

**AMBIENTE DE CULTIVO NA PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE CRISÂNTEMO (*Dendranthema
grandiflora* TZVELEV CV. RAGE):
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E
FISIOLÓGICAS**

FRANCYANE TAVARES BRAGA

2006

FRANCYANE TAVARES BRAGA

**AMBIENTE DE CULTIVO NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
CRISÂNTEMO (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV cv. Rage):
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de concentração
em Fisiologia Vegetal, para a
obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2006

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

Braga, Franciane Tavares

Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage): características anatômicas e
fisiológicas / Franciane Tavares Braga. – Lavras: UFLA, 2006.
119 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual
Dissertação (Mestrado) – UFLA
Bibliografia.

1. *Dendranthema grandiflora*. 2. Luz Natural. 3. Propagação. 4.
Ventilação natural. 5. Qualidade espectral. 6. Aclimatização. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93355

FRANCYANE TAVARES BRAGA

**AMBIENTE DE CULTIVO NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
CRISÂNTEMO (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV cv. Rage):
CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de
concentração em Fisiologia
Vegetal, para a obtenção do
título de "Mestre".

APROVADA em 21 de julho de 2006.

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Embrapa Florestas

Prof. Dr. Moacir Pasqual

UFLA

(Orientador)

A Deus e aos meus pais, Francisco e Maria Auxiliadora (*In memoriam*),

OFEREÇO.

A minha irmã, Pollyana.

A minha família.

Aos meus amigos e pais, Sr. Jorge e Toninha.

Aos meus amigos e irmãos, Marcelo, Thiago e Anderson.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer tudo na minha vida possível.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Moacir Pasqual, por toda atenção, apoio, amizade e ensinamentos durante estes anos.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pela co-orientação, mas, principalmente, pela amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Leonardo Ferreira Dutra e Prof^a. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, por se disponibilizarem e lerem este trabalho e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal.

A Patrícia, pela amizade e apoio durante todo o período do curso e principalmente, pelo convívio familiar em nossa casa. Obrigada por todos os momentos.

A Larissa e Mayara, também pela amizade e convívio familiar.

A Samantha e Espeto, por terem tornado possível este trabalho, por toda ajuda e amizade.

Mais uma vez, aos meus irmãos: Marcelo, Thaigo, Anderson e Rosi, por estarem sempre presentes em minha vida, compartilhando de bons e maus momentos.

Às grandes companheiras: Fernanda Soares e Fernanda Nery, pelas inúmeras horas de alegria e pelo apoio em todos os momentos.

Aos colegas técnicos e funcionários: Lena, Izonel, Tanhan, Joel, Odorêncio e Tina, por reunirem o trabalho com a oportunidade de diversão, pelo auxílio e por serem tão prestativos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura: Vantuil, Claret e Antônio Carlos, pelo apoio e momentos de descontração.

Aos alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura.

A todos os amigos do Setor de Fisiologia Vegetal, em especial aos alunos que partilharam todos os momentos durante o curso: Raírys, Sidney, Paulo Cairo e Vanessa Stain.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Anatomia Vegetal, Gabriel Biagiotti, Cynthia, Girlene Santos, Walter, Gabriel Buiu e Mirian, pelo trabalho em conjunto, por todo tempo que se dispuseram no auxílio desta dissertação e pelo agradável convívio.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

FRANCYANE TAVARES BRAGA, filha de Francisco dos Santos Braga e Maria Auxiliadora Pedra Tavares Braga (ambos falecidos), nasceu em 10 de agosto de 1981, em Conselheiro Lafaiete, MG, onde estudou na Escola Estadual Narciso de Queiróz. Em 2000, transferiu-se para Lavras, iniciando o curso de graduação em Ciências Biológicas, no Centro Universitário de Lavras, concluindo-o em dezembro de 2003. Durante este período, foi estagiária do Centro de Pesquisas, sob orientação do Prof. João Antônio Argenta e desenvolveu projetos de pesquisa com Plantas Medicinais. Em agosto de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em agosto de 2006.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I: Introdução geral.....	1
1 Introdução	2
2 Referencial teórico.....	5
2.1 Floricultura.....	5
2.2 Crisântemo.....	6
2.3 Propagação de crisântemos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	10
2.4 Ambiente de cultivo.....	13
2.4.1 A luz no cultivo <i>in vitro</i>	14
2.4.2 Qualidade de luz.....	16
2.4.3 Sacarose na propagação <i>in vitro</i>	18
2.5 Morfofisiologia e anatomia de plantas micropropagadas.....	20
2.6 Aclimatização.....	22
3 Referências bibliográficas.....	24
CAPÍTULO II: Luz natural e concentração de sacarose na propagação in vitro de <i>Dendranthema grandiflora</i> cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas.....	36
1 Resumo	37
2 Abstract.....	38
3 Introdução	39
4 Material e métodos.....	41
4.1 Meio de cultura	41
4.2 Ambiente de cultivo.....	41
4.3 Variáveis avaliadas.....	43
4.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	44

5 Resultados e discussão	44
5.1 Características fitotécnicas.....	44
5.2 Características anatômicas.....	53
6 Conclusões.....	57
7 Referências bibliográficas.....	57
CAPÍTULO III: Propagação <i>in vitro</i> de <i>Dendranthema grandiflora</i> cv. Rage submetida a alterações espectrais: características anatômicas e fisiológicas.....	62
1 Resumo	63
2 Abstract.....	64
3 Introdução	65
4 Material e métodos.....	67
4.1 Meio de cultura	67
4.2 Ambiente de cultivo.....	67
4.3 Variáveis avaliadas.....	68
4.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	70
5 Resultados e discussão.....	70
5.1 Características fitotécnicas.....	70
5.2 Teores de clorofila.....	74
5.3 Características anatômicas.....	76
5.4 Aclimatização.....	78
6 Conclusões	83
7 Referências bibliográficas.....	83
CAPÍTULO IV: Luz natural e sistemas de vedação na propagação <i>in vitro</i> de <i>Dendranthema grandiflora</i> cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas.....	87
1 Resumo	88
2 Abstract.....	89

3 Introdução	90
4 Material e métodos.....	92
4.1 Meio de cultura.....	92
4.2 Ambiente de cultivo.....	92
4.3 Variáveis avaliadas.....	94
4.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	95
5 Resultados e discussão.....	96
5.1 Características ritotécnicas.....	96
5.2 Teores de clorofila.....	99
5.3 Características anatômicas.....	101
5.3.1 Características paradérmicas.....	101
5.3.2 Características do limbo foliar.....	104
5.4 Aclimatização.....	108
6 Conclusões.....	115
7 Referências bibliográficas.....	116

RESUMO

BRAGA, Franciane Tavares. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas.** 2006. 119p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, MG.¹

Planta cultivada pela beleza de suas inflorescências, o crisântemo tem grande valor comercial por ser uma das culturas ornamentais de maior aceitação no mercado. A cultura de tecidos tem sido utilizada para a sua propagação comercial. Devido aos altos custos de produção por meio da micropropagação convencional, relacionados à perda durante a aclimatização e ao alto consumo de energia elétrica em salas de crescimento, objetivou-se, com este trabalho, o cultivo *in vitro* de crisântemo de forma alternativa. O material constituiu-se de segmento nodais cultivados *in vitro* durante 60 dias. Num primeiro experimento, foram testados dois diferentes fatores: luz (sala de crescimento - SC e casa de vegetação sem - CVSS e com proteção de sombrite 50% - CVSP) e concentrações de sacarose (0, 15, 30g.L⁻¹). Para número de folhas, brotos e raízes e comprimento da maior raiz, o melhor resultado foi observado 30g.L⁻¹ de sacarose e casa de vegetação com sombrite de 50%. Densidades estomáticas e diâmetros polar e equatorial em casa de vegetação sem sombrite com adição de 30g.L⁻¹ de sacarose ao meio. Num segundo experimento, testou-se o efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre os frascos cultivados em casa de vegetação (CV) e SC. Para as variáveis fitotécnicas SC mostrou-se mais eficaz que os demais tratamentos, porém, quanto às telas coloridas, melhores resultados foram obtidos em CV-vermelho. Quanto aos aspectos anatômicos melhores resultados foram obtidos em CVSS. Num terceiro experimento, avaliaram-se dois ambientes de cultivo: CVSP e SC e dois sistemas de vedação: convencional e ventilada. Para número de folhas, brotos e raízes e comprimento de parte aérea e raízes, os melhores resultados foram obtidos em CVSP e sistema de vedação ventilado, porém, os fatores não interagem entre si. Densidades estomáticas e diâmetro polar e equatorial, CV com sistema de vedação ventilada foram os melhores resultados. Quanto ao mesofilo, também CV e sistema de vedação convencional mostraram maiores espessuras. Com os resultados obtidos é possível recomendar o uso da luz natural na propagação *in vitro* dessa espécie, bem como o uso de sistemas de vedação que permitam ventilação natural, proporcionam uma diminuição nos custos de produção.

¹ **Comitê Orientador:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA. (Orientador), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA. (Co-orientador).

ABSTRACT

BRAGA, Franciane Tavares. **Environment of culture in the propagation in vitro of *Dendranthema grandiflora* cv. Raga**: anatomical and physiological alterations. 2006. 119p. Dissertation (Master in Agronomy. Major in Physiology)-Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

Plant cultivated for the beauty of its flowers, chrysanthemum has great commercial value for being one of the most important ornamental cultures for plants market. Tissue culture has been used for that plant in commercial propagation. Because of high costs in traditional micropropagation techniques, to the loss during the acclimatizing process and high electric energy consumption in growth rooms, the objective of this work was to cultivate chrysanthemum *in vitro* through an alternative way. The material consists of nodal segment cultivated in vitro, during 60 days. In a first experiment, two different factors had been tested: light (usual growth room - GR, greenhouse with 50% of shade - GHS and greenhouse without shade - GHWS) and different sucrose concentrations (0, 15 e 30 g.L⁻¹). Number of leaves, sprouts and roots and length of the biggest resulted root the best one was observed 30g.L⁻¹ of sucrose and greenhouse 50% of shade - GHS. Stomatal density, polar and equatorial diameter in greenhouse without shade - GHWS and medium additionated with 30g.L⁻¹ of sucrose. In an second experiment it was tested the effect of colorful shading (red and blue) for bottles cultivated in greenhouse without shade - GHWS and growth room - GR. For fitotechnics variables, GR showed more efficiency than the two other treatments, however, to the colored screens, better results were obtained GH-red. Best anatomical aspects were gotten in GHWS. The third experiment, there were evaluated two kinds of environment: GHS and GR and two systems of prohibition: ventilated and traditional. For leaf number, sprouts and roots and length of aerial part and roots, the better results had been gotten in GHS and ventilated system of prohibition, however the factors do not interact between itself. Stomatal densities and polar and equatorial diameter, GH with system of ventilated prohibition had the best results. However to mesofilo, GH and the traditional prohibition system showed high thicknesses. According to the results, it is possible to recommend the use of the natural light for in vitro propagation, as well as the use of prohibition systems that allow natural ventilation, providing a reduction in the production costs.

¹ **Guidance Committee:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Adviser).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Planta cultivada pela beleza de suas inflorescências, o crisântemo tem grande valor comercial por ser uma das culturas ornamentais de maior aceitação no mercado. Hoje, no Brasil, é a segunda maior flor de corte, em volume de produção, sendo superada apenas pelo cultivo de rosas.

Existem, atualmente, mais de mil variedades, sendo que aproximadamente duzentas são cultivadas comercialmente. O crisântemo pode ser propagado por sementes, porém, esta técnica exige tratos culturais e fitossanitários trabalhosos e de alto risco, uma vez que a variabilidade genética existente mostra-se incompatível com o grau de padronização exigido pelo mercado. Atualmente, o crisântemo é propagado convencionalmente por meio de estacas. Entretanto, as plantas assim produzidas têm apresentado sérios problemas relacionados à infecção por viroses, ocasionando prejuízos aos viveiristas e produtores.

O uso das técnicas de cultivo *in vitro* tem sido aceito em numerosas áreas da agricultura comercial, especialmente com ornamentais, para a obtenção de plantas matrizes.

A cultura de tecidos é uma forma de multiplicação assexuada, que visa propagar rapidamente plantas saudáveis e em maior quantidade, a partir de pouco material vegetativo, independente da época do ano. Além disso, requer pequeno espaço físico, permitindo também a obtenção de plantas livres de bactérias, fungos e vírus, que podem afetar o seu desenvolvimento e prejudicar a produção.

Uma das principais formas de cultivo *in vitro* do crisântemo é a utilização de segmentos nodais como explante. A propagação, no entanto, exige um meio individual e otimizado e condições adequadas de incubação.

Em escala comercial, a micropropagação já é realidade em diversas áreas no mundo. No Brasil, a principal limitação para o maior acesso dos

produtores a essas mudas é o elevado custo deste tipo de material propagativo, que é muito superior ao das mudas convencionais.

Sabe-se que um dos fatores que elevam os custos de produção de mudas micropropagadas é o gasto com energia elétrica em salas de crescimento. Uma alternativa para esse fator seria o cultivo de plântulas *in vitro* em ambiente de luz natural. Essa tecnologia não é muito adotada, por não estarem esclarecidos seus efeitos sobre as culturas que, convencionalmente, são condicionadas em luz artificial, com intensidades luminosas inferiores e com fotoperíodo e temperatura controlados.

O fator luz é fundamental para o desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*. A luz influencia em aspectos anatômicos e fisiológicos, interferindo na qualidade das plântulas durante o processo de aclimatização. Além de reguladores de crescimento, a luz também pode influenciar na taxa de multiplicação. Os componentes comprimento de onda e densidade de fluxo luminoso podem ter efeitos positivos ou negativos no cultivo *in vitro*. Sendo assim, é possível manipular o ambiente de luz em busca de melhores formas de cultivo. A qualidade espectral da luz também pode ser manipulada para a obtenção de melhores resultados. Algumas características na morfogênese de plantas em diferentes espectros poderiam ser potencializadas, podendo até substituir algumas fontes externas de reguladores adicionadas ao meio.

A principal fonte de carbono utilizada nos meios de cultura é a sacarose, porém, o acréscimo desse carboidrato desenvolve, na plântula, características mixo ou heterotróficas, o que ocasiona diminuição na taxa de sobrevivência durante o período de aclimatização, levando à perda de produção e elevando seus custos. Diante disso, trabalhos têm sido realizados a fim de reduzir a concentração de sacarose nos meios, induzindo a um maior grau de autotrofia desses tecidos.

Percebe-se, portanto, a crescente necessidade de estudos relacionados ao ambiente de cultivo *in vitro*, procurando otimizar o uso da técnica e reduzir os custos de produção. Objetivou-se melhorar a qualidade das mudas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* da cultivar Rage) produzidas *in vitro* e reduzir os custos de produção, por meio do uso de luz natural, alteração espectral com telas de náilon coloridas, redução na concentração de sacarose do meio e sistemas de vedação de frascos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floricultura

A floricultura abrange o cultivo de flores e plantas ornamentais com variados fins, desde as culturas de flores para corte à produção de mudas arbóreas (Marques, 2002).

Segundo o Instituto Brasileiro de Floricultura – Ibraflor (2006), o Brasil possui uma área total de 4850 hectares de produção de plantas ornamentais, dados esses correspondentes ao ano de 1999. Essa produção ocorre em grande expansão econômica, destacando-se os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, respondendo por cerca de 75% de toda a produção nacional.

Vale destacar que o Brasil possui vantagens para especializar-se na produção de flores, como clima, disponibilidade de solo e água, além de energia e mão-de-obra. A rentabilidade dos negócios da floricultura reforça a capacidade de crescimento do setor. A floricultura nacional é atividade agrícola que requer pequena área de cultivo, permitindo o aproveitamento de áreas marginais da agricultura tradicional (Kämpf et al., 1990), possibilitando alto rendimento por área cultivada e constituindo uma fonte alternativa para pequenos proprietários.

Motos (2000) cita que a produção mundial de flores e plantas ornamentais ocupa uma área em torno de 190.000 ha, movimentando valores próximos a US\$ 16 bilhões por ano no setor de produção. Do ponto de vista do faturamento no varejo, somam-se, aproximadamente, US\$ 44 bilhões por ano.

A Holanda é altamente competitiva, em termos de custos. Segundo Groot (1999), este país não depende de baixos custos de mão-de-obra, solo, matéria-prima e capital, e sim da sua capacidade de inovar rapidamente. Isso resulta, claramente, em produtividade, qualidade, mão-de-obra profissionalizada e alta tecnologia.

O estado de Minas Gerais vem se destacando no cenário da floricultura nacional. Em levantamento realizado em 1993, São José (2006) cita que, no estado, a produção de flores estava localizada em aproximadamente 27 cidades. As principais regiões produtoras de flores são as de Barbacena, Dona Eusébia, Andradas, Teófilo Otoni, Munhoz e Senador Amaral, totalizando 342 produtores.

A localização da produção e dos centros de comercialização é um fator a ser considerado nesta atividade agrícola. Conforme Kras (1999), cerca de 90% da produção e do consumo de flores e plantas ornamentais se dá em um raio de 500 km entre eles, dado que o custo de transporte e de distribuição de produtos altamente perecíveis limita a distância para a comercialização. Sendo assim, tais atividades acontecem por meio das centrais de comercialização.

No fim dos anos 40 foi criada por holandeses, a Cooperativa Agropecuária de Holambra e, nos anos 80 foi instalado o Veiling, principal centro de comercialização de flores e plantas ornamentais do Brasil. Hoje, o Veiling Holambra é responsável por cerca de 35% da comercialização desse produto no mercado nacional, atendendo a 260 fornecedores da macrorregião de Holambra e demais regiões produtoras, que os distribuem para todo território nacional e países do Mercosul (Landgraf & Paiva, 2005). Em Minas Gerais foi criado em Belo Horizonte no ano de 2001, dentro do Ceasa-BH, o Mercaflor, destinado exclusivamente para o comércio de plantas ornamentais e flores (Landgraf & Paiva, 2005).

2.2 Crisântemo

Planta cultivada pela beleza de suas inflorescências, o crisântemo tem grande valor comercial por ser uma das culturas ornamentais de maior aceitação no mercado. É uma espécie da família Asteraceae que compreende cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e

temperadas. No Brasil, essa família compreende cerca de 180 gênero e o crisântemo destaca-se como espécie cultivada de alto valor econômico (Imenes & Alexandre, 1996).

Anderson (1987) reclassificou a espécie botanicamente como pertencendo à tribo Anthemideae, subtribo Chrysantheminae, gênero *Dendranthema* e espécie *Dendranthema grandiflora* Tzvelev.

Das espécies conhecidas na Europa, em 1800, hoje, têm-se inúmeras variedades de crisântemos, e todos os anos aparecem no mercado outras novas e diferentes, o que indica a importância comercial da planta cuja flor possui várias aplicações (Arbós Lavila, 1992). A cultura dessa espécie no Brasil foi introduzida a partir de cultivares importadas da Europa, Estados Unidos e Japão e vem sendo desenvolvida desde os anos 70 (Arruda et al., 1996).

Os crisântemos eram denominados de *Chrysanthemum morifolium* Ramat, nome originário do grego: *chrysos* (ouro) e *antheon* (flor), ou seja, significa flor-de-ouro (Arbós Lavila, 1992).

A flor é, na realidade, uma inflorescência composta, com flores nascidas em capítulos. Nestas encontra-se, ainda, mais de um tipo de flor, que é classificada de acordo com a forma de suas inflorescências (Figura 1) (Kofranek, 1980).

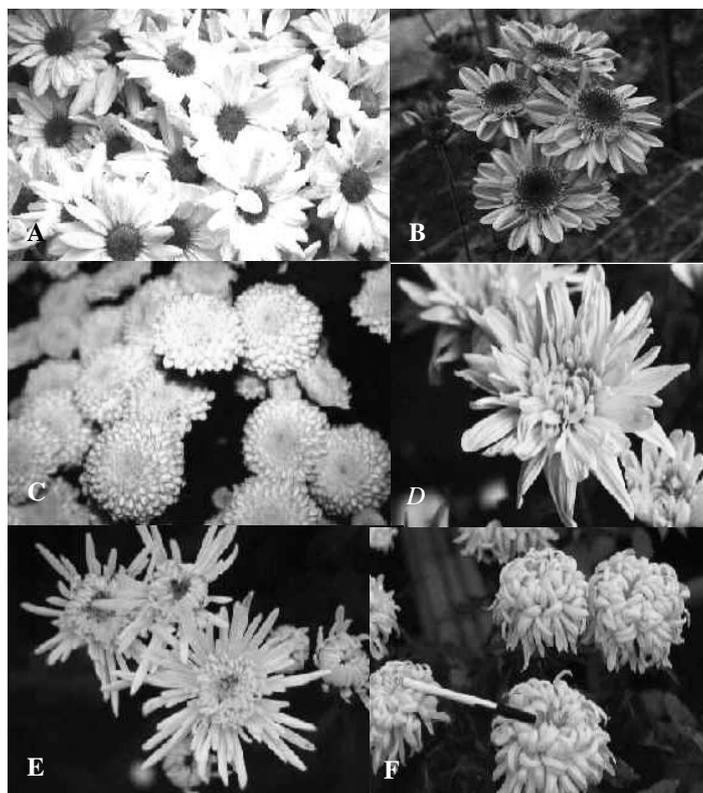


FIGURA 1: Classificação segundo a inflorescência: (A) simples ou margarida; (B) anêmona ou girassol; (C) pompons; (D) decorativas; (E) spider ou fuji; (F) bola ou standard. UFLA. Lavras, MG, 2006.

