus*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter glomerans*, *Enterobacter hormaechei* e *Pantoea* sp. (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005).

Cabe salientar que, as perdas de pupunheiras micropropagadas, segundo Almeida *et al.* (2005), ocorrem principalmente pela presença de microrganismos, responsáveis pela morte das plantas no início da cultura ou em seu estabelecimento *ex vitro* durante a aclimatização. Por meio de taxonomia clássica e de técnicas moleculares, os autores identificaram fungos presentes nos ápices caulinares de pupunheiras sadias cultivadas no campo e em plantas propagadas *in vitro*, evidenciando a presença de *Fusarium oxysporum*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum* na plantas do campo, e nas plantas *in vivo* a presença de *Fusarium* sp., *F. Proliferatum*, *F. Oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*. As sete espécies de fungos foram re-introduzidas em plantas axênicas, demonstrando diferentes comportamentos, evidenciando que *Neotyphodium* sp e *E. nigrum* estabelecem uma interação endofítica e as demais se comportam como patógenos. Além disso, as espécies endofíticas mostraram potencial para o uso no controle biológico de patógenos de pupunheiras.

2.1.4 Importância econômica

Mesmo sendo o Brasil o maior produtor, consumidor e exportador de palmito do mundo, ainda é utilizada a exploração predatória de palmeiras nativas da Mata Atlântica para atender esta demanda (BOVI, 1998). Com o intuito de diminuir esta exploração, a pupunha tem chamado a atenção dos agricultores por suas características de precocidade, sendo o primeiro corte efetuado a partir de 18 meses do plantio, e perfilhamento, ou seja, a planta forma touceira como a bananeira e, após o primeiro corte, os perfilhos crescem permitindo a produção permanente. Isso não acontece com a espécie juçara, palmeira de estipe único, excessivamente explorada (VILLACHICA,

1996; MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997; BOVI, 1998; MARQUES; COELHO, 2003).

Além do palmito que é extraído da parte cilíndrica, localizada na parte superior do estipe, representada pelo conjunto de bainhas das folhas, onde no centro se encontra a parte comestível, da pupunha aproveita-se quase tudo, como por exemplo, o já mencionado fruto, que é rico em vitamina A (AGUIAR *et al.*, 1980) e em amido (CARRERA, 1999), que pode ser consumido ao natural, cozido em água ou fermentado na água para refresco. Do fruto, ainda pode se obter vinho, vinagre, manteiga, azeite, além de excelente farinha para consumo ao natural ou o preparo de mingaus, bolos e outros pratos. Do mesocarpo, ou seja, da polpa dos frutos preparam-se picles. Os níveis médios da proteína dos frutos variam de 1,8 a 2,7%, os níveis de lipídio de 3,5 a 11,1%, a fração livre do nitrogênio 24,3 a 35%, a fibra do alimento varia de 5,2% a 8,7%, considerando o potencial nutritivo desta fruta, importantes na incorporação mais freqüente na dieta (YUYAMA *et al.*, 2003).

As inflorescências são utilizadas em alguns países para o consumo humano como saladas e condimento; o pólen é empregado na apicultura e consumo humano (COUTO *et al.*, 1999); as raízes são usadas na medicina popular como lenitivo para dores de cabeça e desarranjos intestinais além do preparo de vermífugos. As folhas podem ser usadas para confecção de artesanato, em cobertura de habitações além de arraçoamento animal, sendo uma fonte adicional de proteína, em média com 7,5% de proteína bruta (COUTO *et al.*, 1999; CHAIMSOHN, 2001).

Segundo Hartley (1977), o óleo de pupunha contém maior quantidade de ácidos graxos insaturados do que o azeite-de-dendê. Atualmente, o óleo insaturado possui excelente valor de mercado, sendo interessante no ponto de vista nutricional e industrial (CHAIMSOHN, 2001).

Do tronco pode-se extrair a celulose, e sua madeira também é aproveitada por ser moderadamente pesada, de grande resistência às intempéries e elasticidade (MORA URPÍ, 1984; CLEMENT; BOVI, 1999). Quando beneficiada é usada na fabricação de instrumentos musicais, cabos de ferramentas, pisos, peças de artesanato, produção de celulose para papel e também pode ser transformada em celofane e crayon (COUTO *et al.*, 1999; CHAIMSOHN, 2001).

De acordo com Bovi (1998) e Tonet; Ferreira; Otoboni, (1999), o interesse comercial pela pupunheira, além de ser uma cultura perene, destaca-se por apresentar crescimento a pleno sol, precocidade, rusticidade, perfilhamento, palatabilidade, sem escurecimento do palmito após o corte

A pupunheira pode ser propagada por sementes, onde é obtida uma grande quantidade de mudas com menor custo, ou por perfilhos, embora este apresente alta percentagem de perdas (NOGUEIRA *et al.*, 1995; VILLACHICA, 1996). A propagação da pupunha por sementes é lenta e desuniforme, uma vez que algumas sementes completam a germinação aos 150 dias (NOGUEIRA *et al.* 1995), prolongando o período de formação de mudas. A viabilidade e o vigor das sementes estão associados com a perda de umidade, partindo de um teor de umidade inicial de 45%, observou-se que abaixo de 38% a emergência e o vigor das sementes são afetados negativamente de maneira significativa. Abaixo de 17% de umidade a emergência é praticamente nula, o que caracteriza as sementes de pupunha como recalcitrantes (FERREIRA; SANTOS, 1992; BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004).

O esforço na conservação de banco de germoplasma segundo Bovi; Martins; Spiering (2004) é devido a dificuldade para manter o banco de sementes, uma vez que essa espécie como algumas palmeiras apresenta sementes recalcitrantes, sensíveis ao dessecação, o que impede a execução de programas de conservação a longo prazo, que se baseiam na desidratação da semente antes do armazenamento (CHIN; ROBERTS, 1980). Sendo assim a conservação *in vitro* mostra-se como uma técnica promissora (MORA-URPI; WEBER; CLEMENT, 1997).

Não obstante, mesmo a pupunheira apresentando um caráter perene, a ocorrência de partenocarpia e polinização é deficiente, o que colabora para a formação de cachos com poucos frutos com sementes variáveis (ALMEIDA, 1994). Neste aspecto, a técnica de micropropagação ou propagação *in vitro*, é uma excelente alternativa não só para a produção maciça de mudas como também para a obtenção de clones de matrizes selecionadas, adaptadas às mais diversas regiões de cultivo.

2.2 Micropropagação

A cultura *in vitro* é um conjunto de técnicas em que pequenos fragmentos de tecido vivo são isolados e cultivados assepticamente, por períodos indeterminados, em um meio nutritivo e incubado em condições ambientais controladas. Para o caso de tecidos vegetais, esta definição original deve ser ampliada, de modo a incluir toda uma gama de explantes que vai desde plântulas e órgãos a células isoladas e protoplastos (TORRES; CALDAS, 1990; MROGINSKI; ROCA, 1993).

Em virtude do tamanho do propágulo ser tão pequeno e o método ser asséptico, o termo micropropagação é referido para técnica de propagação assexual *in vitro* (HU; WANG, 1983). Essa técnica é utilizada como uma importante ferramenta, não só geneticamente e no melhoramento de plantas como também auxiliando em inúmeras outras áreas da agricultura, fornecendo grandes vantagens, como a de obter milhares de plantas, independentemente das estações do ano (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; NICOLOSO *et al.*, 2001), onde as condições ambientais e nutricionais podem ser facilmente controladas (DRUART, 1981); reduzir do tempo necessário à propagação da espécie (MURASHIGE, 1974; ERIG; SCHUCH, 2005); fornecer melhores condições sanitárias através do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia para eliminação de doenças (VISEUR; DRUART, 1988); reprodução do genótipo da planta mãe com fidelidade durante a multiplicação, bem como o aumento da variabilidade genética para fins de seleção, obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos, conservação e avaliação de germoplasma (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998).

Potencialmente, plantas de todas as espécies podem ser formadas por meio desta técnica, desde que as exigências nutricionais, hormonais e climáticas sejam satisfeitas (HARTMANN; KESTER; DAVIES, 1997). Entre os princípios que se baseia a cultura de tecidos, os dois mais importantes, sem dúvida, são a totipotencialidade celular e o balanço hormonal (VILLALOBOS; THORPE, 1993; KERBAUY, 1999).

Pelo princípio da totipotencialidade das células somáticas vegetais, teoricamente, qualquer célula viva possui suficiente informação genética para produzir uma planta normal, desde que lhe sejam propiciadas condições nutricionais e ambientais adequadas. A cultura de tecidos, dessa forma, pode propiciar a regeneração de uma

planta inteira a partir de fragmentos de outra planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Um dos primeiros protocolos de cultura de embriões envolvendo palmeiras foi publicado por De Guzman; Del Rosário (1964) para o coqueiro Makapuno, e outros foram estabelecidos posteriormente (ASSY-BAH; DURAND-GASSELIN; PANNETIER, 1987; RILLO; PALOMA, 1992; ASHBURNER *et al.*, 1995; SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA, 2002; ANGELO; LEAL; GOMES, 2003; SANTANA; TEIXEIRA, 2004).

Em pupunheiras, ambos os protocolos, de embriogênese somática e organogênese foram descritos previamente por Arias; Huete (1983); Stein; Stephens, (1991); Almeida (1994) e Almeida; Kerbauy (1996) induziram a reversão de botões florais de pupunha em gemas vegetativas e a obtenção de plântulas via embriogênese somática. Atualmente vem sendo desenvolvidos estudos envolvendo a micropropagação de matrizes de pupunheiras selecionadas, bem como avaliações sobre o isolamento e a relação entre microrganismos endofíticos com essa espécie (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006).

Mesmo sendo o cultivo *in vitro* uma importante técnica na propagação de plantas em larga escala, o processo de micropropagação tem como um dos seus principais problemas a adaptação das plantas micropropagadas nas condições *ex vitro* (GROUT *et al.*, 1975; DONNELLY; VIDABER; LEE, 1985; ZIMMERMAN, 1988). Por essa razão essa transferência para as condições naturais, deve ser progressiva evitando estresses (SILVA *et al.*, 1995).

2.3 Aclimatização

Um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não consegue sobreviver à transferência brusca do ambiente *in vitro* para o ripado ou para o campo (HARARIKA, 2003). A mudança de um ambiente protegido, estéril, com açúcares e com umidade saturada, para um ambiente não-estéril, sem açúcares e com reduzida umidade, tem resultado a perda de muitas plantas, baixa taxa de crescimento e período prolongado na obtenção de plantas completamente aclimatadas (SOUZA JÚNIOR; BARBOZA; SOUZA, 2001). Devido a esses efeitos é necessário um processo de aclimatização, o qual consiste em modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas

das plantas, como forma de diminuir a possibilidade de estresse, para que as mesmas possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente (BRAINERD; FUCHIMGAMI, 1981; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO *et al.*, 1999; HARARIKA, 2003).

Segundo ZIMMERMAN (1988) são as alterações no metabolismo da planta, de um estágio heterotrófico para autotrófico que promovem as alterações anatômicas e fisiológicas nas microplantas. Essas alterações, por vez podem ser observadas na cutícula, na cera epicuticular, na não funcionalidade do aparato estomático e, conseqüentemente, na perda expressiva de água das células e diminuição do processo fotossintético (MARÍN; GELLA; HERRERO, 1988; PREECE; SUTTER, 1991; DESJARDINS, 1995; POSPÍSILOVÁ *et al.*, 1999 e 2000). Por essa razão, a transferência para as condições naturais, deve ser progressiva evitando possíveis estresses (SILVA *et al.*, 1995), uma vez que esse processo pode ser o fator limitante para o fechamento do ciclo da micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Pereira; Fortes; Silva (2001) trabalhando com macieira mencionaram que certos órgãos da planta, como as folhas, podem apresentar influência sobre o crescimento das plantas durante as primeiras semanas de aclimatização por causarem um efeito inibitório sobre o alongamento dos entrenós, anulando a organogênese e, conseqüentemente, o crescimento por completo das plantas.

De acordo com Sutter (1988), quando transferidas para aclimatização, plantas enraizadas *in vitro* são submetidas a uma condição de alta transpiração que, associada à alta condutividade hídrica, provoca baixa funcionalidade ou ausência de controle sobre o fechamento dos estômatos. Além disso, as raízes produzidas *in vitro* segundo Pierik (1990) são fracas e pouco funcionais, devendo ser substituídas o mais rápido possível, fato este que só ocorrerá mantendo a planta com baixa transpiração. Para MacClelland (1990), as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais por não apresentarem pêlos radiculares, além de propiciarem pobre conexão vascular com a parte aérea das plantas, resultando numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea, comprometendo o crescimento.

Pereira; Fortes (2000) questionaram que o crescimento deficiente de plantas de macieira recém aclimatizadas deve-se além das condições adversas no momento do transplante, ao estado funcional das raízes, no que diz respeito à nutrição destas logo após o transplante e também possíveis inibições correlativas exercidas por diferentes órgãos da planta. Por essa razão, o tipo e a qualidade do sistema radicular obtidos são importantes para se obter sucesso na sobrevivência. Raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento da planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

O substrato utilizado na preparação das mudas é de grande importância na aclimatização, uma vez que pode facilitar ou impedir o crescimento das raízes conforme suas propriedades físico-químicas, o espaço de aeração e a sua capacidade de retenção de água (CALVETE, 1998). Por essa razão, os substratos em geral representam a mistura de dois ou mais materiais, sendo que um destes, o condicionador de substratos, irá promover a correção das características de forma a otimizar as condições de uso (KÄMPF, 2000).

Várias são as misturas utilizadas na composição de substratos para plantas micropropagadas, devendo-se levar em consideração as propriedades químicas e físico-hídricas, pois essas influenciam na relação água/ar do substrato e na disponibilidade e absorção de nutrientes (FERNANDES; CORÁ, 2000).

Muitas vezes são utilizados substratos comerciais, como vermiculita, plugmax, Plantmax[®] e os bioadubos, porém estes apresentam elevado custo. Como medida, utiliza-se substratos regionais que podem ser obtidos facilmente, tais como casca de *Pinus*, esterco bovino, casca de arroz carbonizada ou solos da própria região de cultivo. Os resíduos orgânicos têm sido utilizados como uma alternativa para a redução dos custos, com resultados positivos no desenvolvimento de plântulas de diversas culturas (BEZERRA; ROSA, 2002). Além desses, são utilizadas misturas de matéria orgânica e solos, como descritos por Mercier; Kerbauy (1993) e uma mistura composta de fibras de xaxim, areia e vermiculita (POMPELLI *et al.*, 2001).

Entretanto, materiais orgânicos podem causar excesso ou deficiência de nutrientes, devido a não quantificação precisa destes existentes na matéria orgânica,

além da necessidade de estarem bem curtidos, não sendo aconselhável o uso de resíduos em fermentação ou com elevada relação C/N (HOFFMANN *et al.*, 1996). O húmus ou a matéria orgânica não são apenas fontes de nutrientes, mas também têm propriedades de natureza coloidal, decorrentes de sua estrutura orgânica complexa, aliada a uma fina subdivisão de partículas (RAIJ, 1991).

A maioria dos protocolos publicados, sobre o cultivo *in vitro* de embriões de palmeiras, cita a areia esterilizada como substrato na fase de aclimatização, e os resultados obtidos indicam baixa porcentagem de sobrevivência das plantas (ENGELMANN; BATUGAL, 2002). Para pupunheiras, Steinmacher *et al.* (2007), indicam o substrato comercial PlantMax[®].

Teixeira; Paiva (1997), entretanto, estudando a situação atual do cultivo *in vivo* de palmito pupunha no Estado do Espírito Santo/Brasil, mencionam que os solos mais frequentemente utilizados na implantação de pupunheiras são Latossolo Amarelo, Podzólico Amarelo e o Latossolo Vermelho Escuro, os quais são altamente intemperizados (ALLEONI; CAMARGO; CASAGRANDE, 1998), informações essas de extrema importância para testes referentes à aclimatização de microplantas.

Em se tratando especificamente da pupunha, a etapa de aclimatização é considerada um passo crítico para o estabelecimento de protocolos regenerativos (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005), devido às sérias dificuldades de se estabelecerem no ambiente *ex vitro*. Segundo Steinmacher *et al.* (2007), o ambiente de alta umidade, ao qual as plantas micropropagadas são transferidas é o fator mais importante na aclimatização de pupunheiras, enquanto que para Caprestano *et al.* (2006), o tamanho das microplantas é que influencia no sucesso da aclimatização.

Outra hipótese para perda dessas plantas durante a aclimatização da cultura, ou seja, em seu estabelecimento no campo é devido à presença de microrganismos endofíticos latentes que se tornam patogênicos após o estresse fisiológico que ocorre na fase adaptativa das microplantas (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005).

2.4 Plasticidade Fenotípica (Anatomia e Fisiologia Foliar)

O efeito fenotípico provocado pela interação do ambiente e o genótipo foi chamado por Falconer (1989), de plasticidade fenotípica. Essa terminologia também retrata a habilidade de um organismo em alterar sua fisiologia e/ou morfologia em resposta a interação com o ambiente a que está sujeita (SCHEINER, 1993). É esperado que uma população que ocupe um ambiente heterogêneo apresente grande potencial plástico em suas características morfofisiológicas (FUZETO; LOMÔNACO, 2000).

As variações fenotípicas podem ser decorrentes tanto das propriedades genéticas da população, quanto da influência do ambiente na expressão de seus genótipos. Exemplos clássicos descrevem variações na forma e no tamanho de folhas em plantas terrestres e heterofilia em folhas aéreas e submersas de espécies aquáticas (BRADSHAW, 1965).

Uma variedade de fatores ambientais, especialmente a disponibilidade de radiação, pode causar alterações nas características estruturais e funcionais das folhas, culminando com alterações no padrão de crescimento e produção das plantas (BJÖRKMAN, 1981). Plantas que apresentam plasticidade morfofisiológica, ou seja, capacidade de aclimatização a diferentes condições de ambiente, são capazes de responder diferencialmente a níveis de radiação no ambiente por alterações anatômicas, morfológicas e fotossintéticas (PANDEY; KUSHWAHA, 2005). Além disso, algumas alterações manifestadas sobre a fisiologia das plantas, e expressas principalmente no crescimento vegetativo, podem afetar a qualidade dos frutos produzidos (PURQUERIO; CECÍLIO FILHO, 2005).

O cultivo *in vitro* tradicional, especificamente a micropropagação, como já mencionado, é uma importante técnica na propagação de plantas em larga escala. Nesta condição, os explantes estabelecidos sofrem alterações quanto ao aspecto anatômico e fisiológico (LEES; EVANS; NICHOLAS, 1991) e por essa razão a análise destas alterações permite verificar a origem e as características de órgãos adventícios, detectar o desenvolvimento anormal de estruturas, monitorar o acúmulo e consumo de substâncias durante o processo de desenvolvimento e otimização dos protocolos *in vitro*, facilitando a determinação de suas etapas limitantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O conhecimento da anatomia foliar é altamente relevante quando se almeja relacionar as estratégias de adaptação das plantas em ambientes com condições adversas, uma vez que a lâmina foliar é a estrutura que mais se modifica em resposta às alterações ambientais (MORRETES; FERRI, 1959) e constitui o principal sítio na produção dos fotossintatos (DALE, 1992). Além disso, pode-se estabelecer o grau de distinção e similaridade entre as plantas, contribuindo para o conhecimento da morfologia da espécie e para a taxonomia, fornecendo também dados que poderão subsidiar uma melhor compreensão do estabelecimento inicial de espécies ameaçadas ou de difícil propagação. Destaca-se também a contribuição para os estudos de desenvolvimento ontogenético (DEDECCA, 1957).

De acordo com ESAU (1977), o crescimento e a organização da lâmina foliar sofrem grande influência de fatores ambientais como a temperatura, a intensidade luminosa e a disponibilidade de água. A plasticidade fenotípica, que é uma propriedade do genótipo, é a capacidade da planta de alterar seu desenvolvimento em resposta à mudança ambiental. Alterações fenotípicas relacionadas à limitação de recurso representam uma resposta às condições adversas e podem ser uma vantagem para a planta (WELLS; PIGLIUCCI, 2000).

Dentre as funções da folha, estão a fotossíntese e a transpiração, sendo esta composta por três tipos de tecidos: epiderme, mesófilo e vasculares. Nas plantas é possível encontrar diferentes tipos de células epidérmicas, por exemplo, células típicas de epiderme; células ou grupo de células com estruturas, forma ou conteúdo especial; células estomáticas e apêndices epidérmicos ou tricomas (FAHN, 1990).

A epiderme por si, tem como principais funções a regulação da água na planta, a proteção contra microrganismos, a proteção contra danos ambientais e como atrativos aos insetos para a reprodução das plantas, e é na epiderme que se localiza a interface entre a planta e o meio ambiente (MAUSETH, 1988).

Devido às relações com o ambiente, a epiderme foliar pode apresentar diferenciação, e muitas vezes, é depositada sob ela uma camada de material gorduroso, a cutícula que desempenha o papel de relativa importância na diminuição da transpiração, além da função de proteção contra microrganismos (CUTTER, 1987; BUKOVAC *et al.*, 1990), também se caracteriza como a principal barreira foliar potencial

à penetração de herbicidas (PROCOPIO *et al.*, 2003). A deposição de cutícula é afetada pela intensidade de luz e pela disponibilidade de água, estando presente tanto nas plantas sob estresse híbrido, como nas plantas crescidas sob regime ótimo de água (CUTTER, 1987).

De acordo com as observações de Preece; Sutter (1991), a perda de água é maior em mudas produzidas *in vitro* do que em mudas já aclimatizadas devido à pequena quantidade de cera epicuticular encontrada em plantas sob condições *in vitro*, atingindo até 25% do total encontrado em plantas no ripado. Embora a presença de cera epicuticular não seja um indicativo suficiente da sobrevivência das plantas na aclimatização, os autores afirmaram, que a alta umidade no interior dos frascos é um dos principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das mudas em controlar as perdas de água. A redução de umidade relativa aumenta a capacidade de resposta dos estômatos, a deposição de ceras epicuticulares, além de reduzir o murchamento após a transferência para o solo.

Segundo Lima (1996), a epiderme também contém grande quantidade de estômatos, cuja resposta, mediante a regulação da condutância estomática, controla a transpiração da folha e é influenciada pela luz, concentração de gás carbônico atmosférico, umidade e temperatura.

Os tricomas, tal como a cutícula e os estômatos, também se manifestam de diferentes maneiras de acordo com as condições oferecidas às plantas. Tais estruturas podem representar adaptações morfológicas que atuam no sentido de restringir a perda de água pelas folhas, através da regulação da temperatura, pela reflexão da luz que chega às folhas (LARCHER, 1986). Além disso, sabe-se que a frequência de tricomas pode aumentar com a intensidade de luz solar, exposição ao vento, umidade do solo ou do ar e altitudes (ELLIS, 1976).

As condições do solo, água, luz e temperatura, exercem influência sobre as características estruturais do vegetal. Os mecanismos de adaptação de plantas a diferentes ambientes compreendem na folha principalmente, a redução do tamanho, capacidade de enrolamento, alta densidade de tricomas, estômatos profundos, acúmulo

de mucilagem e outros metabólitos secundários, além do aumento da compactação do mesofilo (BOSABALIDIS; KOFIDIS, 2002).

Não obstante, sabe-se que a estrutura da folha pode ser muito influenciada pelo nível de luz durante o crescimento, o que pode proporcionar aumentos na espessura da folha, na massa foliar específica, no desenvolvimento da epiderme e do parênquima, e no número total de células (ESAU, 1977; BJORKMAN, 1981; CUTTER, 1987). A capacidade de alterar a estrutura das folhas em resposta a diferentes níveis de luz é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimatização (BJORKMAN, 1981).

O ambiente de luz em que a planta cresce é de grande importância, pois a adaptação destas depende do ajuste do seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade seja utilizada da maneira mais eficiente possível. Por essa razão, o sucesso na adaptação de uma espécie a ambientes com baixa ou alta radiação pode ser baseado na eficácia e na rapidez dos padrões de alocação e comportamento fisiológicos serem ajustados em ordem, para aumentar a aquisição de recursos em um determinado ambiente (DIAS-FILHO, 1997).

O crescimento e a adaptação de plantas a diferentes condições ambientais relacionam-se a sua eficiência fotossintética que, por sua vez, está associada, entre outros fatores, aos teores de clorofila foliar. Diversos fatores externos e internos afetam a biossíntese de clorofilas, por esse motivo, os seus conteúdos foliares podem variar de maneira significativa. Entre estes fatores, a luz é essencial a sua síntese (WHATLEY; WHATLEY, 1982). A clorofila está sendo constantemente sintetizada e destruída (foto-oxidação) em presença de luz, porém sob intensidades luminosas mais elevadas ocorre maior degradação, e o equilíbrio é estabelecido a uma concentração mais baixa. Portanto, folhas de sombra possuem concentração maior de clorofila do que as folhas expostas ao sol (KRAMER; KOSLOWSKI, 1979).

A relação existente entre a produção de matéria seca e a quantidade de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) interceptada ou absorvida tem sido amplamente usada para definir a eficiência de uso da radiação pelas culturas (SIVAKUMAR; VIRMANI, 1984; COSTA *et al.*, 1996). Considera-se que, em plantas sadias adequadamente supridas de água e nutrientes, a fotossíntese líquida e a produção de fitomassa sejam

proporcionais à quantidade de RFA absorvida pelo dossel (MONTEITH, 1977). Entretanto, cuidados são necessários quando se compara a produtividade da cultura em diferentes níveis de radiação. pois a taxa fotossintética e a densidade de fluxo de radiação não têm relação linear dentro do dossel, já que a maioria das folhas está exposta a baixos níveis de radiação.

Em condições normais, a taxa de transpiração nas folhas é determinada especialmente pela radiação, déficit de saturação e pela condutância estomática (SANTOS FILHO, 1984). O fechamento dos estômatos é a estratégia mais comumente utilizada pela planta para manter a turgescência durante as horas mais quentes do dia e para diminuir a taxa de transpiração (HSIAO, 1973). Esse mecanismo prejudica a atividade fotossintética devido ao impedimento da entrada de CO_2 , com conseqüente redução do crescimento da planta (BOYER, 1971). A resistência difusiva (R_s) mede o comportamento dos estômatos em resposta à perda de vapor d'água. Altas resistências indicam o fechamento estomático, o qual torna mais lenta a perda do vapor d'água, reduz a absorção de CO_2 e, conseqüentemente, a fotossíntese (NOGUEIRA, 1997).

Poucos são os trabalhos realizados envolvendo os aspectos fisiológicos das pupunheiras, entretanto em estudo sobre fotossíntese, condutância estomática e transpiração em plantas provenientes de sementes, sob deficiência hídrica, realizado por Oliveira *et al.* (2002), observou-se a diminuição da condutância estomática e uma queda mais rápida da taxa de transpiração que a queda observada na fotossíntese, indicando a existência de mecanismos de aclimatização em pupunheiras provenientes de sementes, no sentido de diminuir as perdas de água, quando sob condição de estresse hídrico moderado (BENTES-GAMA *et al.*, 2005).

O uso de recipientes fechados, no caso de plantas cultivadas *in vitro*, dificulta as trocas gasosas entre a atmosfera do recipiente de cultivo e o meio exterior, podendo resultar em alterações no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Nestas condições, as microplantas podem não se desenvolver plenamente por limitações impostas pela composição da atmosfera dos frascos (BUDDENDORF-JOOSTEN; WOLTERING, 1994).

A redução do crescimento das plantas *in vitro*, conseqüentemente pode ser em decorrência a alguns fatores como, a baixa capacidade fotossintética, devido à rápida

queda da concentração do CO₂ no recipiente (POSPISILOVÁ; SOLAROVÁ; CATSKY, 1992); baixa irradiância (LAKSO *et al.*, 1986), altos níveis de açúcar do meio (GROUT, 1988), alta umidade relativa, bem como pela ação do etileno, gerado e acumulado no interior dos frascos (BUDDENDORF-JOOSTEN; WOLTERING, 1994).

Outro fator limitante é a fonte de carboidrato do meio de cultura, que pode inibir o metabolismo fotossintético do carbono. A adição de sacarose ao meio pode inibir a fotossíntese potencial das plantas cultivadas *in vitro* (LEES; EVANS; NICHOLAS, 1991), além de reduzir a atividade da RUBISCO e inibir o acúmulo de clorofila (LA ROSA *et al.*, 1984).

As clorofilas são os principais pigmentos cloroplastídicos responsáveis pela captação de radiação solar que durante o processo de fotossíntese é convertida em energia química na forma de ATP e NADPH (MARENCO; LOPES, 2005). Por essa razão a determinação dos teores de clorofila da folha é importante porque a atividade fotossintética da planta depende em parte da capacidade da folha para absorver luz.

Não obstante, a determinação do teor de clorofila é tradicionalmente realizada pela extração dos solutos foliares e posterior determinação espectrofotométrica, utilizando comprimentos de onda na região do vermelho do espectro de luz visível. Na busca de métodos não destrutivos de amostras para determinação do conteúdo de pigmentos, estudos em diversas culturas têm sido conduzidos para a avaliação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos com a aplicação do medidor indireto de clorofila (MINOLTA, 1989) designado SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) que fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha. Os valores são calculados pela leitura diferencial da quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões de comprimento de onda: a 650 nm, onde ocorre absorção de luz pela molécula de clorofila e a 940 nm, onde não ocorre absorção. Com estes dois valores, o equipamento calcula um número ou índice SPAD que, normalmente, é altamente correlacionado com os teores de clorofila. Correlações positivas foram observadas em folhas de tomateiro (GUIMARAES *et al.*, 1999), milho (ARGENTA *et al.*, 2001), mamoneiro (NETTO *et al.*, 2002), pau-rosa, mogno e acariquara (SALLA; RODRIGUES; MARENCO, 2007). No entanto, não foram relatadas informações a respeito de sua utilização em folhas de pupunheiras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi desenvolvido em sala de crescimento e no ripado, pertencentes ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas e Laboratório de Fisiologia de Plantas em Condições de Estresse, respectivamente, ambos pertencentes ao Departamento de Ciências Biológicas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba-SP.

3.2 Material vegetal

Foram utilizadas cinquenta microplantas provenientes de cultura de tecido e cinquenta plântulas de pupunheiras oriundas de sementes (*Bactris gasipaes* Kunth-Arecaceae). O experimento foi conduzido no período de março a setembro de 2007.

3.3 Condições de cultivo

3.3.1 Cultivo *in vitro*

As cinquenta plantas *in vitro* (microplantas), foram obtidas a partir da germinação de embriões excisados de sementes de *Bactris gasipaes* oriundas de Yurimáguas (Amazônia Peruana) em tubos de ensaios contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 2,4 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,8 mg.L⁻¹ de 6-benzinoaminopurina (6-BAP), geleificado com 0,6% de agar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (27±1°C; irradiância de 42 µmol.m⁻².s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), fotoperíodo de 16 horas. As culturas foram mantidas no mesmo meio de cultura renovados a cada oito semanas, durante um ano e meio (Figura 1A). Após esse período as microplantas foram transferidas para ambiente *ex vitro* onde passaram pelas etapas de rustificação.

3.3.2 Cultivo *ex vitro* (Processo de aclimatização)

3.3.2.1 Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares para definição do substrato adequado para o estabelecimento das microplantas às condições *ex vitro*. Para tanto foram testados: o substrato comercial (PlantMax[®]); PlantMax[®] + vermiculita (1:1); casca de *Pinus*; composto de areia fina + argila + esterco (30%, 50%, 20%); apenas areia fina e solo do tipo latossolo vermelho-amarelo. Todos os substratos foram autoclavados por uma hora (120°C e 1,2 atm).

Foram transferidas 10 microplantas em cada um dos substratos distribuídos em sacos plásticos (5 x 7,5 x 13cm) e acondicionadas por trinta dias em ambiente controlado, com as condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo iguais as utilizadas nas microplantas sob condição *in vitro*.

A irrigação foi manual duas vezes ao dia, no período da manhã (9 horas) e da tarde (5 horas). A determinação da capacidade de campo foi feita de acordo com Bernardo (1995), aferindo-se o peso seco de cada um dos substratos e em seguida os mesmos foram imersos em água por quarenta e oito horas ($\frac{3}{4}$ de água em relação ao saco plástico). Decorrido o referido período os sacos plásticos foram vedados por vinte e quatro horas com filme de PVC ("Magipac") para evitar a evaporação. A diferença entre o peso úmido e o peso seco estabeleceu o valor da capacidade de campo dos diferentes substratos.

3.3.2.2 Etapas de rustificação

As cinqüenta microplantas de pupunheiras cultivadas *in vitro* foram transferidas para o ambiente *ex vitro*, onde foram submetidas a três etapas de rustificação:

- **1ª Etapa** - As microplantas foram mantidas em sala de crescimento por três dias, com os tubos de ensaio abertos, deixando-as expostas ao ambiente da sala climatizada (Figura 1B);
- **2ª Etapa** - As microplantas foram transferidas para sacos plásticos (Figura 1C), contendo latossolo vermelho-amarelo, cuja densidade relativa é de 2,86 g.cm⁻³, e constituído de 82% de areia, 14% de argila e 4% silte. As

microplantas permaneceram por quarenta e sete dias em uma estrutura fechada com plástico, (Figura 1D), totalizando cinquenta dias de aclimatização (50 dda). Nessas duas primeiras etapas, as condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo foram as mesmas do cultivo *in vitro*.

- **3ª Etapa** - As microplantas foram transferidas para o ripado sob condições de sombra (sombrite com malha 50%), por um período de cento e trinta dias (Figura 1E) totalizando assim cento e oitenta dias de aclimatização (180 dda).

3.3.3 Cultivo *in vivo*

As cinquenta plântulas de pupunheira utilizadas foram provenientes de matrizes de Yurimáguas (Amazônia Peruana), cultivadas em canteiros forrados com areia e cobertas com serragem curtida. As plântulas foram gentilmente cedidas pelo Sr. Júlio Cirino, proprietário do viveiro de mudas “Flora pau-brasil”, localizado em São Pedro (SP), cuja latitude é de 22°32'55" sul e a uma longitude 47°54'50" oeste, estando a uma altitude de 550 metros.

As plântulas foram mantidas em sementeira por 90 dias seguindo as metodologias adotadas pelo viveiro acima descrito, e então transferidas para sacos plásticos contendo latossolo vermelho-amarelo e mantidas por seis meses em viveiro sob tela de sombrite 50%, nas mesmas condições das microplantas *ex vitro*, na 3ª etapa de rustificação (item 3.3.2.2.).

Figura 1 - Pupunheiras acondicionadas em diferentes condições de cultivo. **A.** *in vitro*; **B.** *ex vitro* na 1ª etapa de rustificação (a seta evidencia a ausência de tampas); **C.** microplantas transferidas para sacos plásticos, e acondicionada às condições *ex vitro* (início da 2ª etapa de rustificação); **D.** estrutura de acondicionamento das microplantas na 2ª etapa de rustificação (a seta evidencia a presença de um plástico removível na estrutura); **E.** microplantas acondicionadas às condições *ex vitro* quando transferidas para ripado (3ª etapa de rustificação) **F.** plantas cultivadas *in vivo* e acondicionadas em ripado

3.4 Tratos culturais

Durante todo processo de aclimatização, as microplantas acondicionadas *ex vitro*, bem como as plantas provenientes de sementes (*in vivo*) receberam os mesmos tratos culturais como forma de padronizar e evitar possíveis variáveis resposta.

3.4.1 Adubação

Tanto nas microplantas em processo de aclimatização (*ex vitro*) quanto nas plantas *in vivo*, foram aplicadas semanalmente 20ml de solução nutritiva de Sarruge (1975).

3.4.2 Irrigação

A irrigação das microplantas foi realizada manualmente, no período da manhã (9 horas) e da tarde (5 horas).