O crisântemo é uma planta de dias curtos, florescendo naturalmente no inverno (Arruda et al., 1996). A ação da luz na floração em plantas sensíveis ao comprimento do dia é explicada pelo fitocromo. Segundo Taiz & Zeiger (2003), fitocromo é um complexo pigmento/proteína que absorve a luz na faixa vermelho e vermelho distante. Embora o florescimento do crisântemo seja controlado pelo fotoperíodo, a temperatura também é importante à floração,

havendo um comportamento diferenciado entre as cultivares quanto à resposta a esse fator (Barbosa, 2003). A temperatura explica a ineficiência e a baixa qualidade do florescimento, mesmo sob controle fotoperiódico. De acordo com a temperatura para indução floral, Larson (1997) classificou as cultivares de crisântemo em três categorias: termozero, na qual o florescimento se processa a 15,5°C, ocorrendo pouca inibição entre 10°C e 27°C, e pode ser cultivada o ano todo; termopositivo, em que ocorre a inibição do florescimento em temperaturas abaixo de 15,5°C, havendo desenvolvimento do botão floral, porém sem abertura do mesmo: também pode ser cultivado o ano todo, mas com temperatura controlada, e termonegativo, na qual a inibição do florescimento ocorre com temperaturas acima de 15,5°C, sem inibição à iniciação floral.

A cultivar Rage possui inflorescência do tipo margarida, coloração vermelha (Figura 2) e tem um período indutivo de nove semanas, do início da aplicação do dia curto ao florescimento (Van Zanten, 2006).



FIGURA 2. *Dendranthema grandiflora*
cv. Rage Tzvelev. UFLA,
Lavras, MG, 2006.

São grandes a diversidade e a rotatividade de cultivares de crisântemo. Sendo assim, é importante o conhecimento da adaptação dos mesmos à

sensibilidade ao controle fotoperiódico, às exigências do mercado, bem como sua resistência às doenças e pragas.

2.3 Propagação de crisântemos *in vivo* e *in vitro*

A propagação de crisântemos pode ser feita por sementes, rebentos ou estacas. Segundo Bezerra (1997), a propagação assexuada ou vegetativa é feita utilizando-se partes vegetativas da planta. As vantagens deste método são plantas mais uniformes, facilidade de trabalho, baixos custos e redução no tempo de formação e produção das plantas.

A propagação por sementes exige tratos culturais e fitossanitários trabalhosos e de alto risco, uma vez que a variabilidade genética existente mostra-se incompatível com o grau de padronização exigido pelo mercado. Normalmente, esse método é utilizado apenas no processo de melhoramento genético (Cuquel et al., 1992). O crisântemo, sendo um complexo híbrido, segrega facilmente quando propagado por sementes (Kofranek, 1980).

A multiplicação por rebentos é mais demorada e, pela tendência ao acúmulo de patógenos no material de propagação, formam-se plantas propícias à "degeneração" e com redução da produtividade (Almeida, 2001).

Hartmann et al. (1997) citam que a estaquia é uma importante técnica de propagação de plantas ornamentais por se obter, em pouco tempo, grande quantidade de estacas a partir de poucas matrizes. Esta é a principal técnica adotada na propagação *in vivo* de crisântemo.

Segundo Lemaire (1964), a propagação por estacas é a mais indicada, desde que se tenham boas matrizes. As estacas são separadas da planta-matriz por meio de um corte, preferencialmente próximo e abaixo de uma gema. Alguns produtores de estacas ligados à cooperativa Holambra I, Jaguariúna-SP, as agrupam em lotes com peso homogêneo. Estacas herbáceas, como as do

crisântemo, são, principalmente, cultivadas em estufas, evitando-se extremos de temperatura, mantendo-se a umidade relativa do ar em níveis elevados (Hartmann & Kester, 1976), favorecendo ainda a hidratação do substrato, essencial para induzir a formação de raízes (Cutter, 1986).

Outro fator a ser considerado é a utilização de reguladores de crescimento na propagação *in vivo* dessa espécie. Diversos autores citam que o crisântemo responde a reguladores de crescimento para indução do enraizamento Weaver (1972); Kofranek(1980); Shin & Lee (1979) e Sanderson et al. (1988), embora outros, considerem que o crisântemo não responda bem ao tratamento com esses reguladores. As diferenças nas respostas a aplicação de reguladores de crescimento em crisântemo podem ser explicadas, segundo Samananda et al. (1972), pelas diferenças genéticas entre cultivares. Hare (1981) e Jerzy & Stepczynska (1982), trabalhando com diversas cultivares de crisântemo, citaram significativas diferenças quanto ao enraizamento de estacas em função da cultivar. O sucesso na utilização de reguladores de crescimento, com a função de enraizar estacas, depende da interação entre fatores endógenos e ambientais (Laurie & Ríes, 1942; Riehl, 1957; Odom & Carpenter, 1965; Weigel et al., 1984). O uso de reguladores não dispensa a necessidade de outras práticas, tais como seleção de material de propagação e um bom substrato, manutenção de suficientes níveis de umidade, escolha de luz, aeração e temperatura, as quais são pré-requisitos para uma ótima iniciação de raízes (Weaver, 1972).

No cultivo de crisântemo, várias técnicas *in vitro* têm sido utilizadas com os mais diferentes objetivos. A micropropagação é uma técnica da biotecnologia que vem se destacando dentro da cultura de tecidos de plantas, sendo uma forma de propagação assexuada em que se cultivam *in vitro*, diferentes tipos de explantes, desde meristemas, sementes ou embriões zigóticos, até folhas, segmentos caulinares e raízes (Ito, 2004).

Convencionalmente, o crisântemo é propagado por meio de estacas, porém, as plantas têm apresentado sérios problemas ocasionados por viroses, afetando a produção, o que resulta em prejuízos comerciais.

O potencial uso da cultura de tecidos na propagação e melhoramento do crisântemo foi relatado por Murashige (1974). Outros autores, como Earle & Langhans (1974), Jones (1987) e Bhojwani (1990), apresentaram justificativas para a utilização propagação *in vitro* do crisântemo, sendo elas: rápida propagação de plantas e introdução de novas cultivares, indexação de plantas para viroses, plantas livres de vírus e livres de patógenos. Outros autores como Sagawa & Kunisaki (1990), citam também a facilidade no manuseio e no transporte, a independência da sazonalidade, o espaço físico reduzido para cultivo e utilização de pequenas porções da planta para a produção em larga escala comercial.

A produção de crisântemo via cultura de tecidos é ainda bastante onerosa, porém, há interesse na produção de matrizes sadias para otimizar a produção *in vivo*. Há a necessidade de se estabelecer um protocolo para otimizar a multiplicação da espécie, assim como seu enraizamento e aclimatação (Jones, 1987; Bhojwani, 1990).

A utilização de segmentos nodais como explantes é uma das maneiras de viabilizar a produção *in vitro*. Prasad & Chaturvedi (1988) testaram vários explantes para a propagação de crisântemo e obtiveram melhores brotações em ápices de segmentos nodais. Pierik (1987) e Bhojwani (1990) recomendam a utilização de segmentos nodais simples, ou seja, aqueles que contenham apenas uma gema para a propagação de crisântemo.

Libanio & Witmer (1987), estudando as diferenças entre plantas de crisântemo propagadas *in vivo* e *in vitro*, observaram que o material propagado *in vitro* era mais precoce e homogêneo, justificando a expressiva superioridade na produção e na qualidade das flores comercializadas.

2.4 Ambiente de cultivo

O ambiente de cultivo é um fator relevante na propagação *in vitro*, uma vez que os métodos tradicionais requerem a utilização de recipientes selados. Nessas condições, os explantes cultivados crescem em taxas de umidade relativa elevadas, assim como alta disponibilidade de água no meio de cultura, induzindo a um desenvolvimento anatômico ineficaz, tornando o processo de aclimatização difícil e demorado.

Quando cultivadas em ambiente *in vitro* as plântulas apresentam características de fotossíntese, transpiração e absorção baixas.

Tais características são observadas na formação dos órgãos, principalmente as folhas. Estas, quando formadas durante a cultura de tecidos, apresentam diferenças anatômicas se comparadas a folhas formadas pelo processo *ex vitro*, afetando, principalmente, a fotossíntese. Nas diferenças anatômicas são observadas: composição e espessura de camadas de ceras, pigmentação e comportamento estomático (Lee et al., 1985; Preece & Sutter, 1991). Plantas desenvolvidas *in vitro* possuem menos cera epicuticular e cuticular que plantas cultivadas *ex vitro*, levando a planta a uma transpiração excessiva (Brainerd & Fuchigami, 1981). Quando aliada a uma ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, ocorre perda de água pela planta, sendo este um fator que causa baixas taxas de sobrevivência durante o processo de transplante e aclimatização.

Diversas técnicas e metodologias têm sido aplicadas com o objetivo de fornecer condições ambientais que promovam o aumento na capacidade fotossintética do explante micropropagado, principalmente com a utilização de filtros de membranas com microporos permeáveis a gases, os quais promovem o aumento na troca de gases entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo (sistema de ventilação natural) (Cui et al., 2000; Zobayed et al., 2002).

2.4.1 A luz no cultivo *in vitro*

A realização de alguns processos vitais nas plantas é dependente de luz, tais como fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo. A intensidade, a qualidade e a duração afetam particularmente o processo fotossintético e processos mediados por fitocromos, tendo o fototropismo pouca influência no cultivo *in vitro* (George, 1993; Handro & Floh, 1990; Kozai et al., 1991; Kodyn & Zapata-Arias, 1998).

A intensidade luminosa necessária para o cultivo de tecidos vegetais depende do estágio da micropropagação, do explante utilizado e, principalmente, da espécie propagada (Economou & Read, 1987).

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

A intensidade luminosa pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar características, tais como espessura foliar, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lee et al., 1988).

Sabe-se que o fator luz é capaz de influenciar intensamente a fotossíntese, a concentração de clorofila e a ultra-estrutura de cloroplastos. Em avaliações de cultivos de *Liquidambar styraciflua*, a baixa capacidade fotossintética não representa um fator limitante para a aclimatização de plântulas e para o crescimento dos materiais transplantados (Lee et al., 1985). Sendo assim, as dificuldades de sobrevivência das plântulas transplantadas são, provavelmente, relacionadas com as adaptações relacionadas às relações hídricas, uma vez que essas plântulas apresentam um desenvolvimento cuticular reduzido e mesofilo

com grandes espaços intercelulares (Wetzstein & Sommer, 1982) e também divergentes configurações de estômatos, com reduzida funcionalidade (Wetzstein & Sommer, 1983).

Alguns autores vêm estudando as vantagens da utilização da luz natural no lugar da luz artificial. Kodyn e Zapata-Arias (1999) estudaram a utilização potencial da luz solar sobre o cultivo *in vitro* de bananeiras Grande Naine e os efeitos de temperaturas flutuantes, do fotoperíodo e da intensidade luminosa nas taxas de multiplicação e na qualidade das plântulas. Testando três diferentes ambientes de cultivo *in vitro* - câmara de crescimento com luz artificial e temperatura controladas, sala de crescimento com luz natural sem controle de temperatura e casa de vegetação com luz natural, também sem controle de temperatura, observaram que as maiores taxas de multiplicação foram obtidas sob condições de luz natural, em casa de vegetação. Nessa condição, as plântulas apresentaram-se mais verdes claras e com desenvolvimento de uma área foliar maior do que na luz artificial. Entretanto foi observada queima de folhas e perda de turgor.

Seko & Nishimura (1996) verificaram crescimento fotoautotrófico *in vitro*, em meio de cultura sem sacarose, enriquecido com CO₂, com explantes regenerantes de cultura de calos de arroz, sob condições de iluminação contínua (24 h) e sob alta intensidade (densidade de fluxo de ftons fotossintéticos de 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), durante a fase de alongamento e enraizamento de brotações.

Lee et al. (1988), trabalhando com *Liquidambar styraciflua* L., obtiveram resultados mostrando que diferenças no fluxo quântico podem modificar o desenvolvimento *in vitro*. A elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessadas *in vitro*, com diferenciação do tecido paliçádico no mesofilo das folhas. A anatomia foliar destas plântulas apresentou-se mais próxima de folhas de mudas em aclimatização do que o material *in vitro* crescendo sob baixa irradiância.

A partir dos estudos apresentados, constata-se que a luz natural apresenta vantagens sobre o sistema de iluminação artificial, principalmente no que se refere a alterações anatômicas e fisiológicas, destacando-se o crescimento das plântulas micropropagadas, a melhoria das características fisiológicas, devido às condições do ambiente de cultivo serem mais semelhantes àsquelas naturais, adaptando melhor essas plantas quando transplantadas para ambiente *ex vitro*.

2.4.2 Qualidade de luz

Os vegetais utilizam sinalizadores para promover determinados padrões de crescimento e esses sinalizadores respondem à qualidade de luz (Almeida & Mundstock, 2001), crescendo sob uma região limitada no espectro visível e exibindo morfologia e fisiologia determinadas pelas variações ocorridas neste espectro (Eskins & Beremand, 1990).

Assim como todos os fatores que influenciam o desenvolvimento e o crescimento de uma planta, a resposta à qualidade de luz também depende da espécie em estudo (Schuerg et al., 1997; Antonopolou et al., 2004).

A qualidade espectral afeta estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade tanto anatômico como fisiológico para mudanças na qualidade espectral da luz (Saebo et al., 1995; Schubeger et al., 1997; Sims & Pearcy, 1992).

Já são bem estudados os efeitos das alterações espectrais sobre processos, como germinação, inibição de alongamento do hipocótilo, expansão dos cotilédones e das folhas, enverdecimento e biossíntese de pigmentos, alongamento do caule e indução ao florescimento (Saitou et al., 2004; Taiz & Zeiger, 2003; Tsegay et al., 2005).

A dependência das plantas à luz é um processo complexo que envolve a ação combinada de fotorreceptores que controlam estágios variados no desenvolvimento (Shahak, 2005; Shamir et al., 2001). São conhecidas três classes de fotorreceptores consideradas principais: criptocromos e fototropinas, que absorvem luz nas regiões do azul e ultravioleta e os fitocromos, que absorvem luz nas regiões do vermelho e vermelho distante (Frankhauser & Chori, 1997; Kagawua et al., 1992; Niemi et al., 2005; Saitou et al., 2004). Os mecanismos pelos quais tais fotorreceptores regulam as respostas são, ainda, desconhecidos na sua maioria.

A luz vermelha tem influência no desenvolvimento das plantas, pelas alterações nas razões vermelho/vermelho distante (V:VD) absorvidas por formas interconversíveis do fitocromo. Variações nas razões V:VD estimulam respostas ao alongamento do caule, florescimento e alterações na condutância estomática (Schuerger et al., 1997; Smith, 1992) e promovem, também, redução da espessura foliar sob condições de sombreamento (Barreiro et al., 1997; Kasperbauer & Peasler, 1973; Schuerger et al., 1997). Porém, essa redução pode ser resultado de redução na radiação azul (Pushnick et al., 1987).

Alguns autores têm sugerido que o fitocromo regula o transporte de reguladores de crescimento, entre eles as auxinas (Niemi et al., 2005; Tian & Reed, 2001). Outros autores afirmam que o alongamento da parte aérea e dominância apical, respostas comuns à luz vermelha, seja processo mediado pelo fitocromo por meio do controle de enzimas, tal que a auxina pode ser conservada em culturas iluminadas com luz vermelha, mas pode também ser degradada em culturas mantidas sob luz azul (Marks & Simpson, 1999).

Dale (1988) cita que o fitocromo pode estar envolvido no controle de genes ligados à fotossíntese, codificando a síntese de clorofilas *a* e *b*, pequenas subunidades da rubisco, entre outros aparatos fotossintéticos.

Outro importante grupo de fotorreceptores para o desenvolvimento das plantas são os que absorvem na região do azul. Inúmeras respostas têm sido descritas em plantas, sendo elas: taxa de inibição no crescimento do hipocótilo, fototropismo e indução de expressão gênica (Frankhauser & Chory, 1997; Motersen & Stromme, 1987; Silva & Debergh, 1997). Além dessas respostas, a luz azul é importante em processos de síntese de pigmentos, enzimas, desenvolvimento de cloroplastídeos, abertura e fechamento estomático, ativação do ritmo circadiano da fotossíntese e de muitos outros processos fotomorfogênicos (Eckert & Koldenhoff, 2001; Pushnick et al., 1987; Schuerger et al., 1997).

Plantas cultivadas sob luz azul podem resultar em altas taxas de brotações laterais, devido à quebra da dominância apical causada pela degradação de auxinas nessa faixa do espectro (Chee & Pool, 1989; Silva & Debergh, 1997).

2.4.3 Sacarose na propagação *in vitro*

Células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* são heterotróficos e dependem de uma fonte externa de carbono. Os carboidratos fornecem energia e esqueleto de carbono necessários à síntese de polissacarídeos, aminoácidos e proteínas. Na cultura de tecidos, a fonte mais comum de carboidrato utilizada é a sacarose, que pode ser total ou parcialmente hidrolisado em glicose e frutose, essenciais aos processos metabólicos dos vegetais. Dentre as características que conferem importância à utilização da sacarose como principal fonte de carbono, destacam-se: sua alta solubilidade e a rápida metabolização, uma vez que, os produtos de sua hidrólise serão utilizados na via glicolítica ou na rota das pentose-fosfato ou, ainda, serão armazenadas nos vacúolos como amido (Pasqual, 2001).

A concentração de sacarose no meio tem efeito sobre a multiplicação e o crescimento da espécie micropropagada, utilizando-se comercialmente 2% a 4% (peso por volume). Abaixo dessa faixa, as plântulas podem apresentar clorose; acima dela, pode-se acarretar problemas, devido ao excessivo potencial osmótico do meio (Grattapaglia & Machado, 1998a). George (1993) observa que a presença de sacarose no meio de cultura inibe a formação de clorofila e conseqüentemente, a fotossíntese, prejudicando o crescimento autotrófico. Alguns autores demonstraram que o cultivo de plantas com concentrações de sacarose entre 20 a 30 g.L⁻¹ propiciaram acúmulo de açúcares solúveis na folha, sob a forma de grãos de amido no cloroplastídeo, o que pode levar à inibição da síntese de rubisco e clorofila, o que impediria regeneração do substrato RuBP pela deficiência em fosfato inorgânico no estroma do cloroplastídeo, conseqüentemente, reduzindo as taxas fotossintéticas (Capellades et al., 1991; Chenevard et. al., 1997; Kanechi et al., 1998; Jackson, 1999).

Em trabalho realizado com regenerantes de arroz, a partir de cultura de calos, cultivados em meio desprovidos de sacarose, com enriquecimento de CO₂, foi observada hiper-hidricidade, de forma que suas brotações, provavelmente, continham anormalidades anatômicas, incluindo estômatos pouco desenvolvidos (Seko & Nishimura, 1996). A hiper-hidricidade, ou vitrificação, pode ter sido verificada em função do baixo potencial hídrico do meio de cultura, disponibilizando, mais facilmente, água para os explantes. Nas plantas micropropagadas, o pobre desenvolvimento das folhas durante o cultivo *in vitro* tem sido considerado a principal causa da baixa taxa de sobrevivência destas, após a transferência para o ambiente natural (Lee et al., 1985; Nguyen et al., 1999). A perda de vigor observada após a transferência para casa de vegetação, de acordo com Marin & Gella (1988), deve-se à inanição causada pela baixa eficiência na troca do metabolismo heterotrófico (com dependência total de uma fonte externa de carbono) para o metabolismo fotoautotrófico (com dependência

total de fotossíntese). Dessa forma, a eliminação total da sacarose do meio de cultura deve ser questionada, para algumas situações. Debergh (1988) afirma que a redução, ou até mesmo, a eliminação da sacarose do meio de enraizamento devem ser utilizadas com a finalidade de facilitar a passagem das plantas para o estágio autotrófico no transplântio para a fase de aclimatização.