3.4.3 Tratamento profilático

Em intervalos de duas semanas aplicou-se nas folhas e no substrato ($10 \text{ mL.saquinho}^{-1}$) $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de fungicida comercial Dithane (mancozebe).

3.4.4 Aspecto sanitário das plantas

O aspecto sanitário das pupunheiras foi monitorado durante todo o período experimental. Quando verificadas lesões provenientes da ação de fungos, as folhas foram retiradas das plantas e os fragmentos foliares foram submetidos à desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos. Em seguida esses fragmentos foram inoculados em meio agar-água. As colônias fúngicas foram purificadas em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) e mantidos em câmara BOD a 25°C por 7 dias. De cada placa foram feitas lâminas com azul de metileno e observadas ao microscópio de luz Zeiss Axioskop 2.

A caracterização morfológica dos fungos foram realizadas em conjunto com o trabalho de pós-doutoramento do fitopatologista Dr. Francisco André Ossamu Tanaka.

3.5 Coleta de dados

Os dados referentes às análises anatômicas e fisiológicas do desenvolvimento das microplantas sob condição *in vitro* foram coletados no momento que estas foram transferidas para o ambiente *ex vitro*. Durante o processo de aclimatização os dados referentes às microplantas mantidas em condições *ex vitro* foram realizadas em intervalos de 15, 30, 50, 90 e 180 dias de aclimatização (dda). Enquanto que os dados das plantas *in vivo* foram coletados concomitantes com os das microplantas com 180 dda.

3.5.1 Análises anatômicas

As análises anatômicas foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e de luz na primeira folha totalmente expandida (+1) das pupunheiras acondicionadas nas diferentes condições de cultivo: *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* (Figura 2A).

Figura 2 - Plantas de pupunheiras evidenciando a região onde foram coletados os dados para análises anatômicas e fisiológicas. **A.** Em evidência a primeira folha totalmente expandida (+1); **B.** Detalhe da primeira folha totalmente expandida, evidenciando as regiões onde foram retiradas amostras concomitantes para análises em Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Luz, no terço mediano do folíolo esquerdo (R1); Histoquímica, na porção basal do terço apical do folíolo esquerdo (R2); Impressão epidérmica após coleta dos dados fisiológicos, por meio da leitura do equipamento IRGA e SPAD, no terço mediano do folíolo direito (R3)

3.5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação das folhas de pupunheiras por meio de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura (NAP/MEPA - ESALQ/USP), de acordo com a metodologia de Kitajima; Leite (1999).

As amostras do terço mediano do folíolo esquerdo (R1) de cada condição ambiental (Figura 2B), as quais foram cortadas em segmentos de folhas com aproximadamente 5mm. Os segmentos foram fixados em solução de Karnovsky (1965) modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2), por 24 horas.

Decorrido esse período as amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). A secagem foi realizada ao ponto crítico (BALZERS CPD 030) tendo como meio de desidratação, o CO₂ e, em seguida, foram metalizadas com ouro (metalizador MED 010 BALZERS), e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

3.5.1.2 Microscopia de luz

3.5.1.2.1 Impressão epidérmica

Para confecção das lâminas da impressão das epidermes foi utilizado o terço mediano dos folíolo direito (R3), o qual foi impresso sobre películas de éster de cianoacrilato (Adesivo Instantâneo Universal - Loctite®) e pressionadas por aproximadamente dez segundos, tempo necessário para que o adesivo se espalhe (SEGATTO; BISOGNIN; BENEDETTI, 2004).

Com a impressão da epiderme deixada sobre a lâmina, foi possível obter as densidades estomática e de tricomas. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz equipado com ocular quadriculada com área foliar de 0,78 mm². O tamanho dos estômatos e seus diâmetros polares e equatoriais foram medidos também em microscópio de luz com aumento 45x, equipado com ocular com régua micrométrica.

3.5.1.2.2 Análise histológica

Amostras do terço mediano do folíolo esquerdo (R1) das plantas de pupunheiras mantidas nas diferentes condições de cultivo (Figura 2B) foram fixadas em solução de Karnovsky (1965), seguida de desidratação crescente em série etílica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Em seguida as amostras foram inclusas em resina de hidroxietilmetacrilato (LEICA-HISTORESIN) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos com as amostras foram cortados em secções transversais em micrótomo rotativo com aproximadamente 5 µm de espessura.

Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,05%) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973). Finalmente confeccionou-se as lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG (SDC-313), e avaliadas para obtenção da área ocupada pelo tecido na folha e a sua respectiva espessura.

As áreas foliares correspondentes a epiderme, hipoderme, mesofilo, fibras, bainha do feixe e tecidos vasculares foram avaliadas por meio de adaptações da técnica usual do programa Quant® (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), e as espessuras dos tecidos foram medidas com o auxílio de um microscópio de luz em aumento 45x, equipado com ocular micrométrica.

3.5.1.2.3 Análise histoquímica

Os cortes histológicos a mão livre foram confeccionados com o auxílio de medula de Imbaúba, utilizando a porção basal do terço apical do folíolo esquerdo (R2) de cada condição ambiental (Figura 2B) cortada com uma lâmina de aço (Gillette®) em fatias finas, e mantidas em água destilada. Os cortes obtidos foram clarificados com hipoclorito de sódio a 20% (v/v) e corados com dupla coloração: fucsina básica 0,0125% e azul de Astra 1,0% (ALVES de BRITO; ALQUINI, 1996). Uma vez efetuada a dupla coloração, as lâminas foram lavadas, secas em estufa a 40°C, submetidas à montagem convencional e recobertas com lamínula.

3.5.2 Análises fisiológicas

3.5.2.1 Fotossíntese, transpiração e condutância estomática

As variáveis: taxa de fotossíntese líquida foliar, taxa transpiratória e condutância estomática foram medidas no terço mediano do folíolo direito (R3) de cada condição ambiental (Figura 2B) pela curva de luz, obtidas pelo IRGA (analisador de gás infravermelho), sistema aberto, portátil, modelo LI-COR 6400, conforme a metodologia descrita por Marengo; Gonçalves; Vieira (2001).

3.5.2.2 Avaliação indireta do teor de clorofila

Foi utilizado o método não destrutivo para quantificação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos com a aplicação do medidor indireto de clorofila o clorofilômetro SPAD-502 - Soil and Plant Analysis Development (MINOLTA, 1989).

Por não haver trabalhos sobre a calibração do equipamento SPAD para determinação do teor relativo de clorofila da espécie *Bactris gasipaes*, foi necessário antes de retirar as medidas nos respectivos períodos e condições de cultivo, fazer uma análise comparativa dos dados do teor relativo de clorofila obtido pelo SPAD com o teor de clorofila obtido pelo método de Arnon (1949). A absorbância da clorofila foi medida em 645 e 663 nm. Para tais análises foram utilizadas dez plantas de pupunheiras, com nove meses de idade, onde foram medidos sete pontos da região mediana do terceiro folíolo direito da primeira folha mais estendida.

As amostras coletadas e armazenadas conforme descrito anteriormente, foram homogeneizadas em almofariz de porcelana com 2ml de acetona 80% (v/v) à 4°C e protegidas da luz, filtradas em papel de filtro Whatman nº 1 e o filtrado levado ao volume final de 5 ml com acetona 80%. Em seguida, fez-se a leitura de absorbância do filtrado a 645 e 663 nm (ARNON, 1949), utilizando um espectrofotômetro (Biochrom, modelo libra S22)

A concentração de clorofila total foi calculada pela fórmula:

$$\text{mg clorofila total/ AVR} = [20,2 (A 645) + 8,02 (A 663)] \times V/(1000 \times \text{AVR})$$

onde:

- **A645 e A663**: absorvância a 645 e 663 nm;
- **V**: volume final do extrato (mL)
- **AVR**: área verde correspondente a 10 cm²

Após análise previa da correlação entre os valores SPAD e a concentração de clorofila, os dados de valores SPAD foram coletados das microplantas acondicionadas nas diferentes condições de cultivo (*in vitro*, *ex vitro* (15, 30, 50, 90 e 180 dda) e *in vivo*), onde foram realizadas sete leituras de unidades SPAD por terço mediano do folíolo direito (R3) de 10 plantas por condição de cultivo, conforme discriminado na Figura 2B.

3.6 Delineamento estatístico

O delineamento estatístico foi inteiramente aleatorizado em todos os métodos anteriormente descritos, entretanto foram empregados diferentes números de repetições para cada método. Para as análises histológicas (item 3.5.1.2.1.) utilizou-se cinco repetições (1 folha.planta⁻¹) por condição de cultivo.

A densidade estomática e de tricomas (item 3.5.1.2.2.), por sua vez, foi composta de dez repetições (1 folha.planta⁻¹) por condição de cultivo, onde foram analisados cinco campos de contagens por região amostrada (adaxial e abaxial), por folha, totalizando duzentas contagens por ambiente de cultivo.

No que diz respeito ao tamanho dos estômatos (item 3.5.1.2.2.) utilizou-se a média de dez repetições (1 folha.planta⁻¹) por condição de cultivo, onde, dentro de cada repetição foram medidos os diâmetros polares e equatoriais de cinco estômatos.

A curva de luz, que determinou a taxa de fotossíntese, transpiração e condutância estomática (3.5.2.1.), foi obtida a partir da média de quatro repetições (1 folha.planta⁻¹) por condição de cultivo. Não obstante, o teor de clorofila (item 3.5.2.2.) tanto no teste de calibração do SPAD, quanto nas plantas mantidas nas diferentes condições ambientais foi determinado a partir da média da leitura de sete pontos por folha, de dez plantas, sendo medidas 1 folha por planta. Todos os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

4 RESULTADOS

4.1 Condições de Cultivo

4.1.1 Cultivo *in vitro*

As plantas de pupunheiras acondicionadas *in vitro* (microplantas) foram caracterizadas como sadias por apresentarem-se assintomáticas e completas, providas de parte aérea e sistema radicular totalmente desenvolvidos.

4.1.2 Cultivo *ex vitro* (Processo de aclimatização)

4.1.2.1 Testes preliminares

O substrato que apresentou melhor desenvolvimento *ex vitro* das microplantas foi o constituído de latossolo vermelho-amarelo, apresentando maior número de microplantas sobreviventes em comparação com os demais substratos (Figura 3).

Durante esse período foi observada a ocorrência de fungos na base do estipe das microplantas em todos os substratos.

Figura 3 - Número de microplantas de pupunheiras sobreviventes ao processo de aclimatização em diferentes substratos

4.1.2.2 Etapas de rustificação

Na primeira etapa de rustificação das microplantas de pupunheiras (3 dda), não foi observada nenhuma resposta que evidenciasse estresse proporcionado pela alteração das condições ambientais, ou seja, a exposição das microplantas a um ambiente não asséptico, não causou neste período, o desenvolvimento de microrganismos, tão pouco, uma resposta imediata das plantas (Figura 1B), com 100% de sobrevivência (Figura 4).

Na 2ª etapa de rustificação (50 dda), as microplantas transferidas para sacos plásticos, permaneceram por quarenta e sete dias em sala de crescimento sem aparentar qualquer tipo de estresse, sendo que apenas observada a perda de 3 microplantas das cinquenta transferidas para as condições *ex vitro* (estrutura fechada com plástico removível), evidenciando desta forma 95% de sobrevivência (Figura 4).

Figura 4 - Percentual de sobrevivência de microplantas de pupunheiras transferidas para ambientes não assépticos *ex vitro*, ao final de cada etapa do processo de rustificação: 1ª etapa (3 dda); 2ª etapa (50 dda) e 3ª etapa (180 dda)

Na 3ª etapa em condições não assépticas, o percentual de sobrevivência diminuiu para 70% (Figura 4), devido a presença de fungos que propagaram na base do estipe (Figura 5A, 5B e 5C) causando o tombamento da planta, e no limbo foliar (Figura 5D, 5E e 6) ocasionando manchas foliares. Ao final dessa etapa, constatou-se a sobrevivência de trinta e cinco microplantas, das cinquenta transplantadas para o ambiente *ex vitro* (ripado).

Figura 5 - Microplanta de pupunheira acondicionada *ex vitro* (90 dda) no ripado, apresentando sintomas de ocorrência de fungos. **A.** Planta com sintomas da ação fúngica; **B.** Detalhe da base do estipe onde ocorreu o tombamento, evidenciando raiz intacta; **C.** Detalhe da base do estipe onde ocorreu o tombamento; **D.** Limbo foliar de pupunheira cultivada *ex vitro* apresentando mancha causada pela presença de fungo (seta); **E** - Detalhe da lesão foliar (seta)

Figura 6 - Plantas de pupunheiras provenientes de sementes (*in vivo*), apresentando sintomas de ocorrência de fungos. **A.** Manchas de cor parda claro que evoluem para manchas de cor parda escuro com centro branco (setas brancas), necrose com início no ápice foliar em direção à base (seta vazia). **B.** Pontos cloróticos (seta branca), necrose com início no ápice foliar em direção à base (seta vazia), necrose ao longo do limbo (seta preta); **C.** Manchas com coloração branca que evoluem para membrana translúcida que se rompe (seta branca); **D.** Pontos cloróticos em toda extensão do limbo (seta preta); alguns pontos mais escuros caracterizando colônias de fungos saprófitas (seta branca)

4.1.3 Cultivo *in vivo*

As plantas de pupunheiras provenientes de sementes (*in vivo*) apresentaram ótimo desenvolvimento, com 100% de sobrevivência, mesmo apresentando alguns sintomas de ação fúngica nas folhas (Figura 6).

Foram observadas em algumas plantas, manchas de cor parda claro que evoluíram para manchas de cor parda escuro com centro branco e necrose com início no ápice foliar em direção à base (Figura 6A e 6B). Na Figura 6C pode se observar manchas com coloração branca que evoluíram para membrana translúcida (totalmente desclorofilada) que se romperam. Em algumas plantas também foram observados pontos cloróticos em toda extensão do limbo e alguns pontos mais escuros, caracterizando colônias de fungos saprófitas (Figura 6D).

4.2 Tratos culturais

Tanto as microplantas mantidas *ex vitro* quanto as plantas *in vivo* responderam bem a adubação com solução de Sarruge, não apresentando sinais de deficiência nutricional.

O valor de 50 mL.planta⁻¹.dia⁻¹ correspondeu a 25% de água disponível no substrato, valor esse estabelecido a partir do cálculo da capacidade de campo. Essa forma de irrigação mostrou-se eficiente uma vez que não foi observado nenhum sintoma de estresse hídrico, tanto nas microplantas acondicionadas *ex vitro*, quanto nas plantas *in vivo*.

As aplicações de fungicida mostraram-se eficientes para minimizar a presença de fungos tanto nas microplantas (*ex vitro*) quanto nas plantas *in vivo*. As folhas onde foram detectadas lesões decorrentes da presença de fungos (Figuras 5 e 6) foram extraídas da planta e essas pulverizadas novamente com Dithane.

A caracterização morfológica dos fungos causadores das lesões foliares permitiram identificar os gêneros: *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., *Helminthosporium* sp. *Phoma* sp., conforme pode se observar na Figura 7.

Figura 7 - Características morfológicas dos fungos isolados das lesões foliares de pupunheiras em condições *ex vitro* e *in vivo* observadas por meio de microscopia de luz. **A.** Evidência os apressórios (seta) de *Colletotrichum* sp; **B.** Esporos (seta branca) e apressórios (seta preta) de *Colletotrichum* sp.; **C.** Hifas (seta preta) e esporos septados (seta branca) de *Helminthosporium* sp.; **D.** Hifas com ramificação em ângulo de 90° (seta) de *Rhizoctonia* sp.; **E.** Hifa de *Phoma* sp (seta); **F.** Esporos de *Phoma* sp (seta)

4.3 Coleta de dados

As coletas dos dados referentes às análises anatômicas e fisiológicas das microplantas mantidas nas condições *ex vitro*, nos intervalos de 15 e 30 dias de aclimatização (dda), não apresentaram alteração quando comparadas as plantas sob condições *in vitro*, razão pela qual não houve a necessidade da divulgação dos dados, sendo apresentados os resultados das análises referentes ao término da 2ª e 3ª etapa de rustificação (50 e 180 dda, respectivamente), bem como aos 90 dda, devido a 3ª etapa corresponder ao maior período de acondicionamento das microplantas ao ambiente *ex vitro*. Já, a coleta dos dados referentes às plantas sob condições *in vitro* e *in vivo*, seguiram o período pré-estabelecido, ou seja, quando as microplantas foram transferidas para o ambiente *ex vitro* e ao término da 3ª etapa de rustificação do processo de aclimatização, respectivamente.

4.3.1 Análises anatômicas

As análises em microscopia eletrônica de varredura evidenciaram em vista frontal a presença de células epidérmicas irregulares, heterodimensionais, de paredes retas, com tamanhos variados, sendo ambas as extremidades agudas, justapostas e seguindo em seu maior eixo o sentido das nervuras, tanto na face adaxial como abaxial das pupunheiras em todas as condições de cultivo (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*). Pode-se observar ainda que os estômatos apresentam-se ao longo de todo o limbo, estando as células estomáticas situadas no mesmo nível das demais células epidérmicas, tanto na nervura de maior porte, como em toda a lâmina foliar organizados em fileiras longitudinais paralelas às nervuras (Figura 8).