2.5 Morfofisiologia de plantas micropropagadas

O desenvolvimento normal de uma planta pode ser afetado, principalmente quanto a aspectos anatômicos, quando estas são cultivadas fora do seu ambiente natural (Castro, 2003). Há, portanto, necessidade da realização de pesquisas com anatomia foliar que possam conduzir a soluções para problemas referentes à multiplicação dessas plantas (Gavilanes, 1981). A avaliação decorrente das condições de cultura *in vitro* é uma base para a compreensão do processo de adaptação da espécie, assim como fator importante para o estabelecimento de um manejo eficiente para a condução de sistemas de produção comercialmente viáveis (Santiago et al., 2001).

Fatores como alta umidade relativa no interior do recipiente e baixa irradiância podem provocar alterações significativas estruturais e funcionais nos tecidos, levando à incapacidade, principalmente no controle de perda de água, quando submetidas às condições adversas do ambiente natural (Sciutti & Morini, 1995).

A excessiva perda de água, que contribui para a dessecação das plantas, tem sido atribuída a anormalidades induzidas *in vitro*, como pobre formação de cera epicuticular, alteração na composição química das ceras, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos, deficiência no mecanismo de fechamento estomático (Shackel et al., 1990), aumento na frequência de estômatos (Lee et al., 1988), localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha, presença de hidatódios (Capellades et al., 1990) e reduzida

diferenciação do mesofilo das folhas, com alta proporção de espaços intercelulares (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997).

A desordem estrutural nas plantas *in vitro* é resultado de complexos e múltiplos fatores no meio de cultura. A consequência é baixa taxa de sobrevivência das plantas, quando transferidas para condições *ex vitro*.

Em trabalhos realizados comparando o desenvolvimento de espécies *in vitro* e *ex vitro*, Wetzstein & Sommer (1982) observaram que folhas de *Liquidambar styraciflua* apresentaram menor conteúdo citoplasmático e um menor desenvolvimento de cloroplastídeos, quando comparadas com folhas dessa espécie crescida a campo.

A formação de apenas uma camada de células paliçádicas em plantas micropropagadas, em comparação com plantas desenvolvidas em casa de vegetação, as quais normalmente apresentam de duas a três camadas de células paliçádicas, além de maiores espaços intercelulares no mesofilo, vem sendo relatada para algumas espécies (Soares, 2005).

Folhas persistentes de morangos tornaram-se mais espessas devido à camada de células paliçádicas (Fabbri et al., 1986), porém, não houve mudanças no número ou na quantidade dos espaços intercelulares no mesofilo. O desenvolvimento de novas folhas, depois da remoção do meio de cultivo, foi considerado como sendo importante para o crescimento vigoroso das plantas. Durante a aclimatização, folhas presentes, como folhas primordiais *in vitro*, assumiram características intermediárias entre folhas crescidas *in vitro* e aquelas crescidas em casa de vegetação.

As novas folhas produzidas durante a aclimatização possuem características de transição que podem conferir maior capacidade fotossintética, conseqüentemente aquisição de fotoautotrofia e de regulação hídrica às plantas (Sutter & Langhans, 1979; Smith et al., 1986; Wardle et al., 1983). Capellades et al. (1990) citam que o período de aclimatização *ex vitro* permite redução na

densidade estomática, altera o formato e a topografia dos mesmos e, no geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

Por tais motivos, faz-se necessária uma gradual aclimatização, a fim de que as plântulas sobrevivam, quando transferidas para diferentes condições ambientais.

2.6 Aclimatização

A aclimatização de plantas micropropagadas consiste num processo em que se transfere a planta cultivada *in vitro* para *ex vitro*, em geral, casa de vegetação. O objetivo desse processo é superar possíveis dificuldades decorrentes da mudança de ambiente, sendo, portanto, um fator limitante na cultura de tecidos. O sucesso desta técnica requer que as plantas que se desenvolveram heterotroficamente, sob condições de alta umidade, posteriormente se desenvolvam autotroficamente, em condições de moderada ou baixa umidade, temperaturas e luminosidades elevadas (Zimmerman, 1988).

Para muitas espécies, a aclimatização é considerada uma fase crítica da micropropagação, sendo um dos maiores obstáculos à aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos na propagação de plantas devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (Read & Fellman, 1985). A perda de vigor e a subsequente morte devido ao dessecamento são dois sérios problemas que ocorrem com plantas que são transferidas das condições *in vitro* para casa de vegetação (Sutter & Hutzell, 1984).

Uma das causas mais relevantes da baixa taxa de sobrevivência de plantas aclimatizadas é a excessiva perda de água pelas plantas (Brainerd & Fuchigami, 1992; Sutter & Langhans, 1982). A quantidade reduzida de cera epicuticular está relacionada com o aumento da perda de água. Foi observada uma taxa de transpiração mais elevada em folhas de plantas com baixa quantidade de cera epicuticular, quando comparadas com plantas que cresceram

em casa de vegetação ou que já estavam aclimatizadas (Wardle et al., 1983; Sutter & Langhans, 1982). O mecanismo de abertura e fechamento estomático de plantas cultivada *in vitro* em processo de aclimatização é mais lento do que em plantas cultivadas ou mantidas em casa de vegetação, ocasionando rápida perda de água, levando a um colapso nas folhas, resultando em clorose.

Grattapaglia & Machado (1998b) citam que vários fatores são limitantes durante o processo de aclimatização: 1) passagem de baixo fluxo respiratório (*in vitro*) para um ambiente que demanda aumento na taxa respiratória; 2) a plantas passam de um meio heterotrófico, com grande suprimento de carbono, para um autotrófico, sendo necessária a realização de fotossíntese para sobreviver; 3) o aumento na absorção de sais rapidamente e 4) a planta passa de um ambiente asséptico para outro, sujeito ao ataque de microrganismos e pragas.

Existem vários métodos que podem ser empregados para a aclimatização de plantas micropropagadas, sendo estes agrupados em três classes: a) métodos que aproximam as condições *in vitro* das condições naturais; b) métodos que aproximam as condições naturais daquelas *in vitro* e c) métodos que favorecem o crescimento das mudas após a aclimatização.

A primeira classe inclui técnicas de redução da umidade relativa do ar dentro dos recipientes de cultura (Wardle et al., 1983), uso de substratos alternativos ao ágar de modo que proporcione raízes mais ramificadas e de melhor qualidade para tolerar a aclimatização (Leite, 1995). Facilitar as trocas gasosas por meio do selamento permeável dos recipientes (Serret et al., 1997, citados por Hoffmann et al., 1996), aumento de CO₂ associado ao aumento da intensidade luminosa e a redução de sacarose, são outras técnicas incluídas nessa classe (Fujiwara et al., 1988).

A segunda classe inclui o uso de ambientes com elevada umidade relativa do ar (acima de 90%), que favoreça a aclimatização, sendo necessária a redução gradativa da mesma após o período crítico inicial (Marin & Gella, 1988;

Corsato, 1993). O sombreamento do local onde as plantas estão sendo aclimatizadas e a manutenção da sanidade do local e das mudas são técnicas simples incluídas nessa classe.

Nos métodos que favorecem o crescimento de mudas, após a aclimatização, estão incluídas técnicas, como enraizamento *ex vitro* ou *in vitro* (Pasqual & Lopes, 1991; Biasi, 1996), escolha do substrato adequado (Normah et al., 1995), uso de micorrizas (Corsato, 1993) e uso de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio, no caso de espécies leguminosas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.B.S.A. **Enraizamento de estacas de cultivares de crisântemos de corte (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev):** efeito do armazenamento de estacas em diferentes épocas do ano e rizogênese. 2001. 66p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, Jaboticabal, SP.

ALMEIDA, M.L.; MUNDSTOCK, C.M. O aphilamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.393-400, maio/jun. 2001.

ANDERSON, N.O. Reclassifications of the genus *Chrysanthemum* L. **HortScience**, Wallingford, v.22, n.2, p.313, 1987.

ANTONOPOLOU, C. et al. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.48, n.4, p.549-553, 2004.

ARBOS LAVILA, A.M. **El crisântemo:** cultivo, multiplicación y enfermedades. Madri: Mundi, 1992. 170p.

ARRUDA, S.T. et al. Sistema de cultivo e custos de produção de crisântemo em vaso: um estudo de caso. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.26, n.4, p.31-38, 1996.

BARBOSA, J.G. **Crisântemos**: produção de mudas, cultivo para corte de flor, cultivo em vaso e cultivo hidropônico. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 234p.

BEZERRA, F.C. **Curso de floricultura**: aspectos gerais e técnicas de cultivo de flores tropicais. Fortaleza, CE: EMBRAP/CNPAT, 1997. p.8. Apostila.

BHOJWANI, S.S. **Plant tissue culture**: applications and limitations. Amsterdam: Elsevier, 1990. 461p.

BIASI, L.A. **Avaliação do desenvolvimento inicial de porta-enxerto e de mudas de videira obtidos através de diferentes métodos de propagação**. 1996, 177p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.33, p.338-392, 1992.

CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.25, p.21-26, 1991

CAPELLADES, M. et al. How important is photosynthesis in micropropagation? In: SANGWAN R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. (Ed.). **The impact of biotechnology in agriculture**. Kluwer Dordrecht: Academic, 1990.

CAPELLADES, R. et al. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosamultiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141-145, 1990.

CASTRO, E.M. **Comunicação pessoal**. Departamento de Biologia. UFLA, Lavras, 2003.

CHEE, R.; POOL, R.M. Morphogenetic responses to propate trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.2, p.350-354, Mar. 1989.

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J.S.; ALLEMAND, C.J. Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* n°23 X *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, n.1, p.53-59, 1997.

CORSATO, C.E. **Comportamento fisiológico de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) micropropagado e aclimatado na presença de fungos endomicorrízicos**. 1993. 48p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CUI, Y.Y. et al. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.62, p.219-226, 2000.

CUQUEL, F.L.; GRANJA, N.P.; MINAMI, K. Avaliação do enraizamento de estacas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium* L.) cv. White Reagan 606 tratadas com ácido indolbutírico (IBA). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.49, n.1, p.15-22, 1992.

CUTTER, E.G. **Anatomia e morfologia vegetal**. 2.ed. São Paulo, Roca, 1986. Parte I. 304p.

DALE, J.E. The control of leaf expansion. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.39, p.267-295, 1988.

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

DIMASSI-THERIOU, K. BOSABALIDIS, A.M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Cultured**. Dordrecht, v.47, p.127-134, 1997.

EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. II. Production, growth and flowering of plants from tissue cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.99, n.4, p.352-358, 1974.

ECKERT, M.; KALDENHOFF, R. Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.51, n.349, p.1435-1442, Aug. 2001.

ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **Hortscience**, Alexandria, v.22, n.5, p.751-754, Oct. 1987.

ESKINS, K.; BEREMAND, P.D. Light-quality irradiance-level control of lightharvesting complex of photosystem 2 in maize mesophyll cells. Evidence for a low fluence rate threshold in blue-light reduction of mRNA and protein. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.78, n.3, p.435-440, Mar. 1990.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S.K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, n.4, p.331-337, May 1986.

FRANKHAUSER, C.; CHORY, J. Light control of plant development. **Annual Review Cellular Development and Biology**, Palo Alto, v.13, p.203-229, 1997.

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

GAVILANES, M.L. **Anatomia e nervação foliar de espécies nativas do gênero *Gomphera* L. (Amaranthaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 1981. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. RS.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the components of culture media**. 2nd Great Britain: Exegetics, 1993. 574p.

GRATTAPACLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998a. v.1, Parte II p.183-260.

- GRATTAPLAGIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998b. v.1.
- GROOT, N.S.P. Floriculture worldwide trade and consumption patterns. **Acta Horticulturae**, n.495, p.101-121, Sept. 1999. (World Conference on Horticultural Research, Rome, 1998).
- HANDRO, W.; FLOH, E.E.S.A. Organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.
- HARE, R.C. Improved rootings powder for Chrysanthemums. **HortScience**, St. Joseph, v.16, n.1, p.90-91, 1981.
- HARTMANN, H.; KESTER, D.E. **Propagación de plantas, principios y prácticas**. México: Continental, 1976. 810p.
- HARTMANN, H.T. **Plant propagation: principles and practices**. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.
- HOFFMANN, A. et al. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319p.
- IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.80, n.1, p.111-113, Jan. 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **Produção brasileira de flores** Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/IBRAFLO.PDF>>. Acesso em: 06 fev. 2006.
- IMENES, S.L.; ALEXANDRE, M.A.V. **Aspectos fitossanitários do crisântemo**. São Paulo: Instituto Biológico, 1996. p.4-47. (Boletim Técnico, 5)
- ITO, M.R. **Cultura de tecidos em crisântemo (*Dendanthrema grandiflora* Tzvelev)**. 2004. p.56. Monografia (Especialização em Cultura de Tecidos de Plantas) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

JACKSON, S.D. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.1-8, 1999.

JERSY, M.; STEPCZYNSKA, K. Formation of adventitious roots and shoots on isolated leaves of chrysanthemum *in vivo*. **Prace Instytutu Sadownictwa i Szwajcarskiego w Skierniewicach**, n.5, p.7-16, 1980. Apud **Horticultural Abstract**, Farnham Royal, v.52, n.6, p.381, 1982. Resumo.

JONES, L.H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A.J.; ATKIN, R.K. **Improving vegetatively propagated crops**. London: Academic, 1987. p.385-405.

KAGAWA, T.S. et al. *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homologue controlling the chloroplast high-light avoidance response. **Science**, Washington, v.291, n.5511, p.2128-2141, Mar. 1992.

KAMPF, E.; BAJAK, E.; JANK, M.S. O Brasil no mercado internacional de flores e plantas ornamentais. **Informe GEP/DESR**, v.3, n.3, p.3-11, abr. 1990.

KANECHI, M. et al. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v.123, p.176-181, 1998.

KASPERBAUER, M.J.; PEASLER, D.E. Morphology and photosynthetic efficiency of tobacco leaves that received end-of-day red or far-red light during development. **Plant Physiology**, Rockville, v.52, n.5, p.440-442, Nov. 1973.

KOFRANEK, A.M. Cut chrysanthemum. In: LARSON, R.A. **Introductory floriculture**. New York: Academic, 1980. p.5-45.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine') **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. The Netherlands, v.55, p.141-144, 1998.

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.25, n.2, p.107-115, May 1991.

KRAS, J. Marketing of cut flowers in the future. **Acta Horticulturae**, n.482, p.401-405, Mar. 1999. (Internacional Symposium of cut Flowers in the Tropics, Bogotá, 1998).

LANDGRAF, .P.R.C.; PAIVA, P.D.O. Produção e comercialização de flores em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v.26, n.227, p.7-11, 2005.

LARSON, R.A. **Introduction to floriculture**. San Diego: Academic, 1997. 636p.

LAURIE, A.; RIES, V.H. Propagation of plants. In: LAURIE, A.; RIES, V.H. (Ed.). **Floriculture**. New York: McGraw-Hill, 1942. Cap.8, p.164-196..

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.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER H.E. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, 1988.

LEITE, G.B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L. cv. Bartlet e do clone OH x 97**. 1995. 50p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LEMAIRE, P. **Mis crisantemos**. Barcelona: G.Gil, 1964. 36p.

LIBANIO, R.A.; WITMER, A.H.M. Comparação entre crisântemos propagados *in vitro* e *in vivo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 6., 1987. **Anais...** Campinas: UNICAMP 1987. p.77.

MARIN, J.A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.105-112, 1988.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.28, n.2, p.133-142, June 1999.

MARQUES, R.W.C. **Avaliação da Sazonalidade do mercado de flores e plantas ornamentais no estado de São Paulo**. 2002. 114p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MORTENSEN, L.M.; STROMME, E. Effects of light quality on some greenhouse crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.33, n.1/2, p.27-36, Aug. 1987.

MOTOS, J.R. IBRAFLOR informativo apostila “Flores de Corte”. Flortec Consultoria e Treinamento. Dez. 2000.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.

NIEMI, K. et al. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine *in vitro*. **Tree Physiology**, Victoria, v.25, n.1, p.123-128, Jan. 2005.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T.; NGUYEN, U.V. Effects of sucrose concentration, supporting material and number of air exchanges of the vessel on the growth of *in vitro* coffee plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.58, p.51-57, 1999.

NORMAH, M.N.; NOR-AZZA, A.B.; ALIUDIN, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.43, n.3, p.291-294, Mar. 1995.

ODOM, R.E.; CARPENTER, WJ. The relationship between endogenous Indole auxins and the rooting of herbaceous cuttings. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.84, p.494-501, 1965.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras. UFLA/FAEPE, 2001. 74p.

PASQUAL, M.; LOPES, P.A. Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.7, p.975-980, jul. 1991.

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

PRASAD, R.N.; CHATURVERDI, C. Effect of season of collection of explantes on micropropagation of *Chrysanthemum morifolium*. **Biologia Plantarum**, The Hague, v.30, n.1, p. 20-24, 1988.

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

PUSHNICK, J.C. et al. Influences of ultra-violet (UV)-blue light radiation on the growth of cotton. II. Photosynthesis, leaf anatomy, and iron reduction. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.10, n.17, p.2283-2297, 1987.

READ, P.E.; FELLMAN, C.D. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.166, p.15-20, 1985.

RIEHL, G. The beneficial, negligible or injurious effects of growth substances applications in relation to environmental conditions. **Deutsche Gartenbau**, Berlin, v.3, p.387-391, 1956. Apud **Horticultural Abstracts**, Farnham Royal, v.27, n.2, p.269, 1957. Resumo.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.41, n.2, p.177-185, May 1995.

SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J.T. Micropropagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P.V. (Ed.). **Handbook of plants cell culture: ornamental species.** 1990. Cap.3, v.5, p.25-26.

SAITOU, T. et al. Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horseradish hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.76, n.1, p.45-51, Jan. 2004.

SAMANANDA, N.; ORMROD, D.P.; ADEDIPE, N.O. Rooting of chrysanthemum stem cuttings as affected by (2-chloroethyl) phosphonic acid and indolebutyric acid. **Annals of Botany**, London, v.36, p.961-965, 1972.

SANDERSON, K.C.; YKOYAMA, H.; HEARN, W.C. Effect of pre-propagation immersion of cuttings in DCPTA on growth and flowering of chrysanthemum. **Plant Growth Regulator Bulletin**, St. Paul, v.16, n.2, p.8-9, 1988.

SANTIAGO, E.J.A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.D.C.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.5, p.1035-1042, set./out. 2001.

SÃO JOSÉ, A.R. **Floricultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/florbrasil.html>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.10, n.2, p.221-228, 1995.

SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.S.; STRYJEWSKI, E.C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v.79, n.3, p.273-282, Mar. 1997.

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

SHACKEL, K.A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E.G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Jornal of The American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.468-472, 1990.

SHAHAK, Y. Colored shade nets a new ago-technology. **Current research in ornamental**. 2005. Disponível em: <<http://www.polysack.com>>. Acesso em: 29 set. 2005.

SHAMIR, M.O. **See what you can get with colors Improvement in the quality and yield of decorative plants by means of clored shading nettings**. 2005. Disponível em: <<http://www.polysack.com>>. Acesso em: 29 set. 2001.

SILVA, M.H.; DEBERGH, P.C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.51, n.3, p.187-193, 1997.

SIMS, D.A.; PEARCY, R.W. Response of leaf anatomy and photosynthetic capacity in *Alocasia macrorrhiza* (Araceae) to a transfer from low to high light. **American Journal of Botany**, Columbus, v.79, n.4, p.449-455, Apr. 1992.

SHIN, H.J.; LEE, J.M. Effect of propagation method and growth regulators on the rooting of chrysanthemum cuttings. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Seoul, v.20, n.1, p.111-116, 1979. Apud **Horticultural Abstracts**, Farnham Royal, v.50, n.6, p.369, 1980. Resumo.

SMITH, M.A.L.; PALTA, J.P.; McCOWN, B.H. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian White Birch. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.111, n.3, p.437-442, 1986.

SMITH, H. Light quality, photoperception, and plant strategy. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.33, p.481-518, 1992.

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 120p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.104, n.4, p.493-496, 1979.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.60, n.12, p.2896-2902, Dec. 1982.

SUTTER, E.G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization to tissue-cultured plants to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, n.4, p. 303-312, 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artemed 2003. 841p.

TIAN, Q.; REED, J.W. Molecular links between light and auxin signaling pathways. **Journal of Plant Growth and Regulation**, London, v.20, n. 1, p.274-280, Jan. 2001.

TSEGAY, B.A.; OLSEN, J.E.; JUNTILLA, O. Effect of red and far-red light on inhibition of hypocotyls elongation in ecotypes of *Betula pendula* Roth. **American Journal of Biotechnology**, v.4, n.1, p.50-56, 2005. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>. Acesso em: 24 set. 2005.

VAN ZANTEN. **Catálogo da Empresa Irmãos Van Zanten Schoenmaker Ltda.** Disponível em: <<http://www.vanzanten.com>>. Acesso em: 27 mar. 2006.

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

WEAVER, R.J. Rooting and propagation. In: WEAVER, R.J. (Ed.). **Plant growth substances in agriculture**. San Francisco, Freeman, 1972. Cap.5, p.118-145.

WEIGEL, U.; HORN, W.; HOCK, B. Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of *Chrysanthemum morifolium* during adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.422-428, 1984.

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

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

ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of wood plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.227, p.489-499, 1988.

ZHOU, Y.H. et al. Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.81, n.1, p.105-108, Apr. 2005.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.69, p.155-165, 2002.

CAPÍTULO II

LUZ NATURAL E CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA PROPAGAÇÃO IN VITRO DE *Dendranthema grandiflora* cv. Rage: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS

1 RESUMO

BRAGA, Franciane Tavares. Luz natural e concentração de sacarose na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas. In: _____. **Environment of culture in the propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage:** anatomical and physiological alterations. 2006. Cap. 2, p.36-61. Dissertação (Mestrado em Agronomia.Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O uso de lâmpadas em salas de crescimento constitui um dos componentes que mais elevam o custo total de produção *in vitro*, tornando-se necessário estudar as vantagens potenciais da utilização de luz solar sobre a luz artificial para o cultivo *in vitro*. O trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do ambiente de cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage, sob diferentes concentrações de sacarose. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais contendo uma gema, já estabelecidos *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi o MS combinando às concentrações de sacarose (0; 15 e 30g.L⁻¹), sob três ambientes de cultivo (sala de crescimento, casa de vegetação sem proteção de sombrite e casa de vegetação com proteção de sombrite 50%). A avaliação foi efetuada 60 dias após a instalação do experimento. Para o número de folhas, brotos e raízes, e comprimento da maior raiz, o melhor resultado foi observado nos tratamentos 30g.L⁻¹ de sacarose e condições de incubação em casa de vegetação com sombrite de 50%. Quanto ao comprimento médio de parte aérea, o melhor resultado foi 15g.L⁻¹ em sala de crescimento. Maiores densidades estomáticas e diâmetros polar e equatorial foram observados nos tratamentos em casa de vegetação sem sombrite com adição de 30g.L⁻¹ de sacarose ao meio. O ambiente de cultivo altera as respostas de plântulas cultivadas *in vitro* sendo possível recomendar o uso da luz natural e a redução das concentrações de sacarose do meio de cultura, na fase de micropropagação de crisântemo, com possível melhoria da qualidade das mudas e redução dos custos de produção.

¹ **Comitê Orientador:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA. (Orientador), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA. (Co-orientador).

2 ABSTRACT

BRAGA, Franciane Tavares. Light natural and sucrose concentration in the propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage. In: _____. **Environment of culture in the propagation in vitro of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage:** anatomical and physiological alterations. 2006. Cap.2, p.36-61. Dissertation (Master in Agronomy.Major in Physiology)-Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The use of light bulbs in growth rooms is a component that most raise total cost for *in vitro* production plants, making necessary to study the potential advantages of solar light with artificial light for the *in vitro* culture. The objective of this work was to evaluate the effect of the *in vitro* culture environment of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage under different sucrose concentration. The explantes were composed of nodal segments contending one shoot, already established *in vitro*. The MS medium with different sucrose concentrations (0; 15 and 30g.L⁻¹), under three different environments (usual growth room - GR, greenhouse with 50% of shadow - GHS and greenhouse without shadow - GHWS). The evaluation was done 60 days after the experiment installation. For the number of leaves, sprouts and roots and length, the best treatment was obtained with 30g.L⁻¹ of sucrose and conditions of incubation in greenhouse with 50% of shadow - GHS. For the average number of leaf, the best result for the aerial part was obtained with 15g.L⁻¹ in growth room. Bigger stomatal density and diameter, were observed in the treatments in greenhouse without shadow - GHWS with 30g.L⁻¹ of sucrose. The culture environment modified plants cultivated *in vitro*, being possible to recommend the use of natural light and the reduction of the sucrose concentration in the medium for micropropagation of chrysanthemum. This alternative would improve the quality of changes and reduction of production costs.

¹ **Guidance Committee:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Adviser).

3 INTRODUÇÃO

A necessidade de aumentar a eficiência das técnicas de propagação *in vitro* impulsionou a condução de estudos envolvendo a manipulação e o controle das condições de cultivo para otimizar o crescimento *in vitro*, aumentar a sobrevivência após a transferência no processo de aclimatização, garantir a qualidade das plantas produzidas por essas técnicas e obter redução de custos.

Considera-se que explantes e plantas cultivadas *in vitro* não possuem capacidade fotossintética para promover um balanço positivo de carbono e requerem a suplementação deste ao meio. A fonte mais utilizada para o seu crescimento heterotrófico ou mixotrófico pe a sacarose. Porém, inúmeros estudos têm provado que as plantas cultivadas *in vitro* possuem capacidade fotossintética e a realizam de maneira satisfatória, podendo, assim, reduzir ou eliminar o requerimento de uma fonte externa de carbono ao meio de cultura.

No processo de cultivo *in vitro*, o que torna a técnica onerosa é a manutenção das salas de crescimento, principalmente nos gastos com energia elétrica e a perda de plântulas durante a aclimatização, isso porque a intensidade luminosa pode ter efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar características, tais como espessura, diferenciação do mesofilo, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos. A alta umidade relativa dentro dos frascos e as baixas concentrações de CO₂ são fatores que afetam as taxas fotossintéticas e, principalmente, reduzem a funcionalidade dos estômatos.

A redução dos custos de produção, bem como a aproximação do ambiente de cultivo *in vitro* com o *ex vitro*, pode ser obtido por meio do uso de luz natural e da redução da concentração de sacarose no meio, melhorando as características fisiológicas das plântulas cultivadas e levando a um melhor desenvolvimento na fase de aclimatização.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo melhorar a qualidade de plântulas na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage, utilizando-se a luz natural como ambiente de cultivo e redução na concentração de sacarose, visando à redução dos custos de produção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura durante o período de fevereiro a abril de 2005.

O material vegetal utilizado constituem-se de plântulas da espécie *Dendrothema glandiflora* cv. Rage, já estabelecidas *in vitro*. Foram retirados dessas plântulas segmentos nodais contendo uma gema e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com adição de 30g L⁻¹ de sacarose e 5g L⁻¹ de ágar. Os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, com radiação de 52,5W m⁻² e 16 horas de fotoperíodo, até atingirem o tamanho adequado para utilização no experimento.

4.1 Meio de cultura

Segmentos contendo uma gema foram cultivados em meio MS, com a concentração convencional dos sais, acrescido de ágar na concentração de 5g.L⁻¹. Testaram-se três diferentes concentrações de sacarose (0; 15 e 30g L⁻¹). Foram utilizados tubos com 15mL⁻¹ de meio em cada tubo. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

4.2 Ambiente de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo os tubos fechados com tampas de polipropileno e vedados com plástico do tipo parafilme e cobertos adicionalmente com saquinhos plásticos (Figura 3). Para o cultivo sob luz natural, o material foi colocado diretamente sobre as bancadas, ou sob proteção adicional de sombrite com 50% de retenção da radiação (Figura 3). Foram cultivadas também plântulas em tubos mantidos em sala de crescimento

convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, com intensidade de $52,5\text{W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes, para servir como tratamento controle.



FIGURA 3: Visão geral das plântulas mantidas em casa de vegetação. UFLA, Lavras - MG. 2006.

A caracterização do comportamento diurno da radiação solar e da temperatura do ar foi feita por meio de medidas em dias típicos, durante o período de cultivo. As avaliações foram feitas utilizando-se sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA) acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor. Neb), sendo os dados registrados a cada meia hora, durante 11 horas (das 7:00 às 18:00) As médias obtidas em cada microambiente para radiação durante o período avaliado estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Radiação solar e temperatura média do ar observadas nos microambientes em casa de vegetação.

Ambiente com sombrite		Ambiente sem sombrite	
Radiação (MJ.m ⁻² .dia ⁻¹)	Temperatura (°C)	Radiação (MJ.m ⁻² .dia ⁻¹)	Temperatura (°C)
1,15	28	2,66	26

4.3 Variáveis avaliadas

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Características fitotécnicas: número de brotos, folhas e raízes por plântula, comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz.

- Características anatômicas: após a coleta de dados fitotécnicos, plântulas foram selecionadas e fixadas em álcool etílico 70%, até a realização das análises, para as quais foi coletada a segunda folha, contando-se a partir do ápice.

Os cortes paradérmicos foram efetuados manualmente no terço médio foliar, na superfície abaxial das folhas. Para os cortes transversais, utilizou-se um micrótopo de mesa; também foram realizados cortes na região do terço mediano das folhas. As lâminas das seções paradérmicas foram preparadas com corante safranina em glicerina 1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram: densidade estomática (nº de estômatos por mm⁻²) e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961).

Para cada tratamento foram avaliadas cinco folhas, tendo, para cada folha, sido efetuadas cinco avaliações em campos diferentes. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio

Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961). As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se máquina fotográfica acoplada a um microscópio Olympus modelo BX 60 em objetiva de 40x.

4.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3X3, sendo três ambientes: sala de crescimento convencional, casa de vegetação sem proteção e casa de vegetação com sombrite 50% e três diferentes concentrações de sacarose, 0; 15 e 30g L⁻¹, totalizando nove tratamentos, com dezesseis repetições. Cada repetição foi composta por um tubo de ensaio contendo um segmento nodal cada.

Aos 60 dias de cultivo, as plântulas foram removidas dos recipientes para proceder-se à coleta de dados. Os dados foram submetidos ao programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), para a realização das análises de variância. As médias foram comparadas pelo Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características fitotécnicas

Não houve significância para as interações entre os fatores de ambiente de cultivo e concentração de sacarose no meio de cultura para todas as variáveis avaliadas.

Os resultados obtidos em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura, para número de folhas, raízes e brotos, e comprimento de parte aérea e raízes, estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e número de brotações (NB), de plântulas de crisântemo cv. Rage, cultivadas em meios MS acrescido de diferentes concentrações de sacarose.

SACAROSE (g L ⁻¹)	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
0	6,02c	1,85b	0,02c	0,02c	0,85b
15	17,10b	3,88a	5,91b	4,41b	1,52a
30	23,37a	3,80a	8,00a	6,30a	1,80a

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5%.

O melhor resultado para todas as variáveis analisadas foram 15 e 30g L⁻¹ de sacarose. Maior número de folhas foi obtido com a concentração de 30g L⁻¹ de sacarose, com média de 23,37 folhas e a menor média foi observada para o meio sem adição de sacarose.

Resultados similares foram obtidos por Oliveira (1994), testando diferentes concentrações de sacarose, relacionadas a diferentes concentrações do meio MS no cultivo *in vitro* de crisântemo cv. Orange Reagen, quando observou maior número de folhas na maior concentração de sacarose (6%). Dignart (2006), trabalhando com *Cattleya walkeriana*, observou que as concentrações de 30g L⁻¹ e 15g L⁻¹ não resultaram em diferenças estatísticas na propagação *in vitro* da espécie. Chu & Ribeiro (2002) observaram que, para o número de folhas produzidas por gemas de diferentes espécies de *Dioscorea* cultivadas *in vitro*, houve correlação positiva com a concentração de sacarose no meio, tendo os melhores resultados sido obtidos com as concentrações de 3% a 5%.

Para comprimento de parte aérea, foi observada uma média de 3,88cm, na concentração de 15g L⁻¹ (Tabela 1). De modo similar, Oliveira (1994) observou que concentrações elevadas de sacarose afetaram negativamente o comprimento da parte aérea, quando trabalhou com crisântemo cv. Orange Reagen. Dignart (2006) obteve o mesmo resultado trabalhando com orquídea *Cattleya*, constatando que 15g L⁻¹ foi a que resultou no maior comprimento de parte aérea.

Skrebsky et al. (2004), avaliando diferentes concentrações de sacarose e período de cultivo *in vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), obtiveram resultados contrários. Altas concentrações de sacarose (30 e 45g L⁻¹) proporcionaram maior comprimento de parte aérea e estas concentrações estão relacionados ao período de cultivo entre 10 e 25 dias após instalação do experimento. As diferentes respostas observadas por estes autores e neste trabalho podem ser atribuídas a diferenças intrínsecas às espécies estudadas.

Kozai et al. (1991) mencionam que, na presença de fontes externas de carbono, plântulas não desenvolvem autotrofismo, causando redução no crescimento das mesmas, podendo resultar em morte durante o período de aclimatização. Uma explicação para isso seria que o acúmulo de açúcares nas folhas inibiria o processo fotossintético. Os carboidratos acumulados podem prejudicar a produção ou consumo de ATP/NADPH no processo de fotossíntese (Neales & Incoll, 1968). Langford & Wainwright (1987) citam, ainda, que, aumentando-se os níveis de sacarose no meio, obteria-se diminuição de CO₂ fixado, o que proporcionaria um efeito prejudicial na regeneração de RuBP, principal substrato para a carboxilação no ciclo de Krebs. Dimassi-Theriou & Bosabalidis (1996), trabalhando com kiwi (*Actinia deliciosa*) cultivado em meio WPM, com ou sem sacarose, não observaram diferenças nas taxas fotossintéticas

e afirmaram que a redução deste carboidrato no meio de cultivo pode ser aplicado neste caso.

Diversos autores, no entanto, são contrários à idéia de redução de carboidratos no meio de cultura durante o processo de cultivo *in vitro*. Eles afirmam que os mecanismos pelos quais a concentração de açúcares influencia na aclimatização não são muito claros. Assim, manter os níveis de sacarose em torno de 3% na fase que antecede a aclimatização é recomendável, pois, desse modo, a planta armazenaria reservas de energia suficientes para sobreviver às mudanças de ambiente (Capellades et al., 1990; Wainwright & Scrace 1989).

Foram obtidas médias de oito raízes por plântula, com comprimento da maior raiz de 6,3 cm (Tabela 1). Oliveira (1994) observou que o nível de sacarose no meio influencia a formação de raízes em crisântemos cv. Orange Reagen, obtendo maior enraizamento em meios com nível de sacarose acima de 3%. Estes resultados também estão de acordo com os encontrados por Welander (1976), Chong & Pua (1985), Pierik (1987) e Shibli et al. (1992), que observaram a necessidade de fornecimento de alta concentração de sacarose para a emissão de raízes em várias espécies, inclusive em crisântemo.

Dignart (2006) também observou que o número de raízes foi menor para as menores concentrações de sacarose no meio para o cultivo *in vitro* de orquídeas (*Cattleya*), porém, a sacarose não influenciou no comprimento médio das raízes. Leite et al. (2000), trabalhando com pereira, observaram que a concentração de sacarose teve efeito significativo nas variáveis porcentagens de enraizamento, comprimento médio de raízes e formação de raízes secundárias, tendo, a porcentagem de enraizamento apresentado comportamento quadrático significativo, com o aumento da concentração de sacarose. O mesmo comportamento foi observado para a formação de raízes secundárias. Com relação ao comprimento médio de raízes, os autores observaram regressão linear

crescente com a concentração de sacarose variando de 1,05cm na ausência de sacarose no meio e 1,70cm na concentração de 30g L⁻¹.

Os dados obtidos são concordantes com a afirmação de vários autores, segundo os quais a presença de açúcares é essencial ao processo de rizogênese *in vitro* de muitas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998; George & Sherrington, 1984; Sriskandarajah & Mullins, 1981).

Já em outros trabalhos, na fase de enraizamento, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura vem sendo citada como benéfica na melhoria da qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência das plântulas transplantadas (Andrade, 1998).

Não houve diferença significativa para número de brotações nas concentrações 15 e 30g L⁻¹, porém, quando a sacarose foi omitida do meio, a brotação por explante foi prejudicada (Tabela 1).

Dignart (2006) não observou diferenças quanto ao número de brotos de *Cattleya* em qualquer concentração de sacarose adicionada ao meio. O mesmo foi observado por Oliveira (1994) com crisântemo, não tendo havido diferença quanto ao número de brotos formados devido às diferentes concentrações de sacarose, ocorrendo a formação de brotos em meios sem adição de sacarose.

Em trabalho de Serret et al. (1997) as brotações de gardênia a partir de cultivo autotrófico ou mixotrófico foram similares, apesar das brotações autotróficas apresentarem folhas maiores nos internos mais longos.

Foi observado, neste estudo, que a eliminação total de sacarose do meio não foi apropriada, devido à inviabilidade de se fornecer outras fontes de carbono dentro dos frascos durante o processo de cultivo. Achou-se conveniente recomendar a utilização de menores concentrações de sacarose ao meio na fase de crescimento das plântulas, uma vez que essas não apresentaram diferenças que causassem prejuízos ao desenvolvimento das mesmas em nenhum dos

ambientes em que foram mantidas. Essas novas técnicas de cultivo *in vitro* visam facilitar o processo de aclimatização da planta micropropagada, desenvolvendo, nas plântulas, características próximas àsquelas em condições de ambientes *ex vitro*, com o intuito de promover a fotossíntese e habituando-a a condição autotrófica.

Os resultados obtidos em diferentes condições de luz (ambiente de cultivo) para número de folhas, raízes e brotos, e comprimento de raízes e parte aérea, estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e número de brotações (NB), de plântulas de crisântemo cv. Rage, cultivados em diferentes ambientes, sala de crescimento (SC), casa de vegetação com proteção de sombrite 50% (CV) e casa de vegetação sem proteção de sombrite (CV).

LUZ	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
CV sem sombrite	16,00a	2,36b	4,70a	3,85a	1,50a
CV com sombrite 50%	17,12a	3,51a	4,79a	3,48a	1,40a
Sala de crescimento	13,37a	3,66a	4,43a	3,39a	1,27a

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5%.

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis números de folhas, raízes e brotos e comprimento de raízes. Dignart (2006) obteve melhores resultados com *Cattleya* em sala de crescimento e casa de vegetação sem proteção de sombrite, tendo esses resultados diferenças significativas em relação ao tratamento casa de vegetação com proteção de sombrite 50%. Rocha (2005), trabalhando com banana-prata cv. Anã, verificou que o maior número de brotações foi obtido com a utilização de meio de multiplicação adicionado de (BAP) com o material vegetal mantido sob

condições de luz artificial (sala de crescimento, obtendo 2,35 brotações por explante. Além dos reguladores de crescimento, a luz influencia muito a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Kodym & Zapata-Arias (1998) obtiveram maior número de brotações de bananeira em casa de vegetação sob luz natural e em sala de crescimento recebendo luz natural através de uma janela, do que sob o cultivo convencional em sala de crescimento com iluminação artificial.

Uma possível explicação para elevadas taxas de multiplicação em luz natural seria que o aumento da intensidade luminosa reduziria as concentrações de auxinas endógenas das gemas, uma vez que esses fitormônios são fotooxidativos, levando a um desbalanceamento hormonal em direção às citocininas (Radmann et al., 2001; Scontouchainaksaeng et al., 2001).

Trabalhando com pereira, Leite et al (2000) observaram que o fator luz só teve efeito significativo na variável número de raízes. O aumento da intensidade luminosa de 2.000 para 3.000 lux levou a um incremento de 25% no número de raízes primárias. Kodym & Zapata-Arias (1998), trabalhando com bananeira, observam que as raízes formadas em ambiente de luz natural eram mais fortes e vigorosas do que as formadas em sala de crescimento, sob condições de luz artificial.

Dignart (2006), porém, não observou diferenças significativas entre os tratamentos de luz tanto para número de raízes quanto para comprimento médio das mesmas. Similarmente, Magalhães Junior & Peters (1991), trabalhando com ameixeira, forneceram diferentes intensidades luminosas, oriundas de diferentes tipos de lâmpadas e obtiveram uma média geral de enraizamento em torno de 85%. Esta porcentagem foi independente da intensidade luminosa e do tipo de lâmpadas e o mesmo foi observado para comprimento médio das raízes. Radmann et al. (2001) também observaram que as intensidades luminosas utilizadas durante o processo de multiplicação de *Gypsophila paniculata* não

afetaram o posterior enraizamento dos brotos. Rocha (2005), trabalhando com banana-prata cv. Anã, observou que, em explantes cultivados sob luz natural, as raízes foram maiores do que nos cultivados sob luz artificial.