Figura 8 - Eletromicrografia de varredura da superfície foliar de pupunheira. **A.** Vista frontal da lâmina foliar; **B.** Detalhe da nervura foliar evidenciando a presença de estômatos; **C.** Detalhe da superfície foliar entre as nervuras evidenciando os estômatos. Epiderme (EP), Estômato (Es) e Tricoma glandular (TG)

Nas pupunheiras cultivadas *in vitro* e nas microplantas transferidas para as condições *ex vitro*, nos diferentes períodos de aclimatização, foi observada a ausência e/ou reduzida deposição de cera epicuticular em ambas as epidermes foliares em comparação com as plantas cultivadas *in vivo* (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Eletromicrografias de varredura da superfície adaxial de folhas de pupunheiras evidenciando a presença de tricomas e estômatos e ausência de cera epicuticular nas microplantas *in vitro* e *ex vitro*, e a presença desta nas planas *in vivo*. **A.** pupunheiras cultivadas *in vitro*; **B.** microplantas de pupunheiras cultivadas *ex vitro* (50 dda); **C.** microplantas de pupunheiras cultivadas *ex vitro* (90 dda); **D.** microplantas de pupunheiras cultivadas *ex vitro* (180 dda); **E.** pupunheiras cultivadas *in vivo*. Legenda: Tricomas glandulares (TG); Estômatos (Es); Cera epicuticular (Cep)

Figura 10 - Eletromicrografias de varredura da superfície abaxial de folhas de pupunheiras evidenciando a presença de tricomas e estômatos e ausência de cera epicuticular nas microplantas *in vitro* e *ex vitro*, e a presença desta nas plantas *in vivo*. **A.** pupunheiras cultivadas *in vitro*; **B.** microplantas de pupunheiras cultivadas *ex vitro* (50 dda); **C.** microplantas de pupunheiras cultivadas *ex vitro* (90 dda); **D.** microplantas de pupunheiras cultivadas *ex vitro* (180 dda); **E.** pupunheiras cultivadas *in vivo*. Legenda: Tricomas glandulares (TG); Estômatos (Es); Cera epicuticular (Cep)

Por meio da técnica de impressão epidérmica constatou-se que as condições ambientais de acondicionamento das plantas de pupunheiras influenciou estatisticamente apenas em relação ao número de estômatos nas faces adaxiais dos folíolos como se pode observar na Tabela 1. No entanto, em ambas as faces a maior densidade estomática foi observada na planta cultivada *in vivo*.

Ainda, por meio da técnica de impressão foram analisados os diâmetros polares e equatoriais dos estômatos, onde se observou que só apresentaram diferenças significativas, quando comparadas às plantas *in vivo* com as demais condições ambientais.

Tabela 1 - Médias da densidade e dos diâmetros polares e equatoriais dos estômatos nas faces adaxial e abaxial de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*

Condições ambientais	Densidade estomática (mm ²)		Diâmetro dos estômatos (µm)			
	FACES adaxiais	FACES abaxiais	Face adaxial		Face abaxial	
			equatorial	polar	equatorial	polar
<i>in vitro</i>	7,51Aab	55,54Ba	10,00 Aa	24,67 Aa	12,67 Ba	25,00 Aa
<i>ex vitro</i> {	50 dda	7,15Aab	54,87Ba	10,00 Aa	24,00 Aa	12,67 Ba
	90 dda	6,61Abc	52,36Ba	10,67 Aa	24,00 Aa	13,33 Ba
	180 dda	8,51Aa	57,77Ba	11,33 Aa	25,00 Aa	13,33 Ba
<i>in vivo</i>	11,00Aa	58,05Ba	16,00 Ab	28,67 Ab	16,00 Ab	30,00 Bb

Médias seguidas pelas letras minúsculas diferentes na linha e maiúscula na coluna indicam diferenças significativas em 5% de probabilidade pelo Tukey.

Análises por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, pela técnica de impressão epidérmica da lâmina foliar das pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* permitiram evidenciar a presença de um complexo estomático em todas as condições ambientais sendo constituído por um par de células guardas, um par de células subsidiárias polares menores nas extremidades, e duas outras células subsidiárias paralelas maiores às células-guarda (Figura 11).

Figura 11 - Vista frontal da lâmina foliar em microscopia eletrônica de varredura e impressão epidérmica evidenciando a presença de estômato tipo tetracítico. **A.** Eletromicrografia de varredura; **B.** impressão epidérmica. Legenda: Par de células guardas (CG); um par de células subsidiárias polares (CSpol); um par de células subsidiárias paralelas (CSpar); ostíolo (Os)

Foram observadas em ambas as epidermes de todas as plantas analisadas, ou seja, em qualquer condição de cultivo, a presença de tricomas glandulares com base multicelular e cabeça unicelular (Figura 12A), e acúleos multicelulares (Figura 12B).

Figura 12 - Eletromicrografia de varredura destacando a superfície foliar de pupunheira cultivada *in vivo* evidenciando os tipos de tricomas. **A.** Tricoma glandular (TG); **B.** Acúleo (Ac). Legenda: Células epidérmicas (Ep); Estômatos (Es); Cera epicuticular (Cep)

Observou-se que estatisticamente houve apenas diferença significativa quanto à média da densidade de tricomas das plantas *in vivo* quando comparada com a média das demais condições ambientais (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias do número de tricomas.mm⁻² presentes nas faces adaxiais e abaxiais de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*

Condições ambientais	Densidade de tricomas (mm ²)	
	Faces adaxiais	Faces abaxiais
<i>in vitro</i>	1,41 Aa	3,46 Bab
<i>ex vitro</i> { 50 dda	1,53 Aa	3,65 Bab
90 dda	2,25 Ab	4,18 Bb
180 dda	1,69 Aa	3,21 Ba
<i>in vivo</i>	4,00 Ac	5,87 Bc

Médias seguidas pelas letras minúsculas diferentes na linha e maiúscula na coluna indicam diferenças significativas em 5% de probabilidade pelo Tukey.

Quanto à área ocupada pelos tecidos foliares apenas verificou-se diferenças significativas entre a epiderme das plantas cultivadas *in vivo* em relação às demais (*in vitro* e *ex vitro*); a hipoderme das microplantas com 90 dda; as fibras do feixe das microplantas com 90 e 180 dda e as *in vivo*; e os tecidos vasculares das plantas cultivadas *in vivo* (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias das áreas dos tecidos (μm²) ocupadas na lâmina foliar de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*

Condições de cultivo	Área dos tecidos foliares (μm ²)						
	Epiderme	Hipoderme	Parênquima clorofiliano	Fibras	Fibras do feixe	Bainha foliar	Tecidos vasculares
<i>in vitro</i>	66,77 a	130,30 a	192,38 a	16,16 a	60,75 a	74,35 a	111,80 a
<i>ex vitro</i> { 50 dda	67,88 a	131,41 a	193,50 a	17,28 a	62,86 a	76,06 a	114,03 a
90 dda	63,09 a	106,89 b	186,92 a	9,81 a	90,84 b	64,20 a	97,86 a
180 dda	65,87 a	128,07 a	216,35 a	16,50 a	115,70 bc	68,88 a	103,10 a
<i>in vivo</i>	82,82 b	139,10 a	233,07 a	18,73 a	126,84 c	76,46 a	158,39 b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Mesmo os tecidos que não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes condições de cultivo, pode se observar que a área ocupada pelos mesmos na folha das plantas *in vivo* foram maiores que nas demais condições ambientais, conforme pode se observar na Figura 13.

Figura 13 - Médias das áreas ocupadas pelos diferentes tecidos foliares nas folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*. Legenda: Epiderme (Ep); Hipoderme (Hip); Parênquima clorofiliano (PC); Fibras (Fi); Fibras do feixe (FF); Bainha do feixe (BF) e Tecido vascular (TV)

Observou-se que as plantas *in vivo* apresentaram maiores espessuras nos tecidos das folhas analisadas, exceto quanto às epidermes (adaxial e abaxial), conforme pode se observar na Tabela 4.

Tabela 4 - Média das espessuras dos tecidos (μm) constituintes da lâmina foliar, de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*

Condições de cultivo	Espessura dos tecidos foliares (µm)					
	Epiderme adaxial	Hipoderme adaxial	Parênquima clorofiliano	Hipoderme abaxial	Epiderme abaxial	
<i>in vitro</i>	10,83 a	28,33 a	43,33 a	22,50 a	10,83 a	
<i>ex vitro</i> {	50 dda	11,66 a	26,67 a	43,33 a	20,00 a	10,83 a
	90 dda	10,83 a	25,83 a	49,17 a	19,17 a	11,67 a
	180 dda	11,67 a	28,33 a	54,17 a	15,83 b	9,17 a
<i>in vivo</i>	9,17 a	29,17 a	61,67 b	24,17 a	8,33 a	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As microplantas transferidas para as condições *ex vitro*, apresentaram no decorrer das etapas de rustificação, aumento na espessura do mesofilo e redução da hipoderme abaxial, enquanto que nos demais tecidos houve reduzida variação. As plantas cultivadas *in vivo*, por sua vez, apresentaram menor espessura epidérmica (Figura 14).

Figura 14 - Médias das espessuras dos tecidos (μm^2) na lâmina foliar, de pupunheiras cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*. Legenda: Epiderme adaxial (Ep.ada.); Epiderme abaxial (Ep.aba.); Hipoderme adaxial (Hip.ada.); Hipoderme abaxial (Hip.aba.); mesofilo (Mes)

As folhas estudadas apresentaram em corte transversal, epiderme uniestratificada em ambas as faces, sendo que na face adaxial as células mostraram-se mais uniformes quando comparadas às da face abaxial (Figura 15).

Figura 15 - Cortes transversais das lâminas foliares de pupunheiras nas diferentes condições de cultivo. **A.** Pupunheiras cultivadas *in vitro*, **B.** Pupunheiras acondicionadas *ex vitro* (50 dda); **C.** Pupunheiras acondicionadas *ex vitro* (90 dda); **D.** Pupunheiras acondicionadas *ex vitro* (180 dda); **E.** Pupunheiras cultivadas *in vivo*. Epiderme (Ep); Hipoderme (Hip); Mesofilo (Mes); Fibra (Fi); Estômato (Es)

Observou-se que em todas as condições de cultivo das pupunheiras a lâmina foliar apresentou fina camada de cutícula, células epidérmicas com paredes delgadas e estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas, ou em posição ligeiramente elevada. As células-guarda apresentaram-se reniformes e abaixo dessas, como pode se observar na Figura 16, a presença da câmara sub-estomática.

Figura 16 - Corte transversal da lâmina foliar de pupunheira cultivada *in vivo*, evidenciando o complexo estomático. Legenda: Células-guarda (CG); cutícula (Ct); Células subsidiárias paralelas (CSpar); Câmara sub-estomática (CS); Ostíolo (Os); mesofilo (Mes); fibras não vasculares (Fi)

Abaixo das epidermes foliares das pupunheiras em todas as condições de cultivo, constatou-se a presença de hipoderme uniestratificada constituída de células grandes com paredes delgadas com formas irregulares, tanto na face adaxial, quanto na face abaxial (Figuras 15 e 17).

Figura 17 - Eletromicrografia em vista lateral da lâmina foliar de pupunheira cultivada *in vivo* evidenciando a presença de hipoderme uniestratificada com forma irregular. Legenda: Epiderme (Ep); Hipoderme (Hip); Mesofilo (Mes)

O mesofilo de todas as plantas analisadas é homogêneo, constituído de células parenquimáticas intercaladas com espaços intercelulares (Figura 15), caracterizando o parênquima lacunoso. Constatou-se que houve diferença significativa na espessura do mesofilo da planta *in vivo* em relação as demais condições ambientais, com aumento deste tecido nas microplantas com maior tempo de aclimatização (Tabela 4).

Foram encontradas dispersas pelo mesofilo, as fibras não vasculares (Fi) que diferentemente das demais fibras encontradas junto aos feixes vasculares são constituídas de celulose (Figura 18). Essas fibras não vasculares, entretanto, não apresentaram diferença significativa entre as diferentes condições ambientais (Tabela 3).

Figura 18 - Corte transversal de folhas de pupunheiras em microscopia de luz e eletrônica de varredura. **A.** Eletromicrografia de varredura evidenciando o limbo foliar de pupunheira; **B.** Fotomicrografia de luz do limbo foliar de pupunheira com dupla coloração de azul de astra e fucsina básica, onde as Fibras não vasculares (Fi), apresentaram coloração avermelhada e as Fibras do feixe (FF) azul. Legenda: Epiderme (Ep); Estômato (Es); Hipoderme (Hip); Mesofilo (Mes); Bainha do feixe (BF) e Tecido vascular (TV)

Observou-se também a presença de idioblastos com ráfides dispersos no mesofilo, como se verifica na Figura 19, estrutura essa presente nas folhas em todas as condições ambientais.

Figura 19 - Eletromicrografia de varredura evidenciando a presença de idioblastos (Id) com ráfides (Rf) no mesofilo de microplantas de pupunheira

Os feixes vasculares apresentaram tamanhos variados, onde os menores encontravam-se centralizados no mesofilo e os maiores que se encontravam na nervura de maior porte, localizavam-se ao longo do limbo, estando sua maior proeminência voltada para a face adaxial (Figura 20), sendo caracterizados como feixes bicolaterais.

Medidas dos diferentes tecidos que compunham o feixe vascular foram realizadas, como as fibras esclerenquimáticas (fibras vasculares), a bainha vascular e os tecidos do xilema e floema, que foram medidos em conjunto, e considerados como tecidos vasculares. Nenhum destes tecidos estatisticamente diferiu quanto à área ocupada na lâmina foliar em relação à condição ambiental a qual as plantas foram mantidas, conforme se pode observar na Figura 21.

Figura 20 - Eletromicrografia de varredura da lâmina foliar de microplantas de pupunheiras, evidenciando os diferentes tamanhos de feixes vasculares. **A.** Feixe vascular de menor tamanho centralizado no mesofilo; **B.** Feixe de tamanho médio, ocupando todo o mesofilo; **C.** Feixe de maior tamanho caracterizando as nervuras das folhas (C). Epiderme adaxial (Ep. ada);

Epiderme abaxial (Ep. aba); Hipoderme (Hip); Mesofilo (Mes); Feixe vascular (FV); Fibra do feixe (FF); Tecido Vascular (TV)

Figura 21 - Corte transversal da lâmina foliar de pupunheiras acondicionadas em diferentes condições ambientais, evidenciando a região do feixe vascular. **A.** Pupunheiras cultivadas *in vitro*; **B.** Pupunheiras acondicionadas *ex vitro* (50 dda); **C.** Pupunheiras acondicionadas *ex vitro* (90 dda); **D.** Pupunheiras acondicionadas *ex vitro* (180 dda); **E.** Pupunheiras cultivadas *in vivo*. Legenda: Câmara Subestomática (CS); Epiderme adaxial (Ep. ada); Epiderme abaxial (Ep. aba); Estômato (Es); Hipoderme adaxial (Hip. ada); Hipoderme abaxial (Hip. aba), Mesofilo (Mes), Fibra (Fi), Fibras do Feixe (FF), Tecido Vascular (TV)

4.3.2 Análises fisiológicas

4.3.2.1 Taxa de fotossíntese, taxa de transpiração e condutância estomática

Por meio da curva de luz obtida pela análise do IRGA pode-se observar que ao longo do processo de aclimatização as microplantas apresentaram alterações quanto às atividades fisiológicas. Aos 50 dda (dias de aclimatização), as microplantas transferidas para as condições *ex vitro* mostraram uma taxa fotossintética consideravelmente reduzida e inconstante quando comparada com a *in vitro* (Figuras 22 e 23).

No decorrer do processo de aclimatização as microplantas mantidas por 90 dda em condições *ex vitro* mostraram um aumento significativo da taxa de fotossíntese quando comparado com as microplantas *ex vitro* (50 dda), entretanto apresentaram forte inconstância, com picos de saturação. Concomitante à taxa de fotossíntese a taxa de transpiração e condutância também aumentaram (Figura 22).

Decorridos 180 dda, nas microplantas, o ponto de compensação da luz foi bem próximo ao das plantas cultivadas *in vivo*, apresentando dessa forma taxa de fotossíntese líquida equivalente. A taxa de transpiração, entretanto, mostrou-se intermediária, ou seja, entre as microplantas sob condição *in vitro* e as plantas *in vivo* (Figura 23).

Tanto a taxa de fotossíntese líquida quanto a taxa de transpiração evidenciaram resultados independentes da condutância estomática, uma vez que, essa se apresentou menor que a das microplantas sob condição *in vitro* (Figura 23).

Figura 22 - Dados relativos as análises fisiológicas das microplantas de pupunheiras acondicionadas nas diferentes condições *ex vitro* (com 50, 90 e 180 dias de aclimatização). **A.** Taxa de fotossíntese líquida; **B.** Taxa de transpiração; **C.** Condutância estomática

Figura 23 - Dados relativos as análises fisiológicas em plantas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* (180 dda) e *in vivo*. **A.** Taxa de fotossíntese líquida; **B.** Taxa de transpiração; **C.** Condutância estomática

4.3.2.2 Avaliação indireta do teor de clorofila

Por meio da análise previa de calibração do equipamento SPAD, utilizando o terceiro folíolo direito da primeira folha mais estendida das plantas de pupunheiras oriundas de sementes, com nove meses de idade, foi estabelecida uma equação que associou os valores de SPAD e os teores de clorofila total da folha, observando uma correlação entre as variáveis analisadas (Figura 24).

Figura 24 - Teores de clorofila total em função dos valores de clorofilômetro (SPAD-502), obtidos do folíolo da folha mais estendida de pupunheira oriundas de sementes

Quanto às unidades SPAD obtidas dos folíolos recém-expandidos das pupunheiras analisadas, não houve diferença significativa em relação às diferentes condições de cultivo (Tabela 5). No entanto, observou-se um aumento gradual em unidades SPAD nas microplantas *ex vitro*, durante as etapas de rustificação, equivalendo-se a planta *in vivo* (Figura 25)

Tabela 5 - Média dos valores obtidos pelo clorofilômetro (SPAD-502) em folhas de cultivadas *in vitro*, acondicionadas *ex vitro* (50, 90, 180 dda) e cultivadas *in vivo*

Condições ambientais		Unidades SPAD
<i>in vitro</i>		38,14 a
<i>ex vitro</i>	50 dda	38,97 a
	90 dda	40,93 a
	180 dda	40,98 a
<i>in vivo</i>		41,40 a

Médias seguidas pelas letras diferentes indicam diferenças significativas em 5% de probabilidade pelo Tukey.

Figura 25 - Representação gráfica da média dos valores obtidos pelo clorofilômetro (SPAD-502) em folhas de pupunheira em diferentes condições de cultivo

É importante relatar que alguns dias após o acondicionamento das microplantas as condições *ex vitro*, sob sombrite (com malha 50%) observou-se em algumas delas, a ocorrência de clorose nas folhas mais velhas. Essa clorose foi nitidamente diferente da clorose ocasionada por fungos, como pode se observar na Figura 26.