O enraizamento no cultivo *in vitro* é dependente de alguns fatores. A intensidade luminosa pode aumentar a taxa de enraizamento e a qualidade das raízes, porém, há casos em que esse fator não afeta. Em alguns casos, é necessário manter os explantes por algum tempo no escuro, para promover a indução de raízes. Portanto, a resposta ao fator luz depende da espécie em estudo e o genótipo é primordial nesse processo.

Para número de folhas também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. O mesmo foi observado por Dignart (2006), com *Cattleya* e Scontouchainaksaeng et al. (2001) com duas orquídeas *Phaius* e *Vanda*, não tendo a maior intensidade de luz influenciado no número de folhas.

A iluminação natural utilizada por meio de clarabóias instaladas no telhado, também não promoveu diferenças nas variáveis analisadas por Kodym & Zapata Arias (2001). Esses autores consideram seus resultados vantajosos, uma vez que os custos nas instalações puderam ser reduzidos. Estes resultados possibilitam a recomendação do uso de luz natural na propagação *in vitro* da espécie em questão.

Os melhores resultados para comprimento de parte aérea foram observados em sala de crescimento e casa de vegetação com sombrite 50% e não diferiram estatisticamente entre si. Resultados similares foram observados com *Cattleya*, por Dignart (2006) e por Radman et al. (2001) *Gypsophila*, os quais constataram taxa de crescimento maior no tratamento com menor intensidade. Rocha (2005) observou que comprimentos superiores da parte aérea dos explantes de banana-prata cv. Anã foram obtidos sob luz natural, com média de 11,80cm. Esses autores explicam que o maior crescimento dos brotos pode ser

resultado do processo de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente nas salas de crescimento, ocasionando maior crescimento dos entrenós com caules mais finos.

Soontouchainaksaeng et al. (2001) citam também os hormônios como fatores controladores no crescimento das plantas, tais como as auxinas, que são fotooxidativas em intensidade de luz elevadas, as citocininas, que atuam juntamente às auxinas na divisão celular no cultivo *in vitro* e as giberelinas, que atuam no alongamento dos brotos, sendo que, essas, bem como a altura das plantas, aumentam à medida que a intensidade de luz diminui. Sendo assim, o balanço hormonal pode influenciar diretamente no comprimento dos brotos, não havendo, necessariamente, uma relação positiva entre os maiores comprimentos de parte aérea e a qualidade das plântulas.

Mesmo a luz sendo um fator importante na propagação de plantas em geral, são escassos os trabalhos sobre o efeito da intensidade de luz natural no crescimento *in vitro* de plantas. A intensidade e a duração da luz em quantidades satisfatórias podem fornecer melhores resultados no cultivo *in vivo* e *in vitro* de crisântemos.

Os resultados obtidos neste estudo são considerados importantes, uma vez que as plântulas micropropagadas responderam bem aos tratamentos com luz natural, sendo possível aplicar essas técnicas a fim de reduzir os custos de produção *in vitro*, levando ao mercado mudas micropropagadas de qualidade e acessíveis ao consumidor.

5.2 Características anatômicas

Observou-se que as folhas de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage são do tipo hipostomática, apresentando estômatos do tipo anomocíticos, as células guardas de formato elíptico e grande quantidade de tricomas multicelulares tectores não ramificados em a toda região do limbo foliar (Figura 9).

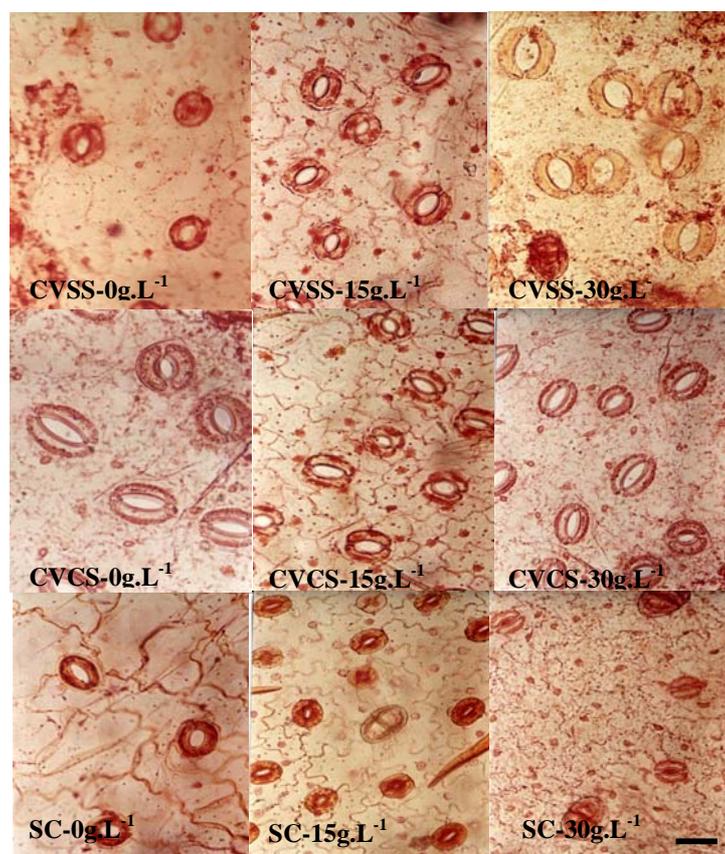


Figura 9. Secções paradermicas na superfície abaxial de folhas de *D. grandiflora*. SC = sala de crescimento; CVSS = casa de vegetação sem sombrite; CVCS = casa de vegetação com sombrite; 0,0; 15 e 30g.L⁻¹ = concentrações de sacarose no meio de cultura. Barra = 35µm. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Houve interações significativas entre os fatores luz e sacarose, para as variáveis diâmetros polar e equatorial dos estômatos. Para a variável densidade estomática, não houve interação entre os fatores, porém, os fatores luz e sacarose, separadamente, influenciam significativamente na densidade de estômatos/mm², tendo sido as maiores densidades encontradas para os tratamentos em casa de vegetação sem sombrite e 30g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 3 e 4).

TABELA 3. Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial em folhas de crisântemo observados para cultivo em diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose (g L⁻¹)	Densidade (mm²)	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)
0	88,55b*	48,30a	35,32a
15	84,60b	50,47a	34,87a
30	102,86a	49,05a	35,02a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Skott & Knott, a 5% de significância.

TABELA 4. Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial em folhas de crisântemo observados para cultivo em diferentes ambientes de cultivo: sala de crescimento (SC), casa de vegetação com sombrite (CVSP) e casa de vegetação sem sombrite (CVSS).

Ambiente de cultivo	Densidade (mm²)	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)
SC	84,11b	42,15c	28,95c
CVSP	95,17a	51,68b	36,43b
CVSS	97,12a	54,56a	40,68a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Skott & Knott, a 5% de significância.

Dignart (2006) observou maiores densidades em folhas de *Cattleya*, também quando cultivadas em casa de vegetação, porém, quando a sacarose foi omitida do meio. Alguns autores verificaram aumento na densidade de estômatos em folhas oriundas do cultivo *in vitro* sobre aquelas observadas em ambiente natural. Geralmente, esses fatores estão associados à grande umidade relativa no interior do recipiente (Brainerd & Fuchigami, 1981; Khan et al., 2002; Lee et al., 1988; Sciutti & Morini, 1995).

A variabilidade estomática está relacionada, principalmente, à umidade relativa nos frascos, porém, a intensidade luminosa também pode implicar nesse processo (Cutter, 1971). Portanto, é possível observar, com os resultados apresentados, que as maiores densidades estão diretamente relacionadas com a alta irradiância, demonstrando que plântulas cultivadas *in vitro* têm a mesma característica de plantas em ambiente natural, possuindo mais estômatos quando cultivadas em ambientes com maiores intensidades luminosas.

Rocha (2005) afirma que a análise da densidade estomática não é um parâmetro confiável para a verificação da adaptabilidade anatômica durante o processo de aclimatização. Uma forma segura de indicar a funcionalidade estomática seria o formato das células guarda e a relação entre o diâmetro polar e equatorial dos estômatos. Wetzstein & Sommer (1988) observaram que estômatos de folhas de *Liquidambar styraciflua* L. desenvolvidas *in vivo* apresentaram-se deprimidas e com células guarda elípticas, ao passo que folhas das plantas cultivadas *in vitro* apresentaram estômatos mais elevados, arredondados e com células subsidiárias elevadas e a densidade estomática foi afetada pela intensidade de luz, observando-se maiores densidades em plântulas cultivadas em altas intensidades luminosas.

Conforme citam Khan et al. (2002), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais e a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal. Rocha (2005) afirma que quanto maior a

relação diâmetro polar/equatorial, mais elipsóide será o formato do estômato, portanto, maior será sua funcionalidade.

A interação ambiente de cultivo com diferentes intensidades luminosas e concentrações de sacarose no meio interferem significativamente no diâmetro polar dos estômatos de plântulas de crisântemo cultivar Rage cultivadas *in vitro*.

A diferentes concentrações de sacarose 15 e 30g L⁻¹ não resultaram em diferenças estatísticas para os ambiente de luz, mostrando os melhores resultados para diâmetro polar. Porém, quando a sacarose foi omitida do meio, foi observado maior diâmetro polar no ambiente sala de crescimento em relação às demais concentrações.

Quanto ao diâmetro equatorial dos estômatos, também houve interação entre os fatores, mostrando que o ambiente casa de vegetação sem proteção de sombrite mostrou melhores resultados para diâmetro equatorial, aliados às concentrações 15 e 30g L⁻¹ que não diferiram entre si (Tabela 4). Dignart (2006) também observou maior funcionalidade dos estômatos em casa de vegetação, porém, quando a sacarose foi omitida do meio.

Esses resultados mostram a tendência em se obter maior funcionalidade estomática sem alteração da concentração usual de sacarose do meio MS, porém utilizando-se a casa de vegetação com aumento do nível de radiação como ambiente de cultivo *in vitro* dessa espécie.

6 CONCLUSÕES

O ambiente de cultivo e a concentração de sacarose promovem alterações anatômicas e fisiológicas em *Dendranthema grandiflora* cv. Rage, durante o cultivo *in vitro*.

É possível utilizar luz natural em casa de vegetação e reduzir a concentração de sacarose do meio MS pela metade, ou seja, 15g.L⁻¹, sem promover prejuízos no cultivo *in vitro*.

A omissão total da sacarose no meio não é recomendada, pois não há fornecimento de outra fonte de carboidrato para os explantes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explante e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. Cristal.** 1998. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.16, n.4, p.515-518, 1981.

CAPELLADES, M. et al. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria. v.115, n.1, p.141-145, 1990.

CHONG, C.; PUA, E.C. Carbon nutrition of Ottawa three apple rootstocks during stages of *in vitro* propagation. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v.60, p.285-290, 1985.

CHU, E.P.; RIBEIRO, R.C.L.F. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.70, p. 241-249, 2002.

CUTTER, E.G. **Plant anatomy: experiments and interpretation**. Massachusetts: A. Wesley, 1971. 343p.

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

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ**, Netherlands, v.47 p.127-134, 1996.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.3: sistema de análise estatística**. Lavras: UFLA;DEX, 1999. Software.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.

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: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.183-260.

KHAN, P.S.S.V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.141-146, 2002.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.66, p.67-71, 2001.

KODYN, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.55, p.141-145, 1998.

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.25, p.107-115, 1991.

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-252, 1961.

LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, M. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v.60, p.633-640, 1987.

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.113, n.1, p.167-171, 1988.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "in vitro" do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência Agrotécnica**, Santa Maria, v.24, n.2, p. 353-357, 2000.

MAGALHÃES JUNIOR, A.M.M.; PETERS, J.A. Cultura "in vitro" de ameixeira: Efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.3, n.1, p.57-61, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantrarum**, Conpenhagen, v.15, n.3, p.473-497, Mar. 1962.

NEALES, T.F.; INCOLL, L.D. The control of leaf photosynthetic rate by the level of assimilate concentration in the leaf: a review of the hypothesis. **Botanical Review**, New York, v.34, p.107-125, 1968.

OLIVEIRA, P.D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. ORANGE REAGEN**. 1994. 116p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

RADMANN, E.B. et al. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.3, p.171-175, 2001.

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

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

SERRET, M.D. et al. The effect of different closure types, light, and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during the micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.47, p.217-230, 1997.

SHIBLI, R.A.; SMITH, M.A.L.; SPOMER, L.A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars to osmotic stress induced in vitro. **Journal of Plant Nutrition**, Montcello, v.15, n.9, p.1373-1381, 1992.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRAO, G.E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1471-1477, set./out. 2004.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P. et al. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit) Bl. And *Vanda coerulea* Giff. **ScienceAsia**, v.27, p.233-237, 2001.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation “*in vitro*”. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.56, n.1, p.71-71, 1981.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.38, p.261-267, 1989.

WELANDER, T.A. Effect of nitrogen, sucrose, IAA and kinetin on explants of *Beta vulgaris* growth *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.36, p.7-10, 1976.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* – and *in vivo* developed Swweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.113, p.167-171, 1988.

CAPÍTULO III

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Dendranthema grandiflora* cv. Rage
SUBMETIDA A ALTERAÇÕES ESPECTRAIS: CARACTERÍSTICAS
ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

1 RESUMO

BRAGA, Franciane Tavares. Propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage submetida a alterações espectrais: características anatômicas e fisiológicas. In: _____. **Environment of culture in the propagation in vitro of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage**: anatomical and physiological alterations. 2006. Cap. 3, p.62-86. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. ¹

A qualidade de luz pode alterar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores, na região do vermelho e azul no espectro. Objetivou-se avaliar o efeito da alteração espectral na anatomia e na fisiologia de crisântemo. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais cultivados *in vitro* contendo uma gema. Foi utilizado o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 15g.L⁻¹ de sacarose e as condições de incubação foram: (SC) sala de crescimento; (CV) casa de vegetação sem proteção de sombrite e com sombrite 50%: preto, vermelho e azul. A avaliação foi efetuada 60 dias. Para número de folhas o melhor resultado foi SC. O mesmo ocorreu com número de raízes e brotações e comprimento médio de raízes. Para comprimento de parte aérea o melhores resultados foram SC e CV com proteção de sombrite: azul preto e vermelho. Quanto aos aspectos anatômicos, para densidade estomática o maior número de estômatos/mm² foi CV sem sombrite e CV sombrite vermelho. Para diâmetros polar e equatorial o melhor resultado foi CV sem sombrite, seguidos de CV azul, vermelho. Quanto à porcentagem de sobrevivência, SC foi a que obteve melhor resultado com 100%, seguido de CV sem sombrite (90%), CV com sombrite 50% (80), vermelho (70%) e azul (60%), a menor sobrevivência foi CV sem sombrite com apenas 10% de sobrevivência. Para os dados anatômicos de plantas aclimatizadas, não houve diferenças entre os tratamentos para densidade estomática, tendo o melhor resultado sido CV azul. No diâmetro polar, foi observado um melhor resultado no tratamento CV preto e, para diâmetro equatorial, foi CV sem sombrite e CV preto não havendo diferença entre eles. Com os resultados apresentados, é possível recomendar a utilização de luz natural no cultivo *in vitro* de crisântemo, bem como a manipulação espectral da radiação, promovendo redução de custos e qualidade das plântulas micropropagadas.

¹ **Comitê Orientador:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA. (Orientador), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA. (Co-orientador).

2 ABSTRACT

BRAGA, Franciane Tavares. Propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage submitted to the spectral alterations: anatomical and physiological characteristics. In: _____. **Environment of culture in the propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage:** anatomical and physiological alterations. 2006. Cap. 3, p.62-86. Dissertation (Master in Agronomy. Major in Physiology)_Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The quality of light can modify plants morphogeneses through a series of processes mediated from receivers, in the region of blue and red in the light specter. This paper had the object to evaluate the effect of spectral alteration through the anatomy and physiology of chrysanthemum. The explantes were made of nodal segments with one shoot cultivated *in vitro*. The medium was composed by half MS (Murashige and Skoog, 1962) complemented with 15g.L⁻¹ of sucrose and the incubation conditions had been: color shadow was tested (red and blue) above the flasks grown in greenhouse (GH) and Growth room (GR). The evaluation was made after 60 days. For leaf number the best result was GR, the same occurred with number of roots and shoot and average length of roots. For length of aerial part, the best results were for GR and GH with shade protection: blue, black and red color. For the anatomical aspects, for stomatal density the biggest number of stomatal/mm² was GH - without shadow and GH - red shading. For stomatal diameter the best result was greenhouse (GH), followed by GH - blue and red. For the survival percentage, GR was the best result with 100%, followed of GHSS (90%), GHS 50% (80), red (70%) and blue (60%), the less survival was GH, with only 10% of surviving. For the anatomical data of acclimatized plants, it was not different between the treatments for stomatal density, the best result was GH - blue. For stomatal diameter the best one was GH treatment - black and for equatorial diameter he was GH - without shadow and GH was observed - black, did not show difference between them. As the presented results, it is possible to prescript the use of natural light *in vitro* culture for chrysanthemum, as well as the spectral manipulation of the radiation, promoting reduction of costs and quality to the plants.

¹ **Guidance Committee:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Adviser).

3 INTRODUÇÃO

As plantas utilizam sinalizadores para promover determinados padrões de crescimento e esses sinalizadores respondem à qualidade de luz crescendo sob uma região limitada no espectro visível e exibindo morfologia e fisiologia determinadas pelas variações ocorridas neste espectro. A dependência das plantas à luz é um processo complexo que envolve a ação combinada de fotorreceptores que controlam estágios variados no desenvolvimento.

Salas de crescimento, geralmente, são equipadas com lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas. A irradiância fornecida primariamente na sala de crescimento afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações fotomorfogênicas.

Estudos da qualidade de luz na micropropagação ainda são escassos e também não são claros os efeitos do espectro e de níveis de irradiância no crescimento de plântulas durante o cultivo *in vitro*. Alguns estudos revelam que, com a variação na qualidade, pode-se manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies, de maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura.

Por outro lado, a complexidade e a variabilidade da radiação natural, e as reações de múltiplas respostas das plantas ao ambiente de cultivo, tornam difícil dizer como determinada manipulação na radiação natural afetará uma resposta da planta.

A manipulação espectral da radiação natural tem sido realizada em casas de vegetação por meio de filtros líquidos coloridos e de coberturas de náilon também coloridas, a fim de se obter respostas fotomorfogênicas das plantas.

Poucos são os estudos do uso de alteração na qualidade espectral na propagação *in vitro*. Porém, existem inúmeros estudos com o uso de coberturas coloridas na propagação vegetativa convencional de ornamentais.

Diante do exposto, objetivou-se, com o presente trabalho, alterar a qualidade espectral da luz em ambiente natural na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage, visando promover respostas morfofisiológicas de interesse para melhorar a qualidade dessas plântulas, principalmente durante o processo de aclimatização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura durante o período de fevereiro a abril de 2005.

O material vegetal utilizado constituiu-se de plântulas da espécie *Dendrathera glandiflora* cv. Rage, já estabelecidas *in vitro*. Foram retirados dessas plântulas segmentos nodais contendo uma gema e inoculados em meio MS com adição de 30g L⁻¹ de sacarose e 5g L⁻¹ de ágar. Os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, com radiação de 52,5W m⁻² e 16 horas de fotoperíodo, até atingirem o tamanho adequado para utilização no experimento.

4.1 Meio de cultura

Segmentos contendo uma gema foram cultivados em meio MS, com a concentração convencional dos sais, acrescidos de ágar na concentração de 5g.L⁻¹ e 15g L⁻¹ de sacarose, utilizando-se todos com 15mL⁻¹ de meio em cada tubo. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

4.2 Ambiente de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo os tubos fechados com tampas de polipropileno e vedados com plástico do tipo parafilme. O material foi colocado diretamente sobre as bancadas ou sob malhas especiais que, segundo o fabricante, alteram o espectro de luz solar ou, ainda, sob proteção adicional de tela preta, que retém 50% da radiação solar. As malhas coloridas utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysac Plastic Industries®. Utilizou-se a malha ChromatiNet Vermelha 50%, produzida com a finalidade de

alterar espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescentando as ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. Outro tratamento foi feito com a malha ChromatiNet Azul 50% que, segundo o fabricante, muda o espectro da luz, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho distante e acrescentando as ondas azuis.

Foram cultivadas também plântulas em tubos mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25+2°C, com radiação de 5,52W.m⁻²s⁻¹ (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes, para servirem como tratamento controle.

A intensidade da radiação foi mensurada por meio de sensores de radiação acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb). Três sensores foram acoplados ao sistema de registro em cada dia avaliado. No mês de setembro, os sensores foram colocados nos três ambientes (Tabela 1).

TABELA 1. Radiações observadas nos microambientes em casa de vegetação. CVSS: casa de vegetação sem sombrite; CVSV: casa de vegetação com sombrite vermelho; CVSA: casa de vegetação com sombrite azul e CVSP: casa de vegetação com sombrite preto.