Figura 26 - Microplanta de pupunheira acondicionada *ex vitro* (90 dda) apresentando severa clorose foliar

5. DISCUSSÃO

As microplantas de pupunheiras avaliadas neste trabalho apresentaram-se sadias, com bom desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, sem expressar qualquer sintoma de patogenicidade ou deficiência nutricional quando cultivadas *in vitro*. Entretanto, a técnica de micropropagação por meio de embriogênese somática e/ou organogênese diretas a partir de ápices caulinares de plantas adultas, poderia ser considerada estabelecida, se não fossem as dificuldades encontradas para a aclimatização das microplantas, considerado um dos gargalos atuais mais sérios referentes à aplicação dessa técnica para a multiplicação clonal de pupunheiras.

No decorrer do estabelecimento do protocolo de aclimatização das pupunheiras micropropagadas foram encontradas algumas dificuldades, tais como: substrato, irrigação e adubação apropriados para o desenvolvimento das microplantas, quando transferidas para as condições *ex vitro*, e por essa razão foram realizados testes preliminares visando instituir a melhor metodologia para o estabelecimento neste ambiente.

Dentre as hipóteses para a redução do percentual de sobrevivência das microplantas ao ambiente *ex vitro*, o enraizamento é mencionado em alguns trabalhos como um fator limitante no processo de aclimatização (ZIV, 1995; MARTINS; PEDROTTI, 2001; BOSA *et al.*, 2003). Segundo Debergh; Maene (1981), apenas em algumas espécies as raízes produzidas *in vitro* são funcionais e mantêm-se após serem transferidas para a condição *ex vitro*. George (1996), entretanto, afirma que algumas microplantas enraízam, sobrevivem e tem alta taxa de crescimento quando enraizadas *in vitro*. Neste contexto, os resultados encontrados no presente trabalho, indicaram que as pupunheiras correspondem ao grupo de plantas que as raízes produzidas *in vitro* sobrevivem e mostram sinais de funcionalidade após transferência para o ambiente *ex vitro*, como pode se observar na Figura 5, que evidencia a raiz intacta mesmo após a ocorrência de fungos no colo do estipe. É importante, entretanto, ressaltar que tanto o desenvolvimento e crescimento da raiz, quanto da parte aérea das microplantas mostraram-se lento, corroborando as informações de Ferreira; Santos (1992) que caracterizam esta espécie como recalcitrante.

Muitos são os tipos de substratos utilizados na aclimatização de espécies micropropagadas, por essa razão foram testados, o substrato comercial (PlantMax[®]); PlantMax[®] + vermiculita (1:1); casca de *Pinus*; composto de areia fina + argila + esterco (30%, 50%, 20%); apenas areia fina, substratos esses citados em diversos trabalhos de aclimatização de microplantas (HOFFMANN *et al.*, 2001; MORAES; CAVALCANTE; FARIA, 2002; SILVA *et al.*, 2003; BOSA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; SKREBSKY; NICOLOSO; MALDANER, 2006; PEIXOTO *et al.*, 2006; SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2007). Além desses substratos, foi testado o solo tipo latossolo vermelho-amarelo, utilizado no viveiro “Flora pau-brasil” para obtenção de mudas de pupunheiras oriundas de sementes, as quais apresentam ótimo desenvolvimento.

O substrato que evidenciou o menor índice de sobrevivência das microplantas de pupunheira foi o constituído por casca de *Pinus*, e embora, em alguns trabalhos (MORAES; CAVALCANTE; FARIA, 2002; SILVA *et al.*, 2003; SKREBSKY; NICOLOSO; MALDANER, 2006) o substrato comercial PlantMax[®] seja citado como o melhor para a aclimatização das microplantas, neste trabalho, tanto o substrato utilizado isoladamente, como o acrescido com vermiculita, apresentaram baixo índice de sobrevivência e a maior incidência de fungos na base do estipe, com conseqüente tombamento (Figura 5). O presente trabalho apresenta resultados contraditórios aos obtidos por Steinmacher *et al.* (2007), que utilizaram o substrato comercial PlantMax[®] na aclimatização de pupunheiras e obtiveram sucesso, entretanto, os autores não citam dados referentes à amostragem, o que não permite inferir que se trata de um resultado totalmente promissor.

Os substratos que apresentaram maior índice de sobrevivência neste experimento foram o latossolo vermelho-amarelo, areia fina e o combinado de areia fina + argila + esterco. Provavelmente, tal fato deve-se as características em comum destes solos, uma vez que, segundo Wraight; Wraight (1998) a porosidade, a capacidade de retenção de água e a aeração do substrato melhoram a arquitetura do sistema radicular, o crescimento da planta e sua adaptação às condições *ex vitro*. Os três substratos são essencialmente constituídos de areia, que segundo Sodre; Cora; Souza Júnior (2007) apresentam como principais vantagens a estabilidade física e a inatividade química, mas por outro lado, tem como inconveniente a baixa retenção de água e nutrientes.

Entretanto, para a pupunheira a não retenção de água no substrato mostrou ser benéfica, pois, embora a área de ocorrência natural desta espécie seja encontrada sob regimes pluviométricos que vão de 1.500 a 6.000 mm por ano, e cultivada com sucesso em regiões com pluviosidade média de 1.700 a 4.000 mm por ano, é fato conhecido que esta palmeira não suporta solos mal drenados (VILLACHICA *et al.*, 1996).

Dentre os três tipos de substratos que apresentaram maior índice de sobrevivência, o solo tipo latossolo vermelho-amarelo foi o que se sobressaiu conforme pode se observar na Figura 3. Esse tipo de solo apresenta baixa fertilidade natural e textura arenosa (82%), sendo característico de solo de floresta, apresentando-se altamente intemperizado (SIOLI, 1985). Segundo Teixeira; Paiva (1997), os solos mais frequentemente utilizados na implantação de pupunheiras oriundas de sementes são latossolo amarelo, podzólico amarelo e o latossolo vermelho escuro, que também são intemperizados (ALLEONI; CAMARGO; CASAGRANDE, 1998).

Com base nos testes preliminares utilizou-se o substrato constituído de latossolo vermelho-amarelo, mantendo-se 25% de água disponível, por meio de irrigações manuais com água destilada. Esse percentual de água foi estabelecido a partir do cálculo da capacidade de campo embasado no trabalho de Ramos; Bovi; Folegatti (2002). Além da pupunha não resistir ao encharcamento do solo, a elevada umidade tanto do substrato quanto do ar, proporciona o desenvolvimento da microbiota fúngica epifítica e endofítica latente, razão pela qual optou-se pela utilização de um plástico removível na estrutura onde as microplantas foram acondicionadas na 2ª etapa de rustificação (Figura 1D), e

Segundo Steinmacher *et al.* (2007) o fator mais importante para o processo de aclimatização de pupunheiras é o ambiente de alta umidade ao qual as microplantas são transferidas. Esse fator, entretanto, gera um dos grandes desafios para a aclimatização desta espécie, uma vez que esse ambiente favorece a proliferação de fungos, fazendo-se necessário o controle constante com fungicidas, o que colabora para a redução da sobrevivência das microplantas.

O ambiente a que as microplantas de pupunheiras foram acondicionadas durante a execução deste trabalho, foi cuidadosamente controlado, sendo tanto a temperatura, quanto a luminosidade, mantidas durante a 2ª etapa (50 dda) sob as mesmas

condições iniciais (*in vitro*), e mesmo com esses cuidados, foi observada a perda de 3 microplantas possivelmente decorrente da manifestação de microrganismos endofíticos latentes, que após o estresse do transplante para as condições *ex vitro*, manifestaram-se como patógenos. Esses microrganismos segundo Hallmann *et al.* (1997), podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfetados superficialmente, e que não causam danos ao hospedeiro, porém a situação de estresse causada pela transferência pode ter colaborado para desencadear a patogenicidade.

As perdas ocasionadas na 2ª etapa de rustificação corroboram com os resultados apresentados por Almeida; Yara; Almeida (2005), os quais atribuíram a perda de plantas micropropagadas no início da cultura ou em seu estabelecimento no campo, principalmente, pela presença de microrganismos endofíticos latentes. Os autores ainda relatam a presença desses fungos em plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo*.

Ao final da 2ª etapa da rustificação, as microplantas foram transferidas para o ripado, onde foi proporcionado um ambiente de baixa irradiação, temperatura amena e umidade controlada por meio de irrigações manuais periódicas. De acordo com Debergh (1991), para o sucesso da aclimatização de microplantas, estes fatores devem ser monitorados cuidadosamente, uma vez que, o ambiente de luz em que a planta cresce é de grande importância, pois a adaptação dessas depende do ajuste do seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade seja utilizada da maneira mais eficiente possível. Por essa razão, o sucesso na adaptação de uma espécie a ambientes com baixa ou alta radiação pode ser baseado na eficácia e na rapidez dos padrões de alocação e comportamento fisiológicos ajustados em ordem, para aumentar a aquisição de recursos em um determinado ambiente (DIAS-FILHO, 1997).

Cabe ressaltar novamente que, o controle da umidade do substrato, bem como do ambiente, é fator limitante para evitar a proliferação de fungos que possam eventualmente se desenvolver, causando lesões severas ou mesmo a morte das microplantas, como se observou na base do estipe e no limbo foliar (Figuras 4 - 6) das plantas cultivadas *ex vitro* e *in vivo*. É importante salientar que as perdas ocasionadas na 3ª etapa de rustificação do processo de aclimatização foram decorrentes da atuação desses patógenos caracterizados morfológicamente como *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., *Helminthosporium* sp. *Phoma* sp., patógenos estes comuns em

pupunheiras e descritos em diversos trabalhos (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALVES; BATISTA, 1983; COSTA NETO, 2002; POLTRONIERI; GASPAROTO; BENCHIMOL, 1999; SANTOS *et al.*, 2001; PIZZINATTO *et al.*, 2001. SANTOS *et al.*, 2004, GOMES; SANTOS, 2004; TESSMANN *et al.*, 2005; MAFACIOLI, 2004). Tais fungos também foram encontrados nas pupunheiras oriundas de sementes (*in vivo*), entretanto, não ocasionaram a morte das mesmas.

Como já mencionado, o estudo da aclimatização de pupunheiras é pouco divulgado, e muitos podem ser os fatores que afetam direta ou indiretamente essa fase. Caprestano *et al.* (2006) testou em seu trabalho diferentes tamanhos de microplantas de pupunheira (menores que 7 cm; entre 7-12 cm; maiores que 12 cm) e a fertirrigação, obteve em média 95% de sobrevivência após 105 dias de aclimatização, no entanto, as microplantas foram mantidas em um mesmo ambiente durante todo esse período, e o número de repetições por tratamento foi relativamente pequeno, ou seja, 5 plantas por tratamento. No entanto, o número de amostras embora, seja estatisticamente significativo, em se tratando de micropropagação de pupunheiras, é demasiadamente pequeno tendo em vista a recalcitrância da espécie.

Mesmo com o declínio do percentual de sobrevivência evidenciado no presente trabalho (Figura 2), pode se considerar que o processo de aclimatização mostrou-se eficiente, quando comparado com as plantas obtidas via semente (*in vivo*), cujo percentual de germinação média é de 70 a 80% (GENNEK, 1977)), uma vez que as plantas que germinam tardiamente (após 8 a 12 meses do início do processo) são geralmente descartadas, pois originam plantas inferiores em desenvolvimento e produção, pois, quanto mais tempo a plântula permanecer nos estádios iniciais de desenvolvimento e demorar a emergir do solo, mais vulnerável estará às condições adversas do meio (MARTINS; NAKAGAWA; BOVI, 1999). A morosidade na germinação das sementes, bem como sua baixa tolerância a perdas de umidade caracterizam a pupunheira como uma espécie recalcitrante (FERREIRA; SANTOS, 1992).

Além da morosidade característica da espécie, por meio da micropropagação, é possível se obter uma produção contínua de mudas, sem a dependência de disponibilidade de sementes no mercado, conseguindo dessa forma produzir o ano todo, mudas micropropagadas. Não obstante, as plântulas cultivadas *in vivo* mesmo

quando oriundas de matrizes inermes selecionadas, apresentam um determinado percentual de plantas com espinhos. Segundo Kalil Filho *et al.* (2002) esse percentual deve ser no máximo de 10%, sendo essas plântulas rotineiramente descartadas pelos viveiristas, que consideram esse percentual bem maior, ocasionando grande prejuízo aos produtores. Por essa razão, a micropropagação torna-se uma importante ferramenta para a multiplicação maciça de matrizes inermes selecionadas.

Dentre as diversas hipóteses para a redução do percentual de sobrevivência de plantas micropropagadas, quando transferidas às condições *ex vitro*, alguns autores atribuem às alterações anatômicas e fisiológicas, principalmente da folha (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO *et al.*, 1999; CALVETE *et al.*, 2002; HARARIKA, 2003), uma vez que, a diferenciação dos tecidos e a plasticidade na anatomia foliar é um fator importante no processo de absorção de luz (BOLHÀR-NORDENKAMPF; DRAXLER, 1993). No entanto, neste trabalho, estruturalmente as folhas apresentaram as mesmas características em todas as condições ambientais, sendo que as microplantas *ex vitro* apresentaram a disposição dos tecidos semelhantes à anatomia das microplantas sob condição *in vitro*, porém com algumas características das plantas cultivadas *in vivo*, corroborando assim, com Donnely; Vidver; Lee (1985), os quais afirmam que as primeiras folhas de plantas micropropagadas caracterizam uma fase de transição.

A epiderme das pupunheiras em todas as condições ambientais analisadas mostraram-se uniestratificadas em ambas as faces, característica comum às palmeiras descritas em trabalhos clássicos de Tomlinson (1961); Glassman (1972); Moore Júnior; Uhl (1982) e Balick; Pinheiro; Anderson (1987).

A fina camada de cutícula presente nas folhas de pupunheira parece ser também uma característica comum à espécie (TOMLINSON, 1961; ATHIE *et al.*, 2004; PEREIRA; DE QUADROS, 2007), pois nas plantas cultivadas *in vivo* essa estrutura apresentou-se pouco desenvolvida (Figura 15E). Segundo Wetstein; Sommer (1983) e Pierik (1990), o menor desenvolvimento da cutícula em condições *in vitro*, pode acarretar na perda de microplantas quando essas são transferidas para as condições *ex vitro*. Sendo assim, embora o pouco desenvolvimento da cutícula seja característico da espécie, esse, entretanto, é extremamente importante para a aclimatização, devido

principalmente, a função da cutícula em proteger a planta contra a perda excessiva de água (CUTTER, 1972). Essa fina e/ou inexistente camada de cutícula das microplantas sob condição *in vitro*, dá-se principalmente ao fato dessas se desenvolverem em um ambiente controlado, sem a necessidade de estimular a formação de uma camada espessa, já que a elevada umidade no interior dos frascos não exige o desenvolvimento dessa estratégia (PREECE; SUTTER, 1991, CALVETE *et al.*, 2002).

Por meio de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 9 e 10), não se observou também, a deposição de cera, tanto nas microplantas (*in vitro*), quanto nas transferidas para as condições *ex vitro*, sendo apenas constatadas nas plantas cultivadas *in vivo*. É importante ressaltar que a deposição de cera epicuticular é de extrema importância para as microplantas em processo de aclimatização, devido a suas características físico-químicas, que podem contribuir para importantes propriedades fisiológicas da cutícula, como o controle da transpiração e hidrofobia (CUTTER, 1972; FERRI, 1999).

Sandoval; Muller; Weberling (1994) ressaltam ainda que, o acréscimo na extrusão de cera epicuticular está diretamente relacionada com a redução da umidade relativa do ar na casa de vegetação, fenômeno este, não observado na espécie estudada, visto que, não houve a deposição de cera em nenhum período do processo de aclimatização.

Em trabalhos clássicos como de Wardle; Dobbs; Schort (1983) e Sutter; Langhans (1982) é relatado que a quantidade reduzida de cera epicuticular esta diretamente relacionada com o aumento na perda de água pela planta, corroborando os resultados obtidos neste trabalho, onde as microplantas consideradas aclimatizadas (*ex vitro* com 180 dda), mesmo com uma condutância estomática inferior às microplantas (*in vitro*), apresentaram uma taxa de transpiração superior (Figura 23). Esse aumento na transpiração, provavelmente deve-se ao reduzido desenvolvimento da cutícula, visto que, as microplantas (*in vitro*), como já mencionado, não necessitam do espessamento dessa estrutura, no entanto, quando transferidas para as condições *ex vitro*, essa estrutura torna-se vital, devido a elevada alteração do ambiente, principalmente em relação a temperatura e umidade relativa do ar.

De acordo com as observações de Sebanek (1992) nas folhas jovens a transpiração cuticular pode constituir de 1/3 a 1/2 da taxa de transpiração total da planta, podendo ocasionar a rápida perda de água das células, resultando no colapso

das mesmas, o que por fim promove uma intensa clorose nas folhas. Tal fato pode ter ocorrido em algumas microplantas transferidas para as condições *ex vitro* (Figura 26), onde a clorose mostrou-se bem diferente da lesão resultante da presença de fungos (Figuras 5 e 6). Não obstante, é importante ressaltar que a taxa de transpiração das microplantas quando retiradas das condições *in vitro*, apresentou uma redução considerável e concomitante com a condutância estomática e com a taxa de fotossíntese líquida (Figura 22).