Ambiente	Radiação (MJ.m⁻².dia⁻¹)
CVSS	2,56
CVSV	2,53
CVSA	2,45
CVSP	1,98

4.3 Variáveis avaliadas

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas:

•Características fitotécnicas: número de folhas e raízes por plântula, comprimento da parte aérea e comprimento de raízes.

•Quantificação dos teores de clorofila: foram utilizadas três amostras de 0,5 g cada, de tecido foliar fresco, que foram maceradas em 30mL de acetona 80%. As concentrações de clorofila *a*, *b* e total foram determinadas de acordo com o método de Arnon (1949), após a obtenção dos dados com base em leituras realizadas no espectrofotômetro de luz a comprimentos de onda definidos em 663 e 645 nm.

•Características anatômicas: ao término do experimento, seguindo-se à coleta de dados fitotécnicos, as plântulas selecionadas foram fixadas em álcool etílico 70% até a realização das análises, para as quais foram coletadas folhas na posição dois, contando-se a partir do ápice.

Os cortes paradérmicos foram efetuados manualmente no terço médio foliar, na superfície abaxial das folhas. Para os cortes transversais, utilizou-se um micrótomo de mesa; também foram realizados cortes na região do terço mediano das folhas. As lâminas das seções paradérmicas foram preparadas com corante safranina em glicerina 1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram: densidade estomática (nº de estômatos por mm⁻²) e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961).

Para cada tratamento foram avaliadas cinco folhas, sendo que para cada folha, foram efetuadas cinco avaliações em campos diferentes. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961).

As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se máquina fotográfica acoplada a um microscópio Olympus modelo BX 60 em objetiva de 40x.

- Aclimatização

Após 60 dias de cultivo 10 plântulas por tratamento foram testadas quanto à capacidade de aclimatização. As plântulas foram colocadas em bandejas contendo Plantmax[®] como substrato e foram mantidas na mesma casa de vegetação onde foram previamente conduzidos os experimentos. A capacidade de aclimatização foi avaliada pela porcentagem de sobrevivência em cada tratamento, ao término de um mês.

Nas plantas sobreviventes, foram realizados cortes anatômicos das folhas para que se pudesse comparar com o mesmo material na fase *in vitro*.

4.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos, com vinte repetições. Cada repetição foi composta por um tubo contendo um segmento nodal.

O fator a ser analisado foi o ambiente de incubação, definido por “luz”, representado por sala de crescimento convencional, casa de vegetação sem proteção e casa de vegetação com sombrite 50%, azul, vermelho e preto.

Aos 60 dias de cultivo, as plântulas foram coletadas para proceder-se à coleta de dados. Para a realização das análises de variância, foi utilizado o programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999); as médias foram comparadas pelo Teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características fitotécnicas

O ambiente de cultivo sala de crescimento apresentou melhores resultados para todas as variáveis observadas (Tabela 2). Silva & Deberg (1997) não observaram diferença quando trabalharam com alteração de qualidade

espectral em ambiente de cultivo *in vitro* de *Azorina vidalli* (Wats). Trabalhando com *Cattleya walkeriana*, Dignart (2006) observou resultados semelhantes para número de folhas, tendo sala de crescimento proporcionando maiores valores do que casa de vegetação, observou-se também que as coberturas coloridas para ambiente de casa de vegetação não resultaram em diferenças significativas.

TABELA 2. Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e número de brotações (NB) de plântulas de crisântemo cv. Rage, cultivadas em diferentes ambientes com coberturas coloridas (CV = casa de vegetação).

LUZ	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
Casa de vegetação	22,8b	3,5b	4,4b	5,3b	1,2a
CV azul	24,5b	5,4a	4,5b	5,5b	1,4a
CV preto	25,4b	5,5a	4,9b	5,9b	1,5a
CV vermelho	25,9b	5,8a	4,9b	6,2b	1,5a
Sala de crescimento	36,6a	6,5a	10,7a	9,8a	1,8a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott & Knott, a 5%.

No comprimento de parte aérea, os valores obtidos foram maiores para sala de crescimento e casa de vegetação com cobertura vermelho, azul e preto, sem diferença significativa entre si. Porém, o ambiente casa de vegetação sem proteção de sombrite foi o que apresentou menor resultado. Resultados semelhantes foram obtidos por Radmann et al. (2001), quando, trabalhando no cultivo, sob diferentes intensidades luminosas, de *Gypsophila paniculata*, observaram que todas as plântulas mantidas em casa de vegetação desenvolveram menor comprimento de parte aérea, comparadas a plântulas mantidas em sala de crescimento. O mesmo foi observado por Dignart (2006)

que obteve melhor resultado no ambiente de cultivo sala de crescimento. Segundo alguns autores esses resultados podem ser induzidos pela luminosidade deficiente da sala de crescimento, caracterizando um crescimento estiolado dessas plântulas. Quanto aos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se observar que, em casa de vegetação em plena luz, houve menor crescimento de parte aérea, uma vez que em ambientes protegidos com sombrites coloridos e sala de crescimento, cuja intensidade luminosa foi reduzida, ocorreu maior crescimento dessas plântulas.

Poucos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de verificar os efeitos da qualidade de luz ou, mesmo, de diferentes níveis de irradiância no crescimento e no desenvolvimento de espécies cultivadas *in vitro*. A maioria das pesquisas é realizada com o objetivo de obter protocolos para meios nutritivos, principalmente com o foco direcionado a alterações nas concentrações desses meios, bem como as concentrações dos reguladores de crescimento adicionados ao meio (Marks & Simpson, 1999).

De modo geral, como já observado em alguns estudos com qualidade espectral, a radiação vermelha promove alongamento da parte aérea (Appelgren, 1991; Marks & Simpson, 1999; Silva & Deberg, 1997). Porém, essa característica não é geral e muitos autores citam que a influência da qualidade espectral sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas está associada à espécie vegetal (Antonopolou et al., 2004; Hunter & Burrit, 2001; Schuerger et al., 1997).

No presente estudo, verificou-se que o comprimento de parte aérea foi influenciado tanto pela intensidade luminosa deficiente na sala de crescimento quanto pela qualidade espectral e intensidade luminosa maior na casa de vegetação, principalmente com sombrites preto e vermelho. Lee (2000) observaram, quando trabalharam com duas espécies de *Hopea*, que a intensidade

de luz foi mais significativa no desenvolvimento do que a variação da qualidade espectral.

Maior número e comprimento das raízes ocorreu em ambiente de cultivo sala de crescimento, ao contrário do ambiente casa de vegetação, com média de 10,7 raízes e 9,8 cm de comprimento da maior raiz. Dignart (2006), em seu trabalho com *Cattleya*, não observou diferença entre os tratamentos com qualidade espectral para comprimento médio de raízes, porém quanto ao número de raízes, foi verificado que sala de crescimento com sombrite azul, proporcionou média inferior à dos demais tratamentos. O mesmo foi observado em trabalho realizado com *Pinus* propagados *in vitro*, onde não houve diferença significativa no enraizamento desta espécie sob diferentes espectros de luz (Niemi et al., 2005). Em trabalho realizado com ameixeira, Magalhães Júnior & Peters (1991) observaram que intensidade luminosa mais baixa aumentou o número de raízes por broto, no entanto, a percentagem de brotos com raízes secundárias e o comprimento das raízes foram beneficiados pelo aumento da intensidade luminosa na sala de crescimento. Segundo Tricoli et al. (1985), o estímulo dado ao enraizamento *in vitro* é resultado da soma do AIA endógeno dos brotos, com possíveis adições de auxinas ao meio. Sendo assim, pode-se supor os resultados obtidos por meio de uma possível degradação das auxinas pelas altas intensidades luminosas, uma vez que esse fitormônio ou regulador é fotooxidativo (Hess, 1975).

Não houve diferença estatística para número de broto entre os ambientes de cultivo, tanto sala de crescimento como casa de vegetação com variação da qualidade espectral. A liberação da dominância apical resulta na formação de brotos axilares, tanto pela fotoxidação de auxinas em altas intensidades luminosas como pela degradação desse regulador pela luz azul (Chee & Pool, 1989).

5.2 Teores de clorofila

O maior teor de clorofila *a* foi observado em sala de crescimento (Tabela 3), seguida de casa de vegetação com cobertura vermelho e preto. Os demais tratamentos não resultaram em diferenças significativas, apresentando também os menores teores de clorofila.

Resultado interessante foi obtido no tratamento casa de vegetação com sombrite vermelho, que apresentou maior teor de clorofila que os demais tratamentos com telas coloridas. Esses resultados são contrários aos obtidos por Dignart (2006) e Silva & Debergh (1997) que, trabalhando com *Cattleya* e *Arizona vidalli*, respectivamente, não observaram diferenças nos teores de clorofila *a* para tratamentos enriquecidos com luz azul e, em radiação enriquecida com luz vermelha, ocorreu diminuição deste pigmento.

TABELA 3. Teores de clorofila observados para plântulas cultivadas em diferentes ambiente natural com coberturas coloridas. CV=casa de vegetação e SC = sala de crescimento.

LUZ	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>a:b</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
CV	0,052c	0,023b	0,075c	1,821a
CV azul	0,060c	0,028b	0,089c	2,214a
CV preto	0,078b	0,033b	0,112b	2,342a
CV vermelho	0,090b	0,034b	0,125b	2,348a
SC	0,137a	0,082a	0,219a	2,629a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott & Knott, a 5%.

Plântulas cultivadas em sala de crescimento apresentaram os maiores teores de clorofila *b*. Os demais tratamentos em casa de vegetação não diferiram estatisticamente entre si.

Silva & Debergh (1997) também não observaram diferenças para os teores de clorofila *b* de plântulas cultivadas sob enriquecimento de luz azul e vermelha. Dignart (2006) verificou que os tratamentos com telas coloridas em sala de crescimento apresentaram menores teores dessa clorofila e esses baixos valores podem ser devido à baixa quantidade total de fluxo de fótons recebidos, devido à retenção de luz pelas telas. Radmann et al. (2001) sugerem também que as baixas irradiâncias não permitem um desenvolvimento adequado do aparato fotossintético. Os efeitos da luz azul e vermelha na planta são função direta dos níveis de irradiância nesses comprimentos de onda (Milivojević & Eskins, 1990).

Observaram-se maiores teores de clorofila *a* *b* e total em sala de crescimento e, em casa de vegetação, os maiores resultados foram obtidos em sombrite vermelho e preto. Os menores teores foram observados em casa de vegetação sem proteção de sombrite e com sombrite azul (Tabela 3). Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho, Dignart (2006) verificou maiores teores em plântulas cultivadas em casa de vegetação com sombrite de cor azul. Milivojević & Eskins (1990) também observaram aumento na síntese de clorofila *a* e *b* em *Pinus nigra* em luz azul quando comparada à luz vermelha. Schuerger et al. (1997) explicam que isso ocorre porque a luz azul é importante na síntese deste pigmento.

Assim como obtido neste trabalho, Dignart (2006) também observou maiores teores de clorofila total em sala de crescimento. Esses resultados podem ser explicados uma vez que, em intensidades mais baixas de luz, ocorre aumento

na concentração total de clorofilas, garantindo, assim, absorção mais eficiente da radiação (Atroch et al., 2001; Engel & Poggiani, 1991).

Quanto à relação clorofila *a:b*, não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, o que apresentou maior teor de clorofila foi sala de crescimento. Dignart (2006) observou resultados semelhantes. Esses resultados diferiram dos obtidos por Marks & Simpson (1999) que observaram aumento da relação clorofila *a:b* em luz vermelha e diminuição em luz azul, quando comparados ao controle de luz branca.

5.3 Características anatômicas

As folhas de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage cultivadas sob diferentes espectros de luz, apresentaram estômatos do tipo anomocíticos e as células guardas de formato elíptico (Figura 4).

Para densidade de estômatos, houve diferenças significativas entre os tratamentos aplicados, tendo as maiores densidades de estômatos sido observadas em casa de vegetação sem proteção de sombrite, seguido de casa de vegetação sombrite vermelho, que não diferiram entre si (Tabela 4).

Já as menores densidades foram observadas em sala de crescimento, casa de vegetação sombrite azul e preto. Esses resultados corroboram os de Dignart (2006) que, trabalhando com *Cattleya*, obteve maiores densidades em casa de vegetação sem sombrite, e podem, ainda, ser comparados aos observados por Rajapske & Kelly (1993), que obtiveram menor densidade estomática trabalhando também com crisântemo cultivados sob filtros de CuSO_4 , que produz os mesmos efeitos de filtros de luz azul.

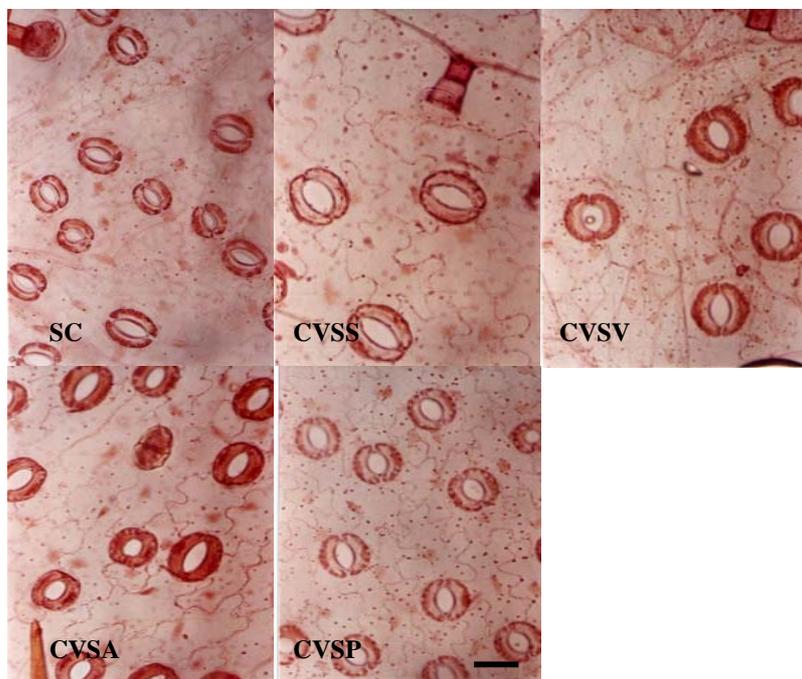


FIGURA 4. Secções paradérmicas na superfície abaxial de folhas de crisântemo. SC = sala de crescimento; CVSS = casa de vegetação sem sombrite; CVSV = casa de vegetação sombrite vermelho; CVSA = casa de vegetação sombrite azul e CVSP = casa de vegetação sombrite preto. Barra = 30µm. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quanto aos diâmetros polar e equatorial, foram observados melhores resultados no tratamento casa de vegetação sem proteção de sombrite, seguido dos tratamentos com proteção de telas coloridas, que não diferiram entre si estatisticamente. Dignart (2006) observou que o tratamento casa de vegetação com sombrite vermelho mostrou-se mais eficaz, quanto aos diâmetros polar e equatorial, em estômatos de folhas de *Cattleya* cultivadas *in vitro*.

TABELA 4. Densidade estomática, diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DE) dos estômatos para folhas de plântulas cultivadas sob diferentes ambientes de luz com telas coloridas. CV= casa de vegetação.

LUZ	Densidade (mm²)	DP (µm)	DE (µm)
Casa de vegetação	232,4a	58,6a	43a
CV azul	101,4b	52,9b	41,5b
CV preto	93,3b	53,6b	40,1b
CV Vermelho	165,1a	54,3b	40,5b
Sala de crescimento	87,2b	42,8c	28,7c

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5%.

5.3 Aclimatização

As plântulas cultivadas em sala de crescimento tiveram 100% de sobrevivência (Figura 5). Já as plântulas provenientes de casa de vegetação sem sombrite, casa de vegetação sombrite preto, vermelho e casa de vegetação sombrite azul, apresentaram taxas de 90%, 80%, 70% e 60% de sobrevivência, respectivamente. Todas as plântulas sobreviventes, porém, mostraram-se vigorosas e, após 90 dias do processo de aclimatização, já apresentavam botões florais (Figura 6).

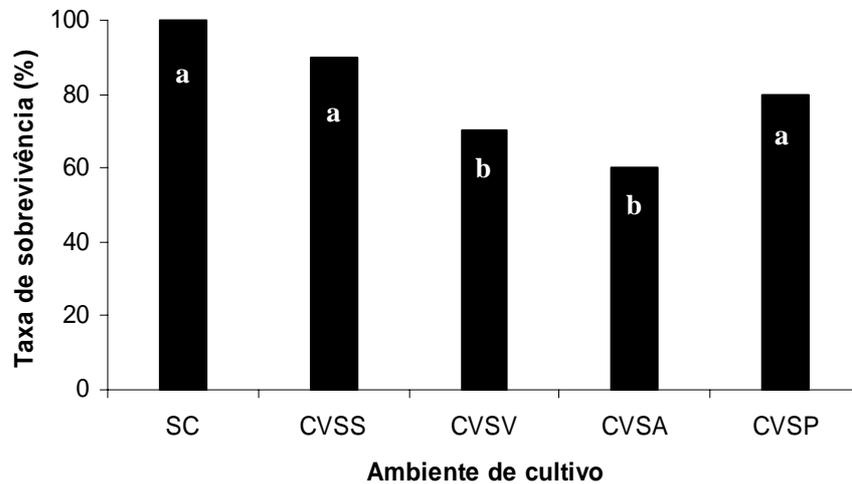


Figura 5. Eficiência de aclimatização após cultivo em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. SC = sala de crescimento; CVSS = casa de vegetação sem sombrite; CVS = casa de vegetação sombrite vermelho; CVSA = casa de vegetação sombrite azul e CVSP = casa de vegetação sombrite preto. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Dignart (2006) observou que as plântulas de *Cattleya* cultivadas em sala de crescimento tiveram porcentagem de aclimatização inferior àquelas mantidas em casa de vegetação durante o cultivo *in vitro*, ressaltando as vantagens de se trabalhar em casa de vegetação. Tais resultados foram contrários aos obtidos neste trabalho em que a maior porcentagem de sobrevivência foi de plântulas advindas de sala de crescimento. A mesma autora constatou 73,33% de sobrevivência para plantas aclimatizadas em casa de vegetação com cobertura vermelha, o mesmo observado no presente trabalho. A obtenção de plantas mais vigorosas cultivadas sob cobertura vermelha já foi relatada por outros autores (Gringberger et al., 2005; Reshef, 2005; Shamir et al., 2005).

Dignart (2006) observou também menor taxa de sobrevivência em casa de vegetação para sombrite preto, contrariando os resultados obtidos neste trabalho, no qual a cobertura preta proporcionou alta taxa de sobrevivência. Saebo et al. (1995), avaliando o desempenho em campo de *Betula pendula* após cultivo *in vitro* em diferentes espectros de luz, observaram que as plântulas que melhor aclimatizaram foram as cultivadas em luz azul e luz vermelha, em comparação às cultivadas em lâmpadas brancas.



Figura 6. Aspecto das plântulas após cultivo em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. Plântulas após transferência para o substrato (A); plântulas aclimatizadas (B); início do botão floral (C) e florescimento das mudas (D). UFLA, Lavras, MG, 2006.

As características estomáticas analisadas variaram muito após o período de aclimatização, quando comparadas ao período *in vitro* (Tabela 4). Foram observados estômatos do tipo amonocíticos e ciclocíticos, células-guarda com formato elíptico e arredondadas (Figura 7).

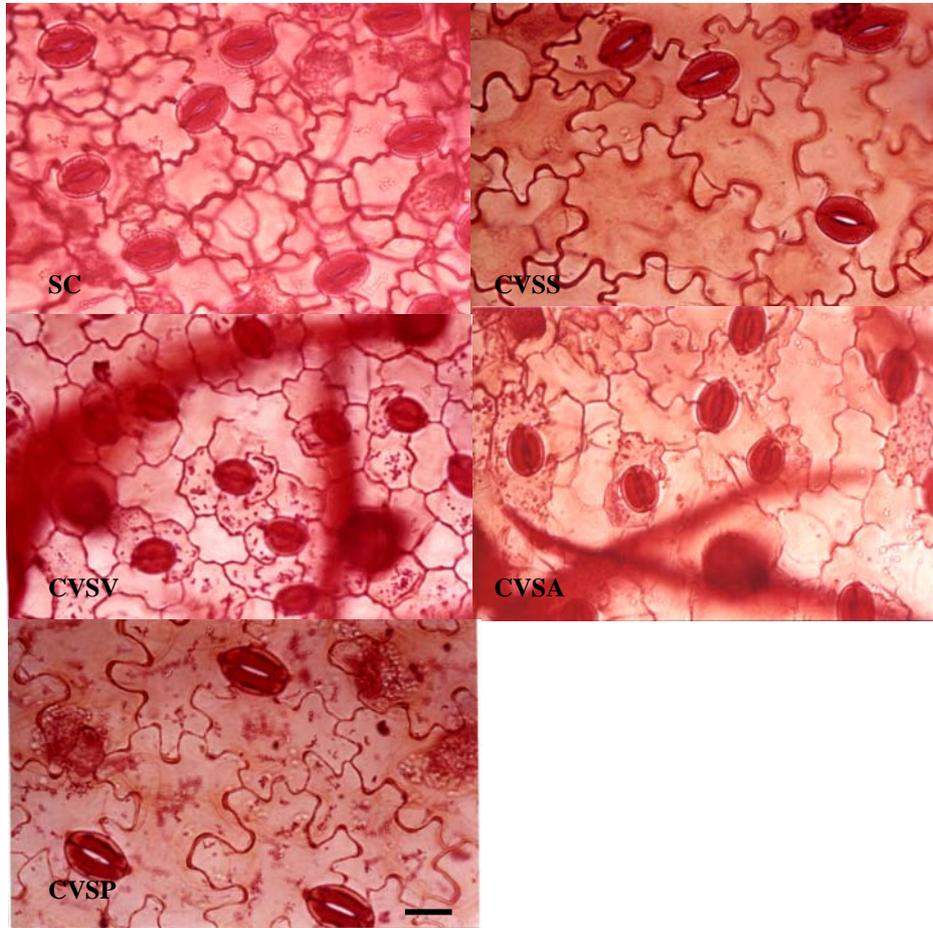


FIGURA 7. Seções paradérmicas na superfície abaxial de folhas aclimatizadas de crisântemo. SC = sala de crescimento; CVSS = casa de vegetação sem sombrite; CVSV = casa de vegetação sombrite vermelho; CVSA = casa de vegetação sombrite azul e CVSP = casa de vegetação sombrite preto. Barra = 25 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A densidade estomática em folhas de plantas aclimatizadas foi bem maior do que durante o cultivo *in vitro*, em todos os tratamentos, com exceção do ambiente casa de vegetação com sombrite preto, no qual a densidade foi menor. Resultados contrários foram observados por Dignart (2006), segundo os quais maiores densidades ocorreram em folhas durante o cultivo *in vitro*. A redução na densidade de estômatos durante o período de aclimatização é um processo bem característico desta fase e já foi reportado por outros autores (Albarello et al., 2001; Donnelly & Vidaver, 1984; Lee et al., 1985; 1988). Uma explicação para tais resultados está no fato de as células da epiderme, bem como os demais tecidos foliares, apresentarem elevada taxa de crescimento e divisão durante o período de aclimatização. Esse crescimento ocorre em ambiente com umidade reduzida, o que promove adaptação, melhorando a funcionalidade dos estômatos e reduzindo sua densidade (Dignart, 2006).

Das plantas aclimatizadas, aquelas que apresentaram maior densidade estomática foram as cultivadas *in vitro*, em casa de vegetação com sombrite azul, porém, não houve diferença significativa entre todos os tratamentos.

TABELA 4. Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial (DP e DE) dos estômatos para folhas de plântulas aclimatizadas. CV= casa de vegetação.

LUZ	Densidade (mm²)	DP (µm)	DE (µm)
Casa de vegetação	280,46a	44,66b	31,95a
CV azul	487,66a	37,35c	25,98c
CV preto	89,54b	48,03a	31,38a
CV vermelho	278,98a	39,03c	26,43c
Sala de crescimento	352,24a	39,82c	28,80b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5%.

6 CONCLUSÕES

Alterações espectrais não promovem alterações fisiológicas e anatômicas significativas em plântulas de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage cultivadas *in vitro*.

Resultados satisfatórios são obtidos em casa de vegetação sem a proteção de sombrite.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARELLO, N. et al. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.4, n.1, p.35-46, 2001.

ANTONOPOLU, C. et al. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.48, n.4, p.549-553, 2004.

APPELGREN, M. Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.45, n.3/4, p.345-351, Jan. 1991.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.34, p.1-15, 1949.

ATROCH, E.M.A.C. et al. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.4, p.853-862, out./dez. 2001.

CHEE, R.; POOL, R.M. Morphogenetic responses to propate trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.2, p.350-354, Mar. 1989.

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.

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, Mar. 1984.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.3, n.1, p.39-45, 1991.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.3:** sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 1999. Software.

GRINBERGER, A.; SHOMRON, M.; GANELEVIN, R. **Shading nets testing** 2000. Disponível em: <http://www.polysack.com>. Acesso em: 29/09/2005.

HESS, D. **Plant physiology:** molecular, biochemical, and physiological fundamentals of metabolism and development. New York: Springer-Verlag, 1975. 333p.

HUNTER, D.C.; BURRIT, D.J. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa*). **In Vitro Cell, Development Biology of Plants**, New York, v.40, n.2, p.215-220, Mar./Apr. 2001.

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-252, 1961.

LEE, D.W. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v.87, n.4, p.447-455, Apr. 2000.

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

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, Jan. 1988.

MAGALHÃES JUNIOR, A.M.M.; PETERS, J.A. Cultura “in vitro” de ameixeira: Efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.3, n.1, p.57-61, 1991.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.28, n.2, p.133-142, June 1999.

MILIVOJEVIĆ, D.; ESKINS, K. Effect of light quality (blue, red) and fluence rate on the synthesis of pigments and pigment-proteins in maize and black pine mesophyll chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.80, n.4, p.624-658, Dec. 1990.

NIEMI, K. et al. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine *in vitro*. **Tree Physiology**, Victoria, v.25, n.1, p.123-128, Jan. 2005.

RADMANN, E.B. et al. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.3, p.171-175, jul./set. 2001.

RAJAPSKE, N.C.; KELLY, J.W. Spectral filters influence transpirational water loss in *Chrysanthemum*. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.10, p.999-1001, Oct. 1993.

RESHEF, G. **Basil culture under diferent shading nets, summer 2001.**

Disponível em:

<http://www.polysack.com/index.php?goto=bep&page_from=746>. Acesso em: 29 set. 2005.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.41, n.2, p.177-185, May 1995.

SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.; STRYJEWSKI, E.C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v.79, n.3, p.273-282, Mar. 1997.

SHAMIR, M.O. **See what you can get with colors** Improvement in the quality and yield of decorative plants by means of colored shading nettings. 2005.

Disponível em:

<http://www.polysack.com/index.php?goto=bep&page_from=746>. Acesso em: 29 set. 2005.

SILVA, M.H.; DEBERGH, P.C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorella vidalii* (Wats.) Feer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.51, n.3, p.187-193, 1997.

TRICOLI, W.D.; MAYMARD, C.A.; DREW, A.P. Tissue culture of propagation of mature trees of *Prunus serotina* Enrh. I. establishment, multiplication, and rooting "in vitro". **ForestSci.**, v.31, n.1, p.201-208, 1985.

CAPÍTULO IV

LUZ NATURAL E SISTEMAS DE VEDAÇÃO NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Dendranthema grandiflora* cv. Raga: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS

1 RESUMO

BRAGA, Franciane Tavares. Luz natural e sistemas de vedação na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage: alterações anatômicas e fisiológicas. In: _____. **Environment of culture in the propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Rage: anatomical and physiological alterations.** 2006. Cap. 4, p.87-119. Dissertação (Mestrado em Agronomia.Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O sistema de propagação *in vitro* fotoautotrófica representa um tipo de cultivo caracterizado por fornecer condições ambientais, como um aumento na disponibilidade de CO₂ e nos níveis de radiação, além de reduzir a concentração de uma fonte de carboidrato ao meio de cultura. Considerando a influência do ambiente de cultivo sobre a qualidade das mudas, quanto à capacidade de crescimento e desenvolvimento após a transferência para ambiente natural, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dois ambientes de cultivo: sala de crescimento e casa de vegetação com sombrite 50% e dois sistemas de vedação de frascos, convencional e ventilado. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais cultivadas *in vitro* contendo uma gema. Foi utilizado o meio MS, combinado a 15g.L⁻¹ de sacarose. Após 60 dias de cultivo, para todas as variáveis fitotécnicas analisadas (número de folhas, brotos e raízes e comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz), o melhor ambiente de cultivo foi observado em casa de vegetação, sob sistema de vedação ventilado. Quanto aos aspectos anatômicos, para densidade estomática, o melhor resultado foi obtido em casa de vegetação com sistema de vedação ventilado; para diâmetros polar e equatorial, casa de vegetação e vedação convencional mostraram-se mais eficientes. Espessura do mesofilo mostrou-se maior em casa de vegetação e vedação convencional. Observaram-se altas taxas de sobrevivência das plântulas em todos os tratamentos. Não houve alteração na anatomia foliar das plântulas aclimatizadas quando comparadas às cultivadas *in vitro*, porém, maiores espessuras do mesofilo foram observadas em plantas cujo cultivo *in vitro* realizou-se em sala de crescimento. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o aumento na disponibilidade de luz com o uso da luz natural e a utilização de ventilação natural podem aumentar as taxas de crescimento *in vitro* e favorecem a sobrevivência das plântulas durante o processo de aclimatização.

¹ **Comitê Orientador:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA. (Orientador), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA. (Co-orientador).

2 ABSTRACT

BRAGA, Franciane Tavares. Natural light and systems of prohibition in the propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Raga: anatomical and physiological alterations. In: _____. **Environment of culture in the propagation *in vitro* of *Dendranthema grandiflora* cv. Raga:** anatomical and physiological alterations. 2006. p.87-119. Dissertation (Master in Agronomy. Major in Physiology)-Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The *in vitro* fotoautotrophic propagation system represents a type of culture characterized for supplying ambient conditions, as an increasing of the available CO² and radiation levels, besides reducing the concentration of a source carboidrato culture medium. Considering the influence of the environment to culture on the quality of the changes, for the capacity of growth and development after the transference for natural environment, the present work objected to evaluate the effects of two environments: growth room - GR, greenhouse with 50% of shadow – GHS and two systems of prohibition of bottles and ventilated conventional. The explants were made of nodal segments with one shut and were cultivated *in vitro*. The medium was made with half MS and 15g.L⁻¹ of sucrose was used. After 60 days of culture, for all the analyzed fitohecnics variable: number of leafs, sprouts and roots and length of the aerial part and length of the biggest root, the best environment of culture was observed in greenhouse, under ventilated system of prohibition. For the anatomical aspects for stomatal density ,the best result was gotten in greenhouse with ventilated system of prohibition, stomatal diameters greenhouse and conventional prohibition had revealed more efficient. Thickness of leaf were bigger in greenhouse and conventional prohibition. High taxes of survival were observed in all treatments. There were no differences between plants cultivated and aclimatized compared to *in vitro*, however, greater thicknesses of mesophylo had been observed in plants for *in vitro* culture in growth room. The results gotten in this work indicate the increase in the use of light with the natural light and the use of natural ventilation, so it can increase the growth taxes *in vitro* and chance of surviving for the plants during the acclimatization process.

¹ **Guidance Committee:** Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Co-Adviser).

3 INTRODUÇÃO

O sistema de propagação *in vitro* fotoautotrófica representa um tipo de cultivo caracterizado por fornecer condições ambientais, com aumento na disponibilidade de CO₂ e nos níveis de radiação, bem como redução na umidade relativa dentro dos frascos, induzindo a fotossíntese e conferindo capacidade de crescimento e multiplicação das plantas em meios sem ou com reduzida suplementação orgânica.

Algumas técnicas e metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de fornecer condições ambientais que promovam a capacidade fotossintética do material micropropagado e favoreçam a aquisição de fotoautotrofia *in vitro*. As principais são: utilização de filtros de membranas com microporos permeáveis a gases, os quais promovem aumento na transferência de gases entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo, sendo a atmosfera ao redor do recipiente mantida sob concentrações normais de CO₂ (sistema de ventilação natural) ou enriquecida com CO₂ (sistema de ventilação forçado) e a utilização de maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) por meio da iluminação natural.

Em diversas espécies tem sido demonstrado que a micropropagação fotoautotrófica, ou seja, na ausência de sacarose, tem apresentado algumas vantagens, quando comparada aos sistemas convencionais de micropropagação. Isso porque, promove maior crescimento e desenvolvimento *in vitro*, diminuindo o nível de contaminação; simplifica os meios de cultura, uma vez que permite a retirada de certos reguladores de crescimento e compostos orgânicos e promove rápido e vigoroso desenvolvimento das plantas durante a aclimatização.

Porém a eliminação total de uma fonte de carbono ao meio deve ser questionada em algumas situações, uma vez que o processo de hiper-hidricidade

ou vitrificação pode ser provocado em função do baixo potencial hídrico do meio de cultura, disponibilizando mais facilmente água para os explantes.

Diante dessas considerações, o presente estudo teve como objetivo avaliar um sistema de vedação para frascos que permite troca de gases dentro do recipiente de cultivo com o meio externo, bem como o uso de luz natural como ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* cv. Rage.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura durante o período de fevereiro a abril de 2005.

O material vegetal utilizado constituiu-se de plântulas da espécie *Dendrathera glandiflora* cv. Rage, já estabelecidas *in vitro*, foram retirados dessas plântulas segmentos nodais contendo uma gema e inoculados em meio MS com adição de 30g L⁻¹ de sacarose e 5g L⁻¹ de ágar. Os segmentos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, com radiação de 52,5W m⁻² e 16 horas de fotoperíodo, até atingirem o tamanho adequado para a utilização no experimento.

4.1 Meio de cultura

Segmentos contendo uma gema foram cultivados em meio MS, com a concentração convencional dos sais, acrescidos de ágar na concentração de 5g.L⁻¹ e 15g L⁻¹ de sacarose, utilizando-se tubos com 15mL⁻¹ de meio cada. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

4.2 Ambiente de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo os frascos colocados diretamente sobre as bancadas sob proteção adicional de sombrite com 50% de retenção da radiação (Figura 1) e em frascos mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade de 52,5 W.m⁻² fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Os frascos foram vedados com tampas convencionais de polipropileno e tampas com sistema de vedação com ventilação natural, e protegidos com filtro

antifungo (Figura 2) que permite ventilação dentro dos recipientes, provenientes do fabricante Samavidros®.



FIGURA 1. Ambientes de cultivo em: (A) casa de vegetação com proteção de sombrite 50%; (B) sala de crescimento com vedação ventilada. UFLA, Lavras - MG. 2006.

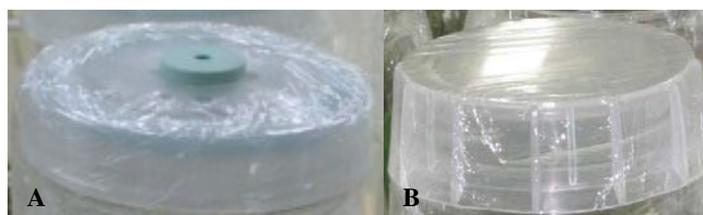


FIGURA 2. Sistema de vedação: (A) tampa com sistema de vedação com ventilação natural; (B) tampa com sistema de vedação convencional. UFLA, Lavras - MG. 2006.

4.3 Variáveis avaliadas

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas:

- Características fitotécnicas: número de folhas e raízes por plântula, comprimento da parte aérea e comprimento das raízes.

- Quantificação dos teores de clorofila: foram utilizadas três amostras de 0,5g cada, de tecido foliar fresco, que foram maceradas em 30mL de acetona 80%. As concentrações de clorofila *a*, *b* e total foram determinadas de acordo com o método de Arnon (1949), após a obtenção dos dados com base em leituras realizadas no espectrofotômetro de luz a comprimentos de onda definidos em 663 e 645nm.

Características Anatômicas - Ao término do experimento, seguindo-se à coleta de dados fitotécnicos, as plântulas selecionadas foram fixadas em álcool etílico 70% até a realização das análises, para as quais foram coletadas folhas na posição dois, contando-se a partir do ápice.

Os cortes paradérmicos foram efetuados manualmente no terço médio foliar, na superfície abaxial das folhas. Para os cortes transversais, utilizou-se um micrótomo de mesa, sendo também realizados cortes na região do terço mediano das folhas. As lâminas das seções paradérmicas foram preparadas com corante safranina em glicerina 1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram: densidade estomática (nº de estômatos por mm⁻²) e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961).

As seções transversais foram clarificadas em hipoclorito de sódio 1% durante um minuto, sendo enxaguadas em água destilada por cinco minutos. Após a lavagem, as seções foram coradas com azul de astra e safranina, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). As lâminas foram montadas em água glicerinada a 50%.

Para cada tratamento foram avaliadas cinco folhas, e para cada folha, foram efetuadas cinco avaliações em campos diferentes. Utilizou-se uma lente ocular micrometrada acoplada a um microscópio de luz. As variáveis analisadas para as seções transversais foram: espessura das epidermes das faces superior e inferior, e espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. As lâminas das análises paradermicas foram preparadas com corante safranina em glicerina 1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram densidade estomática (nº de estômatos por mm²) e diâmetros polar e equatorial (µm) dos estômatos. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961).

As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se máquina fotográfica acoplada a um microscópio Olympus modelo BX 60, em objetiva de 40x.

- Aclimatização

Após 60 dias de cultivo, 10 plântulas por tratamento foram testadas quanto à capacidade de aclimatização. Elas foram colocadas em bandejas contendo Plantmax[®] como substrato e foram mantidas na mesma casa de vegetação onde foram previamente conduzidos os experimentos. A capacidade de aclimatização foi avaliada pela porcentagem de sobrevivência em cada tratamento ao término de um mês.

Das plantas sobreviventes, foram realizados cortes anatômicos das folhas para que se pudesse comparar com o mesmo material na fase *in vitro*.

4.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, totalizando quatro tratamentos, com 10 repetições. Cada repetição foi composta por um frasco contendo cinco segmentos nodais.

O primeiro fator a ser analisado foi o ambiente de incubação, definido por “luz”, representado por sala de crescimento convencional e casa de vegetação com sombrite preto 50%. O outro fator a ser analisado foi o sistema de vedação, constituindo-se de dois modelos de tampas, convencional e com sistema de ventilação.

Aos 60 dias de cultivo, as plântulas foram removidas para proceder-se à coleta de dados. Os dados foram submetidos ao programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), para a realização das análises de variância. As médias foram comparadas pelo Teste de a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características fitotécnicas

Não houve interação entre os fatores ambiente de cultivo e o sistema de vedação para todas as variáveis fitotécnicas analisadas.

Em todas as variáveis, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos do fator ambiente de cultivo, com exceção do número de brotações. O melhor resultado foi apresentado pelo ambiente casa de vegetação (Tabela 1).

TABELA 1. Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e número de brotações (NB), de plântulas de crisântemo cv. Rage, cultivado em diferentes ambientes casa de vegetação e sala de crescimento.

LUZ	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
Casa de vegetação	27,85a	7,36a	15,32a	13,57a	2,62a
Sala de crescimento	20,32b	6,21b	11,27b	10,11b	2,27a

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

Quanto ao sistema de vedação, houve diferenças significativas apenas para as variáveis número de folhas e comprimento de raízes (Tabela 2). Melhor resultado para número de folhas foi observado no sistema de vedação ventilado, enquanto que para comprimento de raízes, o sistema de vedação convencional mostrou-se mais eficaz.

TABELA 2. Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) e número de brotações (NB), de plântulas de crisântemo cv. Rage, cultivado em diferentes sistemas de vedação com ventilação natural e vedação convencional.

TAMPA	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	NB
Ventilação natural	26,55a	6,92a	13,95a	10,99b	2,57a
Convencional	21,62b	6,61a	12,65a	12,68a	2,32a

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

Trabalhando com *Brassica oleracea*, Kanechi & Ochi (1998) avaliaram diferentes condições de cultivo *in vitro*, fotomixotrófica e fotoautotrófica. No primeiro caso, foram utilizados diferentes níveis de irradiação, sistema de vedação ventilado com filtro de membranas nas tampas e enriquecimento com CO₂ nos frascos, tendo o meio de cultura sido suplementado com 2% de sacarose. Já no segundo caso foram utilizadas as mesmas condições de cultivo, porém, sem suplementação de sacarose ao meio. Observou-se que baixas intensidades de irradiação e sistema de vedação ventilado promoveram maior área foliar, bem como maiores massas de raízes e brotos nas plântulas em condições fotomixotróficas. Em condições fotoautotróficas, os melhores resultados também foram observados em condições de cultivo sob baixa irradiação e sistema de vedação ventilado, porém, quando comparados os resultados, verificou-se maior massa em brotos e raízes cultivadas em condições fotomixotróficas, mostrando a necessidade de uma fonte extra de carboidrato.