Segundo Campostrini; Otoni (1996) as plantas produzidas *in vitro* apresentam reduzido fluxo transpiratório em função da elevada umidade relativa e baixa irradiância, pois seus estômatos não são funcionais e tais plantas, ainda, não desenvolveram cera epicuticular. Entretanto, analisando pelo ponto de vista adaptativo, a planta desenvolvida por meio da técnica de micropropagação, pode ser considerada aclimatizada enquanto mantida no tubo de ensaio, por essa razão apresenta, condutância estomática, taxa transpiração e a taxa de fotossíntese, de forma adaptada ao meio a que esta acondicionada. Quando, entretanto, essa planta é transferida para as condições *ex vitro*, ela passa por um intenso estresse, podendo alterar suas características fisiológicas. A condutância estomática, por exemplo, que esta diretamente relacionada com a abertura e o fechamento do ostíolo, determinando dessa forma o limite máximo da taxa de um fluxo de entrada de gás, e afetando diretamente assim, tanto a transpiração quanto a produção de fotoassimilados (LARCHER, 2000).

Segundo Grout (1988) a capacidade fotossintética das plantas mantidas em meio de cultivo asséptico acrescido de sacarose, pode ser agrupada em duas classes: uma primeira, apresentando plantas com folhas que não desenvolvem capacidade fotossintética (heterotróficas), e a segunda classe, compreende as plantas adaptadas para condições autotróficas *in vitro* que, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar uma significativa taxa fotossintética. Nesse aspecto, a pupunha pode ser agrupada na primeira classe, como heterotrófica, visto que, sua atividade fotossintética apresentou-se relativamente inferior, comparada à das plantas *in vivo* e a das microplantas acondicionadas *ex vitro* por 180 dda.

O fechamento dos estômatos, observado através da diminuição da condutância estomática e a queda na taxa de transpiração nas microplantas quando transferidas

para as condições *ex vitro* (Figura 22), corroboram os resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2002) em pupunheiras submetidas a estresse hídrico, indicando a existência de mecanismos de adaptação dessa espécie, no sentido de diminuir as perdas de água. É importante, contudo, ressaltar que tanto a condutância estomática quanto a transpiração aumentaram simultaneamente com o tempo de aclimatização das microplantas às condições *ex vitro*, evidenciando assim um processo de adaptação ao ambiente (Figura 22).

As análises histológicas das plantas estudadas permitiram inferir que em todas as condições ambientais as folhas apresentaram estômatos em ambas as superfícies, podendo assim ser caracterizadas como anfiestomáticas (Figuras 9 e 10). Entretanto, apresentaram maior densidade estomática na face abaxial, sendo por essa razão, melhor denominadas como anfihipoestomáticas, de acordo com Ferri (1999).

Os estômatos ou complexos estomáticos encontram-se dispersos nas nervuras e em todo limbo foliar, constituído de um par de células guardas, um par de células subsidiárias polares menores nas extremidades, e duas outras células subsidiárias paralelas às células-guarda, caracterizando segundo Baranova (1987) estômatos do tipo tetracítico (Figura 11). Padrão esse também observado em outras palmeiras, como *Astrocaryum murumuru* 17 (Rocha *et al.*, 2001), *Syagrus coronata*, *S. microphylla*, *S. flexuosa*, *S. vagans*, *S. harleyi* e *S. werdermannii* (LEITE; SCATEMA, 2001).

Embora a densidade estomática seja considerada um fator de alta plasticidade em decorrência da exposição das plantas a diferentes ambientes, não se observou diferença significativa nesse parâmetro entre a densidade estomática das microplantas sob condição *in vitro* com as mantidas *ex vitro* no decorrer do período de aclimatização. No entanto, houve uma baixa redução na densidade estomática quando se comparou as microplantas sob condição *in vitro* com as microplantas em processo de aclimatização até 90 dda, como se pode observar na Tabela 1. Tal redução da densidade estomática durante o período de aclimatização corrobora com as afirmações feitas por Donnely; Vidaver (1984) e Lee; Wetzstein; Sommer (1985). A explicação segundo Dignart (2006) para esse resultado deve-se ao fato das células epidérmicas, bem como os demais tecidos foliares apresentarem elevada taxa de crescimento e divisão durante o período de aclimatização, e esse crescimento promove a adaptação,

melhorando a funcionalidade dos estômatos e reduzindo sua densidade. Entretanto, aos 180 dda observou-se um aumento considerável na densidade estomática das microplantas mantidas *ex vitro* em relação aos outros períodos de aclimatização (Tabela 1).

Segundo Boardman (1977) e Abrams; Kubiske; Mostoller (1994), a densidade estomática geralmente está correlacionada com as trocas gasosas, uma vez que, o aumento da densidade está associado com a maior condutância estomática. Entretanto, no presente trabalho verificou-se o aumento da condutância estomática (Figura 22), mesmo com a diminuição da densidade de estômatos das microplantas com 90 dda (Tabela 1). Isso se deve provavelmente, ao fato que as microplantas com 50 dda ainda permaneciam no ambiente controlado na sala de crescimento e aos 90 dda essas estavam acondicionadas ao ambiente externo, no sombrite, o qual apresentava grandes oscilações de temperatura e umidade, por essa razão mesmo com uma menor densidade estomática as microplantas apresentaram condutância estomática maior e conseqüentemente maior transpiração que as microplantas com 50 dda.

Aos 180 dda, as microplantas apresentaram resultados considerados intermediários quanto à taxa de transpiração, fotossíntese líquida e número de estômatos, com relação às microplantas sob condição *in vitro* e *in vivo*, porém menor condutância estomática. Todavia, Rocha (2005), ressalta que a densidade estomática não é um parâmetro tão confiável para a verificação da adaptabilidade de microplantas, e que a forma segura de indicar a funcionalidade estomática seria o formato das células guarda e a relação entre o diâmetro polar e equatorial dos estômatos. Essa relação, contudo, não apresentou alteração significativa neste trabalho, uma vez que, as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram diâmetros similares a das plantas em processo de aclimatização, com uma tendência ao aumento tanto no diâmetro equatorial quanto polar, com o tempo de aclimatização (Tabela 1). Um fato interessante é que em todas as condições ambientais os estômatos da face abaxial mostraram-se maiores que os da face adaxial.

Em relação a densidade de estômatos e tricomas foi possível verificar uma relação inversamente proporcional, ou seja, quando a densidade estomática diminuiu a de tricomas aumentou (Tabela 1 e 2). Esse fenômeno pode ser atribuído às funções dos

tricomas, que além de secretar substâncias, protegem a planta contra predadores (FAHN, 1986), podendo também influenciar, indiretamente na economia de água das plantas através da regulação da temperatura pela reflexão da radiação solar que chega até as folhas (SALATINO; MONTENEGRO; SALATINO, 1986; FAHN, 1986).

É importante mencionar que devido à densidade de tricomas ser obtida pelo método de impressão, muitos dos tricomas foram removidos da superfície epidérmica, deixando apenas a impressão de sua cicatriz, impossibilitando dessa forma a correta distinção entre os tipos de tricomas, glandulares ou acúleos, para determinar sua densidade separadamente.

Além do estresse hídrico, outros fatores, como a intensidade luminosa, que afetam a fotossíntese têm um importante papel na aclimatização e sobrevivência das plantas micropropagadas. Vários autores como, Nave; Alvarenga; Oliveira (1994), Dias-Filho (1997); Alvarenga *et al.* (1998); Vilela; Raveta (2000), Campos; Uchida (2002) mencionam que o sucesso na adaptação de uma espécie às diferentes condições de radiação está relacionado com a eficácia e rapidez com que os comportamentos fisiológicos são ajustados.

A maior ou menor plasticidade adaptativa das espécies às diferentes condições de radiação solar depende do ajuste de seu aparelho fotossintético de modo a garantir maior eficiência na conversão da energia radiante em carboidratos e consequentemente favorecer o crescimento da planta. Segundo Liu; Dickmann (1993) a manutenção da integridade do aparelho fotossintético durante o estresse é muito importante, caracterizando a resistência da planta, uma vez que permite a recuperação da fotossíntese após o estresse. Como evidencia a Figura 22, a fotossíntese líquida das microplantas *ex vitro* (50 dda) apresentou uma considerável redução e inconstância, mesmo permanecendo em ambiente semelhante ao da sala de crescimento, onde as microplantas sob condição *in vitro* foram mantidas. Essa redução da fotossíntese, segundo Inoue; Graça; Correa (1998) pode ser atribuída à inibição de algum mecanismo enzimático envolvido na assimilação de carboidratos ou do aparato fotossintético ineficiente, característico do hábito heterotrófico das plantas micropropagadas mantidas *in vitro*, no entanto, com o decorrer do processo de aclimatização, verificou-se uma recuperação gradual da taxa de fotossíntese líquida, em

que aos 90 dda ainda se observava certa desorganização, com saturação em torno de $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotossíntese líquida em torno de $2,00 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 22). Ao fim do processo, as microplantas *ex vitro* (180 dda) apresentaram praticamente o mesmo ponto de saturação das plantas *in vivo*, em torno de $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e fotossíntese líquida, em torno de $3,55 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ contra aproximadamente $1,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ das plantas *in vitro*, evidenciando dessa forma a adaptação das microplantas ao ambiente *ex vitro* (Figura 23).

Segundo Larcher (1995) a capacidade fotossintética em várias espécies de palmeiras, varia de 4 a $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em estudo sobre o comportamento fisiológico de plantas de pupunheiras oriundas de sementes com doze meses de idade, sobre estresse hídrico, Oliveira *et al.* (2002), menciona que as plantas irrigadas apresentam assimilação média de $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, resultado esse, superior ao encontrado neste trabalho, mesmo para as plantas *in vivo*. Entretanto, deve-se levar em consideração que as plantas apresentavam o dobro da idade das plantas estudadas neste trabalho.

A estreita relação entre a capacidade fotossintética das plantas e a concentração de clorofila deve-se a clorofila ser a principal responsável pela captação solar que durante o processo de fotossíntese é convertida em energia química na forma de ATP e NADPH (TAIZ; ZEIGER, 2004). Como já mencionado nos resultados, devido ao método convencional de medir a clorofila das plantas ser de forma destrutiva, neste trabalho foi utilizado o equipamento SPAD o qual permite a avaliação indireta do teor de clorofila nas plantas e tem sido usado como uma forma auxiliar para a avaliação da nutrição nitrogenada das culturas diretamente no campo, pela leitura da reflectância do verde, expressando o resultado em valor de unidades SPAD (MINOLTA, 1989).

Devido não haver até o momento trabalhos que relatem a calibração do equipamento SPAD, para a pupunha, bem como para outras palmeiras, foi necessária a análise prévia que evidenciou um coeficiente de correlação considerável, $R^2 = 0,64$ (Figura 24), comprovando assim que os valores de SPAD podem ser utilizados para estimar com precisão o teor de clorofila para a espécie *Bactris gasipaes*.

Sendo a atividade fotossintética das plantas dependente da capacidade da folha em absorver luz (SALLA; RODRIGUES; MARENCO, 2007), a determinação dos teores de clorofila da folha mostrou-se de grande importância nesse trabalho, uma vez que,

segundo os autores Dalton; Street (1977), Solís *et al.*(1989), Gro *et al.*(1993), em muitos casos, as microplantas sob condição *in vitro* não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar a fotossíntese, por razão do ambiente a que estão acondicionadas.

Embora o teor de clorofila encontrado nas microplantas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, não tenha apresentado diferença estatística com as demais condições ambientais, no esquema gráfico da Figura 25, pode-se observar que os valores SPAD foram menores que das demais condições de cultivo, com valores muito próximos ao das microplantas acondicionadas *ex vitro* por 50 dda. Corroborando a afirmação de Grout; Aston (1978), que plantas micropropagadas recém transplantadas para ripado, apresentavam baixos níveis de clorofila.

Romano; Noronha; Martins-Loução (1995); Van Huylenbroeck *et al.* (1998), afirmam que a pigmentação das folhas de plantas cultivadas *in vitro*, pode apresentar tonalidades de verde mais claro que as plantas *in vivo*, o que se comprova através do menor valor de SPAD, conseqüentemente menor teor de clorofila (Tabela 5).

Observou-se, no entanto, que com o decorrer do processo de aclimatização o teor de clorofila aumentou gradativamente, evidenciando nas microplantas com 180 dda praticamente o mesmo teor das plantas *in vivo* (Tabela 5), fato esse que confirma as afirmações feitas por Pospisilova *et al.* (1999), que é comum o acréscimo no conteúdo de clorofila nas microplantas durante a aclimatização, dependendo das condições ambientais em que essas são mantidas.

Segundo Sandoval; Muller; Weberling (1994), durante a aclimatização das plantas, sob aumento gradual de luminosidade, as folhas adquirem a coloração mais intensa verde-escuro, devido ao acréscimo no conteúdo de pigmentos e à diferenciação do mesofilo.

O mesofilo das pupunheiras em todas as condições de cultivo mostrou-se homogêneo, com células uniformes e compactas, em média com quadro camadas de células, distinguindo-se apenas em células de parênquima lacunoso (Figura 15). Em alguns trabalhos, entretanto, os autores descrevem como sendo constituído de parênquima paliçádico o mesofilo de outras espécies da família Arecaceae (TOMLINSON , 1961; DE PAULA, 1975, UZZO, 2008).

As fibras dispersas pelo mesofilo, segundo Tomlinson (1961) e Glassman (1972), são de grande importância taxonômica, de acordo com sua frequência e distribuição, sendo comuns em palmeiras e marcante para cada espécie. Tais fibras foram denominadas como fibras não vasculares (fibras gelatinosas), e por meio de teste histoquímico com dupla coloração com azul de astra e fucsina básica, foi constatado que essas fibras eram constituídas de celulose e não de lignina como as fibras encontradas junto aos feixes vasculares (Figura 18).

As paredes secundárias das fibras gelatinosas são formadas de camadas parcial ou completamente por celulose, apresentando uma grande capacidade de absorver água. Segundo Esau (1959); Beiguelman (1962), essas fibras constituem-se de uma adaptação a condições de estresse, como falta de água ou deficiência de luminosidade, e atuam na força de tração da planta como resistência a ventos e chuvas fortes. Paviani (1978) mencionou que estas fibras podem estar relacionadas principalmente com o armazenamento de água, fato este perfeitamente compatível com a condição de aclimatização a que as microplantas foram submetidas.

Os feixes vasculares apresentaram diferentes tamanhos em todas as condições de cultivo (Figura 20), sendo que os de maior porte constituíram as nervuras e apresentavam-se com a maior saliência voltada para a face adaxial (Figura 20c e 21), fato esse também descrito por Leite; Scatema (2001), para as espécies *Syagrus harleyi*, *S. microphylla*, *S. vagans*, *S. werdermannii*, *S. coronata* e *S. flexuosa*. Corroborando também os resultados obtidos por Pereira; De Quadros (2007), os quais descreveram que a espécie *B. gasipaes* apresenta unidades vasculares com formato arredondado e tamanhos que variam entre pequenos a grandes. Segundo Tomlinson (1990) os feixes menores estão associados à sustentação (Figura 20A), enquanto que os feixes maiores (20C e 21), com várias células de xilema e floema estão relacionados à condução.

Os feixes vasculares de maior porte, foram classificados como bicolaterais, devido o floema apresentar-se em dois blocos separados. Steinmacher (2007) e Pereira; De Quadros (2007) classificam o feixe vascular de pupunheiras como colateral, entretanto, deve-se considerar o estágio de desenvolvimento da planta e da parte constituinte da folha, uma vez que os autores supracitados analisaram plantas no início de desenvolvimento *in vitro* e a bainha de folhas adultas, respectivamente.

Tomlinson (1961) menciona que apenas os feixes de grande e médio porte possuem o floema dividido, sendo menos comuns os de mais de dois blocos de floema no mesmo nível do elemento de metaxilema. Esses feixes de grande e médio porte, observados pelo autor, também foram observados nas folhas das espécies da família *Arecaceae*, *S. harleyi*, *S. microphylla*, *S. vagans* e *S. werdermannii*, com exceção de *S. coronata* e *S. flexuosa*, nos quais os feixes de pequeno e médio porte não possuem o floema dividido.

Segundo Pereira; De Quadros (2007) em *B. gasipaes* o xilema geralmente apresenta-se composto de vários elementos de metaxilema tardio em diferenciação, vários elementos de metaxilema precoce e protoxilema, em parte obliterado, e de acordo com Baas (1982) e Alves; Angyalossy-Alfonso (2000) os fatores ambientais que afetam as dimensões e até mesmo o arranjo dos elementos vasculares, são relativos a algum tipo de estresse como, por exemplo, quando transferida para as condições *ex vitro*.

El-Bahr *et al.* (2004) verificaram que *Phoenix dactylifera* L. cv. Zaghlool, obtida por micropropagação, apresentaram o tecido vascular menos desenvolvido e com menor diferenciação que aquelas cultivadas *in vivo* e *ex vitro*. Essa característica não foi verificada neste trabalho, pois os feixes mostraram-se semelhantes em todas as condições de cultivo, sendo que na planta *in vivo* a área de tecido vascular presente na lâmina foliar foi a que se mostrou maior (Tabela 2).

Externamente aos elementos condutores, observou-se a presença de fibras esclerenquimáticas, sendo denominadas fibras vasculares, que de acordo com Tomlinson (1961), essas fibras internas à endoderme são lignificadas e funcionam como um reforço ao feixe vascular.

Por meio das análises anatômicas e fisiológicas das folhas de pupunheiras, foi possível constatar que a espécie apresenta respostas adaptativas às mudanças das condições *in vitro* para *ex vitro* e que tais alterações não afetaram significativamente o estabelecimento do protocolo de aclimatização. Embora o protocolo evidencie ao término da 3ª etapa de rustificação 30% de perdas, o mesmo pode ser considerado viável, sendo importante ressaltar que essas não foram decorrentes do processo de

rustificação das microplantas ao ambiente *ex vitro* e sim da ação de fungos, endofíticos latentes e/ou saprofíticos.

Um dos principais fatores para o sucesso da aclimatização é o controle da umidade do ambiente durante as primeiras etapas de rustificação, sendo este responsável pelo estabelecimento das microplantas, onde os estômatos são considerados não funcionais em condições *in vitro*. Dessa forma, salienta-se que logo após o transplante para as condições *ex vitro*, é de vital importância a manutenção da umidade relativa do ar e do substrato a fim de evitar o colapso das células em decorrência da excessiva transpiração das microplantas. Todavia, a elevada umidade, propicia a ocorrência de fungos saprofíticos, principais responsáveis pela perda das microplantas.

O latossolo vermelho-amarelo proporcionou boa retenção de água, sem encharcamento, o que fatalmente ocasionaria o apodrecimento da raiz. Além desse fator a drenagem e aeração do substrato permitiram a manutenção do nível de água e oxigenação adequados para suprir a não funcionalidade dos estômatos logo após o transplante.

As análises fisiológicas das microplantas apresentaram nas primeiras etapas de rustificação uma significativa redução na condutância estomática, consequentemente na taxa de transpiração e de fotossíntese evidenciando uma estratégia contra a perda excessiva de água. Todavia, no decorrer das etapas de rustificação das microplantas observou-se um aumento gradativo destes fatores, podendo-se assim dizer que a alta umidade relativa do ar e do substrato, bem como o tipo de substrato e o tratamento preventivo e constante contra fungos são fundamentais para a aclimatização de pupunheiras.

6 CONCLUSÕES

- O substrato latossolo vermelho-amarelo, bem como a elevada umidade relativa do ar e do solo, são fundamentais para o estabelecimento das microplantas às condições *ex vitro*;
- O tratamento profilático com aplicações constantes de fungicidas é fundamental para minimizar a incidência de fungos endofíticos latentes e/ou saprofíticos;
- Os aumentos na espessura do mesofilo e nas fibras vasculares, evidenciam respostas adaptativas das microplantas às condições *ex vitro*;
- A diminuição da condutância estomática e a queda na taxa de transpiração das microplantas transferidas para o ambiente *ex vitro* (1ª etapa de rustificação), evidenciam o mecanismo de restrição à perda de água em pupunheiras;
- O aumento gradativo do teor de clorofila e a recuperação da fotossíntese no processo de aclimatização evidenciam o mecanismo de adaptação desta espécie as condições *ex vitro*;
- A ação de fungos endofíticos e/ou saprofíticos na base do estipe é a causa do tombamento das microplantas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, M.D.; KUBISKE, M.E.; MOSTOLLER, S. A. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. **Ecology**, Washington, v.75, n.1, p.123-133, 1994.
- AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBÊLO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, n.4, p.755-758, 1980.
- ALLEONI, L.R.F.; CAMARGO, O.A.; CASAGRANDE, J.C. Isotermas de langmuir e de freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.3, p.379-387, 1998.
- ALMEIDA, C.V.; YARA, R. ; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápice caulinar de pupunheira cultivados *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.40, n.5, p.467-470, 2005.
- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “*in vitro*” para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 75p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from peijibaye adultplant leaf primordia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 8, p. 215-217, 1996.
- ALVARENGA, A.A. de; CASTRO, E.V.M. de; GAVILANES, M.L.; BLANK, A.F.; CAMOLESI, A.A. Desenvolvimento de mudas de guarea (*Guarea guidonea* (L.) Sleumer) sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Daphne**, Belo Horizonte, n. 3, p. 22-26, 1998.
- ALVES DE BRITO, C.J.F.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.39, p.949-951, 1996.
- ALVES, E.S.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Ecological trends in the wood of some Brazilian species 1: growth rings and vessels. **IAWA Journal**, Leiden, v.21, p.3-30, 2000.
- ALVES, M.L.B.; BATISTA, M.F. Ocorrência de antracnose em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em Manaus. **Acta Amazônica**, Manaus, v.13, n.3/4, p.705, 1983.
- ANGELO, P.C. da S.; LEAL, M.L.; GOMES, K.K.P. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos provenientes de variedades brasileiras de coco (*Cocos nucifera* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.8, p.66-72, 2003.

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; BORTOLINI, C.G.; FORSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M.L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.13, p.158-167, 2001.

ARIAS, O.; HUETE, F. Propagación vegetativa *in vitro* de pejobaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Revista interamericana de ciencias agrícolas**, Turrialba, v.33, p.103-108, 1983.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v.24, n. 1, p.1-15, 1949.

ASHBURNER, G.R.; FAURE, M.G.; TOMLINSON, D.R.; THOMPSON, W.K. **A guide to the zygotic embryo culture of coconut palms (*Cocos nucifera* L.)**. Canberra: Aciar, 1995. 16p. (ACIAR. Technical report series, 36).

ASSY-BAH, B.; DURAND-GASSELIN, T.; PANNETIER, C. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v.71, p.4-10, 1987.

ATHIE, S.M.; GAI, C.S.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Avaliação histológica em microscopia óptica e eletrônica de varredura em plantas de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) micropropagadas. In: XII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP), 2004, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: 2004. 153 p.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. de (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p.117-137.

AZEVEDO, J.L., MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W.L. Importância dos microrganismos endofíticos na agricultura. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, Passo Fundo, v.11, p.333-371, 2003.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.3, n.1, p.40-65, 2000.

BAAS, P. **New perspectives in wood anatomy**: Systematic, phylogenetic and ecological wood anatomy - History and perspectives. Leiden: The Hague Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p.23-58.

BALICK, M.J.; PINHEIRO, C.U.B.; ANDERSON, A.B. Hybridization in the babassu palm complex: I. *Orbignya phaleratha* x *O. eichleri*. **American Journal of Botany**, New York, v.74, n7, p.1013-1032, 1987.

BARANOVA, M.A. Historical development of the present classification of morphological types of stomates. **The Botanical Review**, Lancaster, v.53 p.53-79, 1987.

BEIGUELMAN, B. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.34, p.293-305, 1962.

BENTES-GAMA, M.M.; SILVA, M.L.; VILCAHUAMÁN, L.J.M.; LOCATELLI, M. Análise econômica de sistemas agroflorestais na Amazônia ocidental, Machadinho d'Oeste-RO. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.3, 2005.

BERGO, C.L.; LUNZ, A.M.P. **Cultivo da pupunha para palmito no Acre**. Rio Branco: Embrapa-Acre, 2000. 15p. (Embrapa Acre, Circular Técnica, 31).

BERNARDO, S. **Manual de irrigação**. 6. ed. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1995. 657p.

BEZERRA, F.C.; ROSA, M.F. **Utilização do pó da casca de coco-verde como substrato para produção de mudas de alface**. Fortaleza Embrapa-Agroindústria Tropical, 2002. 4p. (*Comunicado Técnico*, 71).

BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. *In*: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER. **Encyclopedia of plant physiology**: New Series. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v.12a, p.57-107.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; DRAXLER G.. Functional leaf anatomy. *In* HALL, D.O. *et al.* (Ed.). **Photosynthesis and production in a changing environment: A field and laboratory manual**. London: Chapman and Hall, 1993. p.91-112.

BONACCINI, L.A. **Produza Palmito: a cultura da pupunha**. Cuiabá: SEBRAE, 1997. 96p. (SEBRAE. Coleção agroindústria).

BOSA, N.; CALVETE, E.O.; KLEIN, V.A.; SUZIN, M. Crescimento de mudas de *gipsofila* em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.514-519, 2003.

BOSABALIDIS A.M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, Bostock. v.163, p.375-379, 2002.

BOVI, M.L.A. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.3, n.15, p.183-185, 1997.

BOVI, M.L.A. **Palmito de pupunha: informações básicas para o cultivo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 50p. (IAC. Boletim Informativo, 173).

BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, 109-112, 2004.

BOYER, J. S. G. Recovery of photosynthesis in sunflower after a period of low water potencial. **Plant Physiology**, Rockville, v.47, p.816-820, 1971.

BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In: Caspary, E.M.; Thoday, J.M. (Ed.). **Advances in Genetics**. New York: Academic Press, 1965. p.115-155.

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of Aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, 1981.

BUDDENDORF-JOOSTEN, J.M.C.; WOLTERING, E.J. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.15, p.1-16, 1994.

BUKOVAC, M.J.; PETRACEK, P.D.; FADER, R.G.; MORSE, R.D. Sorption of organic compounds by plant cuticles. **Weed Science**, Ithaca, v.38, n.3, p.289-298, 1990.

CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv Campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Passo Fundo, 1998.

CALVETE; E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M.H.; SUZIN, M. Anatomic analyses and biomass of strawberry plants cultivated *in vitro* and *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.649-653, 2002.

CAMACHO, E.; SORIA V., J. Palmito de pejibaye. Proceedings of the Tropical Region. **American Society for Horticultural Science**, Washington , v.14, p.122-132, 1970.

CAMPOS, M.A.A.; UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.3, p.281-288, 2002.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. **Aclimatização de plantas**: abordagens recentes. Brasília: Embrapa-CNPq, 1996. 12p. (ABCTP notícias, 25).

CAPRESTANO, C.A.; PAZ, M.R.; STEINMACHER, D.A.; DOS REIS, M.S.; GUERRA, M.P. Aclimatização de plântulas micropropagadas de pupunha (*Bactris gasipaes* KUNTH). In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC, 2006. 151 p.

CARRERA, L. Isolation and Characterization of Pejibaye Starch. **Journal of Applied Botany**, New Jersey, v.73, n.3/4, p.122-127, 1999.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE M.J. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas "*in vitro*". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p.483-490, 1999.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: CJUP/Museu Goeldi, 1991. 279p.

CHAIMSOHN, P.F. Cultivo de pupunha para palmito. Importância, Mercado e aspectos biológicos e agrônômicos In: Curso sobre cultivo, processamento e comercialização de palmito de pupunha. 2001 Londrina. **Resumos...** Londrina:IAPAR, 2001. p.7-69.

CHIN, H.F.; ROBERTS, E.H. **Recalcitrant crop seeds**. Kuala Lumpur: Tropical, 1980. 152p.

CLEMENT, C.R.; BOVI, M.L.A. Melhoramento genético da pupunheira: conhecimentos atuais e necessidades. In: SEMINÁRIO DO AGRONEGÓCIO DE PALMITO DE PUPUNHA NA AMAZÔNIA, 1999. Porto Alegre. **Anais...** Porto Velho: Embrapa Rondônia, 1999. 93 p.

CLEMENT, C.R.; CHÁVEZ FLORES, W.B.; MOREIRA GOMES, J.B. Considerações sobre a pupunha como produtora de palmito. In: 1º ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES EM PALMITO, 1988, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CNPF/IAPAR/IAC, 1988. p.225-247.

CLEMENT, C.R.; MANSHARDT, R.M. A review of the importance of spines for pejobaye heart-of-palm production. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.83, p.11-23, 2000.

COSTA NETO, P.Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* KUNTH) e caracterização por marcadores moleculares**. 2002, 86p. Dissertação (Mestrado em genética e evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

COSTA, L.C.; MORISON, J.I.L.; DENNETT, M.D. Carbon balance of growing faba bean and its effect on crop growth: experimental and modeling approaches. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.4, p.11-17, 1996.

COUTO, L.; DANIEL, O.; ALMEIDA, A.E.; PINHEIRO, A.L.; VERVLOT, F.B.; SOUZA, A.C.G **A cultura da pupunha para produção de palmito**: Sistema de produção e processamento industrial. Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa: UFV, 1999. 34p. (Documento, 20).

CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal. 2. ed.** Parte 2: Órgãos, experimentos e interpretação, Tradução de Gabriela Vera Maria Caruso Catena. 2 São Paulo: Roca, 1987. 336p.

DALE, J. E. How de leaves grow. **BioScience**, Washington, v.42, p.423-432, 1992.

DALTON, C.C.; STREET, H.E. The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacea oleracea* L.) cells. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.10, p.157-164, 1977.

DE GUZMAN, E.V.; DEL ROSARIO, A.G. The growth and development of Makapuno coconut *in vitro*. **Philippine Agriculturist**, Laguna, v.48, p.82-94, 1964.

de pupunha (*Bactris gasipaes* KUNTH). In: 58ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC, 2006. 151 p.

DEBERGH, P.C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.289, p.291-300, 1991.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.

DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. typica Cramer. **Bragantia**, Campinas, v.16, p.315-366, 1957.

DEENIK, J.; ARES, A.; YOST, R.S. Fertilization response and nutrient diagnosis in peach palm (*Bactris gasipaes*): a review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.56, p.195-207, 2000.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures**. Saint-Paul-lez-Durance: Centre d'études de Cadarache, 1995. p.145-160.

DIAS-FILHO, M.B. Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. To contrasting light environments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.8, p.789-796, 1997.

DIGNART, S.L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas**. 2006. 132p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2006.

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

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

DRUART, P. La micropropagation en arboriculture fruitiere. **Le Fruit Belge**, Liege, v.49, n.396, p.292-8, 1981.

EL-BAHR, M.K., ALI, Z.A.; SAKE, M.M. Acomparative anatomical study of date palm *in vitro* plants. **Arab Journal of Biotechnology**. Cairo v.7, p.219-228. 2004.

ELLIS, R.P. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section. **Bothalia**, Pretoria, v.12, p.65-409, 1976.

ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A. Background on the development and implementation of the coconut embryo in vitro culture project. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A.; OLIVER, J. (Ed.). **Coconut embryo in vitro culture**. Malaysia: IPGRI-APO, 2002. v.2. p.1-4.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

ESAU, K. **Anatomía vegetal**. Barcelona: Ediciones Omega, 1959. 729p.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2nd ed. New York: John Wiley , 1977. 550p.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4.th ed. Oxford: Pergamon Press, 1990. 588p.

FAHN, A. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. **Annals of Botany**, Oxford, v.57, p.631-637, 1986.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 3rd. ed. New York: Longnon Science and Technology, 1989. 438p.

FERNANDES, C.; CORÁ, J. E. Caracterização físico-hídrica de substratos utilizados na produção de mudas de espécies olerícolas e florestais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 469-471, 2000. Suplemento.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998. p.183-260.

FERREIRA, S.A.N. A cultura da pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.9, p.23-28, 1987.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazonica**, Manaus. v.22, p.303-307, 1992.

FERREIRA, S.A.N.; CLEMENT, C.R.; RANZANI, S.S.C. Contribuição para o conhecimento do sistema radicular da pupunha (*Bactris gasipaes* h.b.k., Palmae). II. Solo latossolo, textura argilosa **Acta Amazônica**, Manaus, v.25, n.3/4, p. 161-170, 1996.

FERREIRA, S.A.N.; CLEMENT, C.R.; RANZANI, G.; COSTA, S.S. Contribuição ao conhecimento do sistema radicular da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth, Palmae). II. Solo Latossolo Amarelo, textura argilosa. **Acta Amazônica**, Manaus, v.25, n.3/4, p.161-170, 1995.

FERRI, M.G. **Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)**. 9.ed. São Paulo: Editora Nobel, 1999. 113p.

FUZETO, A.P.; LOMÔNACO, C. Potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (Meliaceae) e seu papel na formação de ecótipos em área de cerrado e vereda. **Revista Brasileira de Botânica**, Uberlândia, v.23, p.169-176, 2000.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture; Part 2 in practice**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

GLASSMAN, S. F. Systematic studies in the leaf anatomy of palm genus *Syagrus*. **American Journal of Botany**, New York, v.59, n.8, p.775-788, 1972.

GOMES, P.C.L.; SANTOS, A. F. DOS. Seleção de bactérias antagonistas a *Colletotrichum gloesporioides* da pupunha (*Bactris gasipaes*). In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 3., 2004, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2004. p. 1 CD-ROM. Embrapa Florestas. Documentos 102.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/Embrapa, 1998. p.83-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. p.99-170.

GRO, U.; GILLES, F.; BENDER, L.; BERGHÖFER, P.; NEUMANN, K. The influence of sucrose and an elevated CO₂ concentration of photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.33, p.143-150, 1993.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets “*in vitro*” and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**, Leuven, n.230, p.129-134, 1988.

GROUT, B.W.W. Wax development on leaf of *Brassica oleracea* var. *curvawong* regenerated from meristem culture. **Plant Science Letters**, Limerick, v.5, p.401-405, 1975.

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

GUERREIRO, L. F. **Estudo de Mercado 01/02, mar. 2002 - Palmito de pupunha**. Bahia: Desenhahia, 2002. 14p.

GUIMARÃES, T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V., V.H.; MONNERAT, P.H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. **Bragantia**, Campinas, v.58, n.1, p.209-216, 1999.

- HALLMAN, J.A.; QUADT-HALMANN, W.; MAHAFFEE, F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.895-914, 1997.
- HARARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.
- HARTLEY, C.W.S. **The Oil palm**. 2nd ed. London: Longman, 1977. 806p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 642p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T. Propagación de plantas: principios y prácticas. 5.th ed. Mexico: Continental, 1997. 760p.
- HOFFMANN, A; PASQUAI, M.; CHALFUN, N.N.J; FRÁGUAS, C.B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.2, p.462-467, 2001.
- HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial**: propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.
- HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.24, p.519-570, 1973.
- 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 cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.
- INOUE, M.T.; GRAÇA, M.E.C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.36, p.71-77, 1998.
- JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.63, p.1262-1265, 1985.
- KALIL FILHO, A.N.; SANTOS, A.F DOS; NEVES, E.J.M.; KALIL, G.P.C.; SILVA, V.F.O. Presença/ausência de espinhos em progênies de pupunha (*Bactris gasipaes*) do projeto RECA como fonte de sementes. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v.44, p.127-132, 2002.
- KÄMPF, A.N. **Produção comercial de mudas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 254p.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI, 1999. v.2, p. 519-531.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2. ed. Piracicaba: NAP/MEPA ESALQ, 1999. 48p.

KRAMER, T.; KOSLOWSKI, T. **Physiology of woody plants**. New York: Academic Press, 1979. 811p.

KULCHETSCKI, L.; CHAIMSOHN, F.P.; GARDINGO, J.R. **Palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). A espécie, cultura, manejo agrônomo, usos e processamentos**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2001. v.1, 148p.

LA ROSA, P.C.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.279-286, 1984.

LAKSO, A.N.; REISH, B.I.; MORTENSEN, J.; ROBERTS, M.H. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro* propagated grapevines after transfer from culture. **Journal American Society of the Horticultural Science**, Geneva, v.11, p.634-638, 1986.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 319p.

LEE, H.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. **Plant Physiology**, Maryland, v.78, p.637-641, 1985.

LEES, R.P.; EVANS, E.H.; NICHOLAS, J.R. Photosynthesis in clematis, "The President", during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.42, p.605-610, 1991.

LEITE, K.R.B.; SCATENA, V.L. Anatomia do segmento foliar de espécies de *Syagrus* Mart. (Arecaceae) da Chapada Diamantina. **SITIENTIBUS – Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v.1, n.1, p.3-14, 2001.

LIMA, W.P. **Impacto ambiental do eucalipto**. São Paulo: EDUSP, 1996. 301p.

LIU, C.H.; DICKMANN, D.I. Responses of two hybrid clones to flooding, drought, and nitrogen availability. II. Gas exchange and water relations. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.71, p.927-938, 1993.

MacCLELLAND, M.T. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.23, p.115-123, 1990.

- MAFACIOLI, R., TESSMANN, D.J., SANTOS, A.F.; VIDA J.B. Caracterização morfo-fisiológica e patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 113-117. 2006.
- MARENCO, R.A.; GONÇALVES, J.F.C; VIEIRA, G. **Tree Physiology** , Victoria, v.21, p.1311-1318, 2001.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F.. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa: Editora UFV, 2005 451p.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annals of Botany**, London, v.62, p.663-670, 1988.
- MARQUES, P.A.A.; COELHO, R.D. Economic viability study of the pupunha crop (*Bactris gasipaes* H.B.K.) irrigation for Ilha Solteira - SP, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p.291-297, 2003.
- MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M.L.A. Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de Palmito-Vermelho (*Euterpe espirotosantensis* Fernandes – Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.21, n.1, p.164-173, 1999.
- MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M.7, M.9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruti- cultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.11-19, 2001.
- MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: The Benjamin Cummings Publishing, 1988. 560p.
- MERCIER, H., KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Dyckia macedoi* - an endangered endemic brazilian bromeliad. **Botanic Gardens Micropropagation News**, São Paulo, v.1, n.6, p.70-72, 1993.
- MINOLTA, C. **Manual for chlorophyll meter SPAD-502**. Osaka: Minolta Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22p.
- MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Lancaster, v.80, p.808-811, 1990.
- MONTEITH, J.L. Climate and the efficiency of crop production in Britain. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v.281, p.277-294, 1977.
- MOORE JÚNIOR, H.E.; UHL, N.W. Major trends of evolution in palms. **Botanical Review**, Lancaster, v.48, n.1, p.1-69, 1982.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400, 2002.

MORALES, A.L.; VARGAS, H.S. Observaciones sobre la distribución radical del Pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) para palmito en un Andosol. **Revista de la Corporación Bananera Nacional**, Guacimo, v.14, n.34, p.9-15, 1990.

MORA-URPI, J. Polinización en *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae): nota adicional. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v.30, p.174-176, 1982.

MORA-URPI, J. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): Origen distribución geográfica y manejo agronómico. In: **Palmeras poco utilizadas de América Tropical**. 1983. Turrialba: FAO/CATIE, 1984. p.118-160.

MORA-URPI, J. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): Origen distribución geográfica y manejo agronómico. In: **Palmeras poco utilizadas de América Tropical**. Turrialba: FAO/CATIE, 1983. p.118-160.

MORA-URPI, J.; C.R. CLEMENT. Aspectos taxonómicos relativos al pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) {Taxonomic aspects of pejibaye}. **Revista de Biología Tropical**, San Jose, v.29, n.1, p.139-142, 1981.

MORA-URPI, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth {Pupunha}. **Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Rome: IPK/IPGRI, 1997. 83p.

MOREIRA GOMES, J.B.; ARKCOLL, D.B. Estudos iniciais sobre a produção de pupunha (*Bactris gasipaes*) em plantações. In: Primeiro ENCONTRO DE PESQUISADORES EM PALMITO, 1. Centro Nacional de Pesquisas Florestais/EMBRAPA, 1988. Curitiba, **Anais....** Curitiba, 1988. p. 271-277.

MOREIRA, M.A.; CHRYSTIANE, B.F.; CARVALHO, J.G. de; PASQUAL, M.; SILVA, A.B. da. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Perola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, p.875-879, 2006.

MORERA MONGE, J.A. **Descripción sistemática de la “Colección Panamá” de Pejibaye del CATIE**. Turrialba: CATIE, 1981. 146p.

MORRETES, B.L.; FERRI, M.G. Contribuição ao estudo da anatomia de folhas de plantas do cerrado. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP**. São Paulo, v.16, p.7-70, 1959.

MOTA, A.M. da. **Efeitos de patógenos sobre a “Síndrome da Queda de Frutos” de Pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth)**. 1994. 50p. Dissertação (Mestrado Ciências de florestas tropicais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas, Manaus, 1994.

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p.19-40.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-66, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NAVES, V.L.; ALVARENGA, A.A. de; OLIVEIRA, L.E.M. de. Comportamento estomático de mudas de três espécies florestais submetidas à diferentes níveis de radiação fotossinteticamente ativa. **Ciência e Prática**, Lavras, v.18, n.4, p.408-414, 1994.

NETTO, A.T.; CAMPOSTRINI, E., OLIVEIRA, J.G., YAMANISHI, O.K. Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.3, p.203-210, 2002.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro. *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.

NOGUEIRA, O.L.; CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; CARVALHO, C.J.R. de; GALVÃO, E.U.P.; SILVA, H.M.; RODRIGUES, J.E.L.F.; CARVALHO, J.E.V. de; OLIVEIRA, M. do S.P. de; ROCHA NETO, O.G. de; NASCIMENTO, W.M.O. do. **A cultura da pupunha**. Brasília: EMBRAPA, 1995. p.16-24. (Coleção Plantar, 25).

NOGUEIRA, R.J.M.C. **Expressões fisiológicas da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.)**. 1997. 205p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1997.

OLIVEIRA, M.A.J. DE, BOVI, M. L.A., MACHADO, E.C., GOMES, M.M.A.; HABERMANN, G.; RODRIGUES, J.D. Photosynthesis, stomatal conductance and transpiration in peach palm under water stress. **Scientia agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.59-63, 2002.

PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEM, P.W.; TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* and Doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, p.135-142, 1996.

PANDEY, S.; KUSHWAHA, R. Leaf anatomy and photosynthetic acclimation in *Valeriana jatamansi* L. grown under high and low irradiance. **Photosynthetica**, Praga, v.43, n.1, p.85-90, 2005.

PAULA, J.E. Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (Palmae da Amazônia). **Acta Amazonica**, Manaus, v.5, n.4, p.265-278, 1975.

PAVIANI, T.I. Anatomia vegetal e cerrado. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.30 p.1076-1086, 1978.

PEIXOTO, M.J.A.; CARNEIRO, M.S.S.; SOUZA, P.Z.; DINIZ, J.D.M.; SOUTO, J.S.; CAMPOS, F.A.P. Desenvolvimento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., em diferentes substratos, após micropropagação *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.17-20, 2006.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. DE L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.12, p.135-145, 2000.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. Baixa temperatura para explantes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' *in vitro* durante a aclimatização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.2, p.401-405, 2001.

PEREIRA, R.A.; DE QUADROS, K.E. *Euterpe edulis* Mart. e *E. oleracea* Mart. (Arecaceae): identificação pela análise de palmitos em conserva. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 333-335, 2007

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

PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; FEICHTENBERG, E.; SPIERING, S.H. Ocorrência da podridão do estipe em pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, p.363-365, 2002.

POLTRONIERI, L.S.; GASPAROTO, L.; BENCHIMOL, R.L. Doenças da cultura da pupunheira. In: DUARTE, M.L.R. **Doenças de plantas no trópico úmido Brasileiro**. I. Plantas industriais. Belém: EMBRAPA, 1999. p.209-217.

POMPELLI, M. F. **Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachia* Hassler**. 2002, 93p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

POSPÍSILOVÁ, J.; HASEL, D.; SYNKOVA, H.; CATSKY, J.; WILHELMOVÁ, N.; PLZÁKOVÁ, S.; PROCHÁRKOVÁ, D.; SRÁMEK, F. Photosynthetic pigments and gas exchange during ex vitro acclimation of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, p.125-133, 2000.

POSPÍSILOVÁ, J.; SOLAROVÁ; CATSKY, J. Photosynthetic responses to stress during *in vitro* cultivation. **Photosynthetica**, Praga, v.26, p.3-18, 1992.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, **Biologia Plantarum**, Prague, v.42, n.4, p. 481-497, 1999.

POZZA, E.A.; SOUZA, P.E.; CASTRO, H.A; POZZA, A.A.A. Frequência da ocorrência de doenças de plantas na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.1002-1006, 1999.

PREECE, F.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micro propagated plants to the greenhouse and field. *In*: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.

PROCÓPIO, S. de O.; SILVA, E.A.M. da; SILVA, A.A. da; FERREIRA, E.A. **Anatomia foliar de plantas daninhas do Brasil**. Viçosa: UFV, 2003. 118p.

PURQUERIO, L.F.V.; CECÍLIO FILHO, A.B. Concentração de nitrogênio na solução nutritiva e número de frutos sobre a qualidade de frutos de melão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.831-836, 2005.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres/Potafos, 1991. 343 p.

RAMOS, A.; BOVI, M.L.A.; FOLEGATTI, M.V. Desenvolvimento vegetativo da pupunheira irrigada por gotejamento em função de diferentes níveis de depleção de água no solo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.28-33, 2002.

RILLO, E.P.; PALOMA, M.B.F. *In vitro* culture of Makapuno coconut embryos. **Coconuts Today**, [s.l.], v.9, p.90-108, 1992.

ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira 'prata anã': alterações morfoanatômicas**. 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em Agronomia /Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Idriella species endophytic in palms. **Mycotaxon**, Ithaca, v.43, p.271-276, 1992.

ROMANO, A.; NORONHA, C.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Wageningen, v.40, p.159-167, 1995.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, p.247-249, 1973.

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

SALLA, L.; RODRIGUES, J.C.; MARENCO, R.A. Teores de clorofila em árvores tropicais determinados com o SPAD-502. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.159-161, 2007.

SANCHEZ, P.A. **Suelos del trópico - características y manejo**. San José: Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura, 1981. 645p.

- SANDOVAL, F.J.; MÜLLER, L.E.; WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of Musa cv. Grande Naine (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v.49, n.1, p.37-46, 1994.
- SANTANA, M.C.; TEIXEIRA, S.L. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Biologia Geral e Experimental**, São Cristóvão, v.5, p.30-33, 2004.
- SANTOS FILHO, B. G. **Parâmetros biofísicos e fisiológicos associados à economia da água em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) submetidas à estresse hídrico**. 1984. 158p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade de Campinas, Campinas, 1984.
- SANTOS, A.F. dos; TESSMANN, D.J.; NUNES, W.M. C.; VIDA, J.B.; JACCOUD FILHO, D.S. Doenças foliares da pupunheira (*Bactris gasipaes*) no Estado do Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.42, p.125-130, 2001.
- SANTOS, A.F. dos; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B.; NEVES, E.J.M.; KALIL FILHO, A.N.; MAFACIOLI, R. **Doenças da pupunheira no Estado do Paraná**. Colombo: EMBRAPA, 2004. 4p. (Circular Técnica, 90).
- SANTOS, A.F. dos; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B.; NUNES, W.M.C. **As doenças da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): antracnose e podridão da medula**. Colombo: EMBRAPA, 2001. 3p. (Circular Técnica, 63).
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p.231-233, 1975.
- SAS INSTITUTE. Statistical Analysis System Software (SAS). Cary University of North Caroline, 1998. 1 CD-ROM.
- SCHEINER, S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.24, p.35-68, 1993.
- SEBANEK, J. **Plant Physiology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992. 453p.
- SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1597-1601, 2004.
- SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; DUTRA, L.F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.2, p.255-260, 2003.
- SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H. WALTER, J.M.; BISOGNIN, D.A.; CALGAROTO, N.S. Aclimatização de clones de *Dyckia maritima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.12, n.4, p.495-498, 2006.

SILVA, A.T. da; PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S.; ANTUNES, L.E.C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p.49-53, 1995.

SILVA, V. dos S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002. 78p. Dissertação (Mestrado Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, V.L.; MÔRO, F.V.; DAMIÃO FILHO, C.F.; MÔRO, J.R.; SILVA E SILVA, B.M.; CHARLO, H.C.O. Morfologia e avaliação do crescimento inicial de Plântulas de *Bactris gasipaes* Kunth. (ARECACEAE) em diferentes substratos **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.477-480, 2006.

SIOLI, H. **Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais.** Rio de Janeiro: Vozes, 1985. 72p.

SIQUEIRA, E.R.; RIBEIRO, F.E.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. (Ed.). **Cultura do coqueiro no Brasil.** Aracaju: EMBRAPA-CPATC, 1998. p.73-95.

SIVAKUMAR, M.V.K.; VIRMANI, S.M. Crop productivity in relation to interception of photosynthetically active radiation. **Agricultural and forest meteorology**, Amsterdam, v.31, p.131-141, 1984.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p. 1416-1423. 2006.

SODRE, G.A.; CORA, J.E.; SOUZA JUNIOR, J.O. Physical characteristics of substrates of sawdust and containers to growth cuttings of cacao. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.2, p. 339-344. 2007.

SOLÍS, C.; JIMÉNEZ, S.; LOYOLA-VARGAS, V.M., CÁRABEZ, A.; LOTINA-HENNSEN, B. The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C3 and C4 plant. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.30, p.609-616, 1989.

SOUZA JÚNIOR, E.E. de; BARBOZA, S.B.S.C.; SOUZA, L.A.C. Efeito de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.31, p.147-151, 2001.

SOUZA SOBRINHO, F.; PEREIRA, A.V.; LÉDO, F.J.S.; OLIVEIRA, J.S.; VARGAS, S.M. Aclimatização de germoplasma capim-elefante, pós cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.11-15, 2007.

STEIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Revista interamericana de ciencias agrícolas**, Turrialba, v.41, p.196-201, 1991.

- STEINMACHER, D.A.; CLEMENT, C.; SALDANHA, C. W.; GUERRA, M.P. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **CryoLetters**, London, v.28, p.13-22, 2007.
- STURZ, A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.175, p.257-263, 1995.
- SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.113, p.234-238, 1988.
- SUTTER, E.G.; LANGHANS, R.W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tilp culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.60, p.2896-2902, 1982.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Artmed, 2004. 719p.
- TEIXEIRA, C.P.; PAIVA, J.C.A. **Situação atual do cultivo de palmito pupunha no estado do ES**. [Trabalho apresentado NO CURSO INTERNACIONAL SOBRE O PALMITO PUPUNHA, 2., 1997]. Disponível em: <<http://64.233.169.104/search?q=cache:Fk6wnPbBkV0J:www.pejibaye.ucr.ac.cr/Foro/Foro.htm+Trabalho+apresentado+no+II+Curso+Internacional+sobre+o+Palmito+Pupunha.+Universidade+Federal+de+Costa+Rica,+25+de+setembro+de+1997.&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br>> Acesso em: 20 abr. 2008.
- TESSMANN, D.J.; SANTOS, A.F. dos; VIDA, J.B.; MAFACIOLI, R. Avaliação de fungicidas para o controle de antracnose em folhas de pupunheira (pupunha. *Bactris gasipaes*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.51, p.185-189, 2005.
- TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the monocotyledons II. Palmae**. Oxford: Clarendon Press, 1961. 453p.
- TOMLINSON, P.B. **The structural biology of palms**. Oxford: Clarendon Press, 1990. 463p.
- TONET, R.M.; FERREIRA, L.G.S.; OTOBONI, J.L.M.A. **A cultura da pupunheira**. Campinas: CATI, 1999. 44p. (Boletim Técnico, 237).
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-ABCTP, 1990. 433p.
- UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. **Genera Plantarum**. Kansas: Allen Press/Lawrence, 1987. 459p.
- UZZO, R.P. **Resposta fisiológica e anatômica do açaizeiro e da palmeira real australiana ao sombreamento**. 2008. 69p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT. A software plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003. Christchurch **Proceedings...**, Christchurch , 2003. p.105.

VAN HUYLENBROECK, J.M.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. **Plant Science**, Amsterdam, v.134, p.21-30, 1998.

VIDA, J.B., ZAMBOLIM, L., TESSMANN, D.J.; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; VERZIGNASSI, J.R.; CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.355-372, 2004.

VILELA, A.E.; RAVETTA, D.A. The effect of radiation on seedling growth and physiology in four species of *Proposis* L. (Mimosaceae). **Journal of Arid Environmental**, London, v.44, n.4, p.415-423, 2000.

VILLACHICA, H. **Cultivo del pijuayo (*Bactris gasipaes* Kunth) para palmito en la Amazônia**. Lima: TCA, 1996. 153p.

VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A. Micropropagação: conceitos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed). **Cultivo de tejidos em la agricultura – fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p.19-40.

WISEUR, J.; DRUART, P. Utilisation de la culture *in vitro* pour l'amelioration genetique del arbres fruitiers. **Le Fruit Belge**, Liege, v.56, n.422, p.156-164, 1988.

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

WELLS, C.L.; PIGLIUCCI, M. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, Amsterdam, v.3, n.1, p.1-18, 2000.

WETSTEIN, H; SOMMER, H. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultures *Liquidambar Styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society for Horticulture**, Alexandria, v. 118, n. 3, p. 419-424, 1983.

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

WRAIGHT, J.M.; WRAIGHT, K.C. Soil water and root growth. **Hortscience**, Alexandria, v.33, n.6, p.951-959, 1998.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, K.; CLEMENT, C.R.; MACEDO, S.H.M.; FÁVARO, D.I.T.; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M.B.A.; VANNUCCHI, H.; PIMENTEL, S.A.; BADOLATO, E.S.G. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brazil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London, v.54, n.1, p.49-56, 2003.

YUYAMA, L.K.O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J.P.L.; SOUSA, R.F.S. Biodisponibilidade de vitamina A da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) em ratos. **Acta Amazonica**, Manaus, v.29, n.3, p.497-500, 1999.

ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulture**, Leuven, v.227, p.489-499, 1988.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordresh: Kluwer Academic Publishe, 1995. 535p.