A ventilação natural é importante durante o processo de enraizamento *in vitro*, principalmente para subsequente adaptação das plantas durante o processo de aclimatização (Kubota & Kozai, 1992).

Para a realização da fotossíntese, é necessário obter energia por meio de uma fonte de carbono para que ocorra crescimento fotoautotrófico. O carbono fixado pelas folhas desenvolvidas *in vitro* em meios sem adição extra de sacarose é insuficiente para que ocorra um crescimento autotrófico, principalmente após transferência para aclimatização, sendo necessária uma adição desse carboidrato ao meio de cultura (Preece & Sutter, 1991).

Nguyen et al. (2001) avaliaram diferentes níveis de irradiação (baixo e alto) e condições de ventilação no frasco (baixo e alto) em cultivo *in vitro* de *Coffea arabusta* e verificaram que maior ventilação nos frascos, independente

dos níveis de irradiância, promoveu maiores pesos de matéria seca, maior área foliar e comprimento de parte aérea.

O aumento dos níveis de irradiância durante o crescimento *in vitro* e a concentração de CO₂ no interior dos frascos, é um fator crítico para promover altas taxas fotossintéticas em plantas cultivadas em condições fotoautotróficas.

Da mesma forma que os demais trabalhos relatados e os resultados apresentados neste trabalho, Arigita et al. (2002), trabalhando com *Actinidia deliciosa*, obtiveram maior número de folhas e brotos e maior comprimento de parte aérea, em condições de incubação com maiores concentrações de CO₂ no interior do frasco e condições fotomixotróficas, ou seja, com adição de baixas concentrações de sacarose ao meio.

5.2 Teores de clorofila

Foram observadas interações significativas nos teores de clorofila *b* e na relação clorofila *a/b*, enquanto que para clorofila *a* e *total*, não foram observadas diferenças (Tabela 3).

Em diversas espécies, a presença de sacarose no meio de cultura tem sido considerada a principal causa na redução dos teores de clorofila, conseqüentemente, prejudicando o processo fotossintético (Adelberg et al., 1999; Kanechi et al., 1998; Chenevard et al., 1997; Deng & Donnelly, 1993).

Considerando-se as variações *in vitro* sob diferentes condições de cultivo, observa-se tendência na redução do teor de clorofila quando se aumenta o nível de irradiância (Deccetti, 2004).

Nos teores de clorofila *a*, foi observada uma diferença significativa quando observado o fator luz separadamente, com tendência a menores teores em folhas cultivadas sob maiores níveis de irradiância, ou seja, em casa de vegetação. Porém, não houve diferença nos níveis de clorofila, quando analisado

o sistema de vedação. O mesmo foi observado por Decchetti (2004), quando avaliou os teores de clorofila *a* em folha de *Annona glaba*. A autora registrou menores teores de clorofila quando utilizou ambiente de cultivo com maiores níveis de irradiância, porém, maiores teores dessa clorofila foram verificados em sistema de vedação com ventilação.

TABELA 3. Teores de clorofila *a*, *b*, *total* e a razão de clorofila *a/b* em folhas de crisântemo *D. grandiflora* desenvolvidas durante o período de cultivo *in vitro* sob sistema convencional de vedação e ventilação natural e ambiente de cultivo em sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV).

		Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		CV	SC
		0,12b**	0,16a
		Ventilação	Convencional
		0,14a	0,14a
		Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		Ventilação	Convencional
CV		0,06bA*	0,05bA
SC		0,10aB	0,15aA
		Clorofila total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		CV	SC
		0,18b	0,29a
		Ventilação	Convencional
		0,23a	0,24a
		Clorofila <i>a/b</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		Ventilação	Convencional
CV		1,63aA	1,06bB
SC		2,08aA	2,38aA

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

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

Para clorofila *b*, observou-se que sala de crescimento e sistema de vedação convencional resultaram nos maiores teores. Decchetti (2004) não observou diferença entre os teores dessa clorofila, tanto no sistema de vedação

como nos níveis de irradiância, porém, os maiores teores foram obtidos em menores níveis de irradiação, com sistema de ventilação natural.

Os ambientes de cultivo e o sistema de vedação não influenciam na síntese de clorofila, tendo os maiores teores sido observados também em sala de crescimento com sistema de vedação convencional. Os fatores analisados interferem na relação clorofila *a/b*, evidenciando melhores resultados no sistema de vedação convencional, mantidos em sala de crescimento. O efeito do nível de irradiância foi menos evidente sobre a clorofila *a* e *b*.

Os teores de clorofila total foram maiores em folhas cultivadas em sala de crescimento e com frascos vedados com tampas convencionais. Nas folhas sob baixa irradiância, constitui-se em resposta que é observada com frequência, sendo que, sob essa condição, a planta investe mais assimilados no complexo proteína-clorofila do aparelho fotossintético para otimizar a captação de luz (Amâncio et al., 1999).

Quanto à razão clorofila *a/b*, foi observada interação entre os fatores tendo sido sala de crescimento e sistema de vedação convencional os que apresentaram maiores teores. Decetti (2004) observou que as variações na micropropagação de *Annona* foram menos evidentes em resposta às mudanças no nível de irradiância ou no sistema de vedação do frasco.

De modo geral, a redução no teor de clorofila total, quanto ao nível de irradiância é acompanhada pela redução nos teores de clorofila *a* e *b*. Dessa maneira, a razão clorofila *a/b* é mantida.

5.3 Características anatômicas

5.3.1 Características paradérmicas

A análise da epiderme na face abaxial demonstrou que não houve modificações no tipo de células epidérmicas. Ocorreu interação significativa

entre os fatores luz e sistema de vedação para as variáveis densidade e diâmetro polar, porém, para diâmetro equatorial, não foi observada interação entre os fatores (Tabela 4).

Verificou-se maior densidade estomática na interação casa de vegetação com sistema de vedação ventilada. Similarmente aos resultados obtidos neste trabalho, Deccetti (2004) observou que as maiores frequências estão associadas a altas irradiâncias.

TABELA 4. Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial dos estômatos de folhas de plântulas cultivadas sob diferentes ambientes de cultivo sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e sistema de vedação com ventilação natural e convencional.

		Densidade (mm²)	
		Ventilação	Convencional
CV		163,54aB*	91,74bA
SC		150,96aA	141,34aA
		Diâmetro polar (µm)	
		Ventilação	Convencional
CV		49,45aB	56,81aA
SC		39,15bA	41,54bA
		Diâmetro equatorial (µm)	
		CV	SC
		39,09 ^{a**}	29,13b
		Ventilação	Convencional
		34,08a	34,14a

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

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

O aumento no número de estômatos sob maiores níveis de irradiância e ventilação natural demonstra que plantas cultivadas *in vitro* têm tendência semelhante à de plantas cultivadas em outros ambientes, que é de aumentar a frequência de estômatos sob maior disponibilidade de luz e CO₂. O aumento no número de estômatos em plantas cultivadas *in vitro*, quando comparadas a

plantas cultivadas em ambientes naturais, tem sido reportado em diversos estudos que têm associado esse aumento, principalmente, à alta umidade relativa dentro dos frascos (Khan et al., 2003; Scuitti & Morini, 1995; Lee et al., 1988; Brainerd & Fuchigami, 1981).

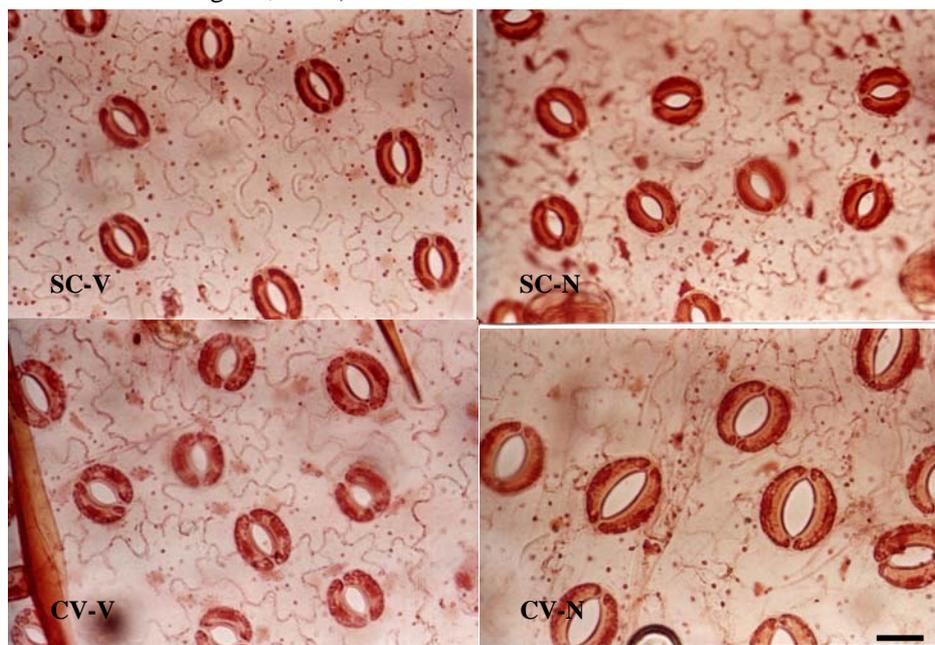


FIGURA 3. Secções paradérmicas na superfície abaxial de folhas de *D. grandiflora*. SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = sistema de vedação com ventilação e N = sistema de vedação convencional. Barra = 25µm. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Os estômatos das folhas que se desenvolveram em casa de vegetação apresentam formato elíptico e são maiores em sistema de vedação convencional. Os desenvolvidos em casa de vegetação com ventilação natural apresentam-se menores e também em forma elíptica (Figura 3).

Maior diâmetro polar foi obtido em plântulas cultivadas em casa de vegetação com vedação convencional. Quanto ao diâmetro equatorial, não houve

interação entre os fatores, tendo sido observada diferença significativa apenas no fator luz, e os melhores resultados foram observados em casa de vegetação.

De acordo com Khan et al. (2003), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam um funcionamento normal.

Alguns trabalhos demonstraram que a presença de uma fonte de carboidrato no meio, bem como o acúmulo de etileno no interior do frasco e, principalmente, a alta umidade relativa nos recipientes vedados convencionalmente resultam no desenvolvimento anormal dos estômatos e na reduzida capacidade de fechamento destes em resposta às condições severas do ambiente natural, como, por exemplo, a demanda evaporativa das plantas em ambientes *ex vitro* (Shackel et al., 1990; Sutter, 1988; Wardle et al., 1983; Fuchigami et al., 1981; Brainerd & Fuchigami, 1981).

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

5.3.2 Características do limbo foliar

Não houve interação entre os fatores para o espessamento das epidermes abaxial e adaxial, bem como para os parênquimas paliçádico e esponjoso, não (Tabela 5 e 6). Analisando-se os ambientes de cultivo separadamente, observaram-se diferenças significativas entre estes.

Para as epidermes abaxial e adaxial, a maior espessura foi observada em casa de vegetação. O mesmo foi observado para os parênquimas paliçádico e esponjoso.

TABELA 5. Espessura dos tecidos epidérmicos, parênquimas paliçádico e esponjoso de crisântemo desenvolvido durante cultivo *in vitro* sob ambiente de casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC).

	Epiderme abaxial (µm)	Epiderme adaxial (µm)	Esponjoso (µm)	Paliçádico (µm)
CV	24,00a	31,95a	110,70a	55,80a
SC	20,40b	27,50b	89,10b	33,50b

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

Para o sistema de vedação, foram observadas diferenças significativas apenas nas variáveis epiderme abaxial e parênquima esponjoso. Os demais não diferiram entre si. Porém, os maiores valores, em todas as variáveis, foram obtidos em sistema de vedação convencional.

TABELA 6. Espessura dos tecidos epidérmicos, parênquimas paliçádico e esponjoso de crisântemo desenvolvido durante cultivo *in vitro* sob sistema de vedação com ventilação natural e convencional.

	Epiderme abaxial (µm)	Epiderme adaxial (µm)	Esponjoso (µm)	Paliçádico (µm)
Ventilação	19,95b	29,10a	85,85b	44,45a
Convencional	24,45a	30,45a	112,95a	44,85a

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

Em todas as condições de cultivo, as epidermes apresentaram apenas uma camada de células (epiderme uniestratificada); as células não apresentavam um formato definido, revestidas por uma fina camada de cutícula.

O mesofilo, nas duas condições de cultivo, mostrou-se dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial). O parênquima paliçádico apresentou apenas uma camada de células, com células de formato indefinido e arranjadas desorganizadamente. Em espécies com mesofilo dorsiventral, a

grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico. Devido à forma e ao arranjo dessas células, os cloroplastos podem se dispor paralelamente às paredes celulares, aumentando a eficiência fotossintética (Menezes et al., 2003; Soares, 2005).

O parênquima esponjoso mostrou células também desuniformes e com espaços entre elas. Tais características são melhor visualizadas na Figura 4.

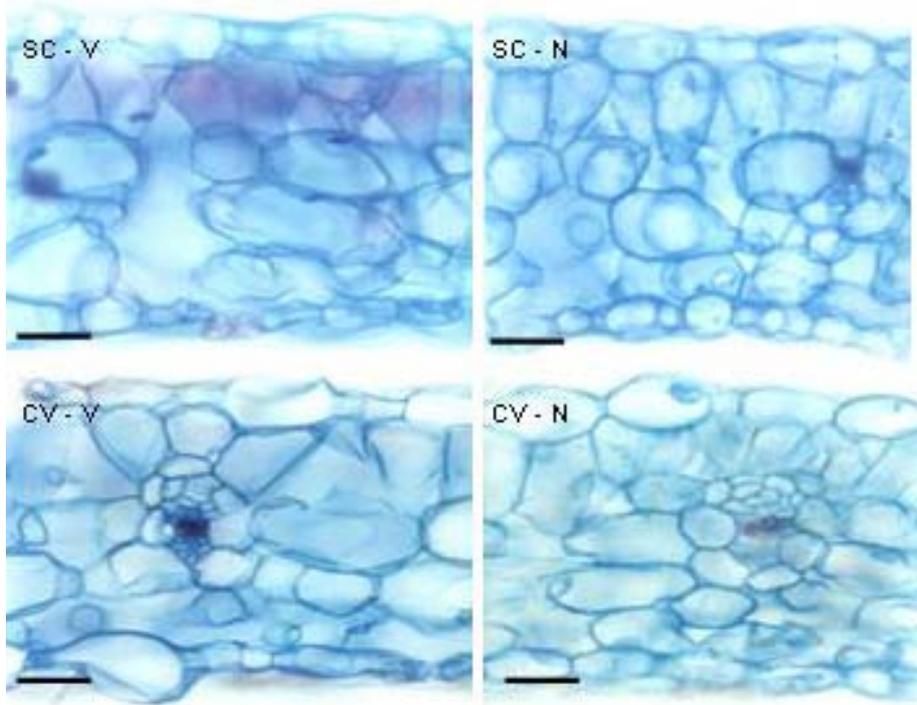


FIGURA 4. Seções transversais de folhas de *D. grandiflora* desenvolvidas durante o cultivo *in vitro* sob SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = ventilação natural e N = convencional. Barra = 70µm UFLA, Lavras, MG, 2006.

Independente do local de cultivo, as células do parênquima paliçádico são menores e mais desorganizadas em sistema de vedação com ventilação natural. Já para o tecido do parênquima esponjoso, o sistema de vedação não tem influência quando se observam espaços intercelulares que ocorrem em maior abundância no mesofilo de folhas cultivadas em sala de crescimento com menor irradiância.

Decchetti (2004), trabalhando com *Annona glaba* L. sob sistema de vedação ventilada e convencional e vários níveis de irradiância, observou que o aumento da irradiação interfere significativamente no desenvolvimento do tecido foliar. Foi observado neste estudo que as epidermes adaxial e abaxial foram maiores em níveis maiores de irradiância, porém, o sistema de vedação não influenciou no desenvolvimento dessa epiderme. Já nos tecidos que compõem o mesofilo, a espessura dos dois tecidos aumenta à medida que se aumentam os níveis de radiação, independente do sistema de vedação do frasco.

Foi observado por Decchetti (2004) um maior grau de espaçamento entre as células do parênquima esponjoso em tecidos cultivados sob baixa e média irradiância, corroborando as características observadas neste trabalho.

Tais observações foram descritas por Dimassi-Theriou & Bosabalidis (1997), durante o cultivo fotomixotrófico de *Actinidea deliciosa*, sob alta irradiância.

O aumento na espessura da folha e células paliçádicas mais alongadas constituem um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz (Lee et al., 2000) e evidenciam a plasticidade adaptativa da planta. A capacidade de alterar a estrutura da folha em resposta ao ambiente, principalmente ao nível de irradiância, tem sido comumente observada em diversas espécies cultivadas *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997; Serret et al., 1996; Donnelly & Vidaver, 1984).

Os resultados deste trabalho demonstram que diferentes ambientes de cultivo, principalmente sob diferentes níveis de irradiância, podem modificar o desenvolvimento da folha *in vitro*, tornando a anatomia desta mais semelhante à das plantas cultivadas em ambiente *in vivo*. Em adição, a estrutura da folha pode determinar a capacidade fotossintética da planta (Araus et al., 1986). Dessa maneira, o aumento na capacidade fotossintética de *D. grandiflora* em estágios do desenvolvimento *in vitro*, principalmente sob alta irradiância, pode estar associado ao maior desenvolvimento das características estruturais relacionadas ao processo fotossintético, como a maior diferenciação do mesófilo, principalmente do parênquima paliçádico.

5.4 Aclimatização

Após 30 dias do período de aclimatização, foi avaliada a taxa de sobrevivência das plântulas; 100% das plântulas provenientes de cultivo *in vitro* em casa de vegetação e sistema de vedação ventilada e convencional sobreviveram. Por outro lado, apenas 70% das plântulas cultivadas em sala de crescimento, também com os dois sistemas de vedação, sobreviveram (Figura 5). Os resultados apresentados mostram a capacidade de adaptação das plântulas, quando cultivadas em ambientes próximos ao natural, de sobreviverem durante o processo de aclimatização (Figura 6). Tais resultados já eram esperados, devido à adaptação anatômica das plântulas durante o cultivo *in vitro*; a funcionalidade dos estômatos era mais evidente em plântulas cultivadas em casa de vegetação. Mesmo com resultados superiores nesse ambiente de cultivo, a taxa de 70% para plântulas cultivadas em sala de crescimento também é aceitável. São poucos os trabalhos realizados com aclimatização de espécies cultivadas *in vitro* sob diferentes ambientes de cultivo, principalmente quando se utiliza sistema de vedação com ventilação natural. Portanto, torna-se difícil uma discussão a respeito dos resultados obtidos.

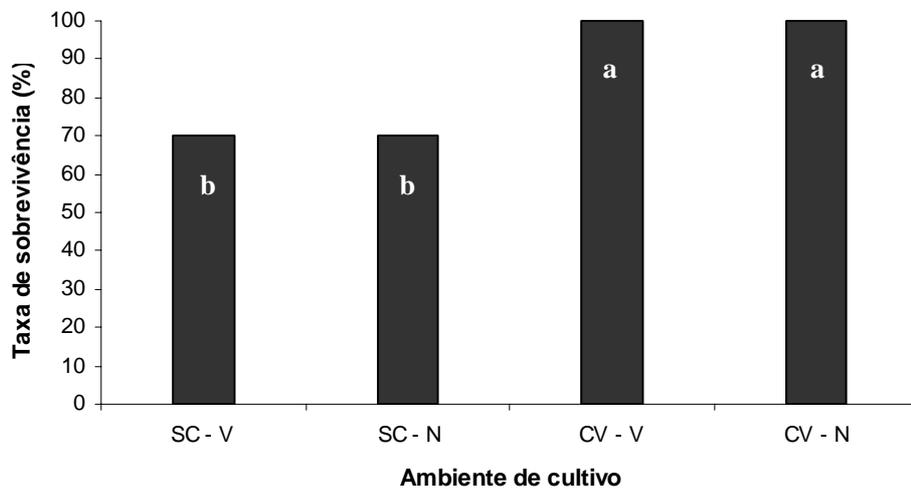


FIGURA 5. Eficiência de aclimatização após cultivo em diferentes ambientes de luz com diferentes sistemas de vedação. SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = sistema de vedação ventilada e N = sistema de vedação convencional. UFLA, Lavras, MG, 2006.



FIGURA 6. Aspecto das plantas floridas após cultivo em diferentes ambientes de luz, com frascos com sistema de vedação ventilado e convencional. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Quanto às características anatômicas, observou-se que só houve interação significativa entre os fatores nas variáveis diâmetros polar e equatorial. Para a densidade estomática, somente o fator luz influenciou na anatomia de estômatos (Figura7).

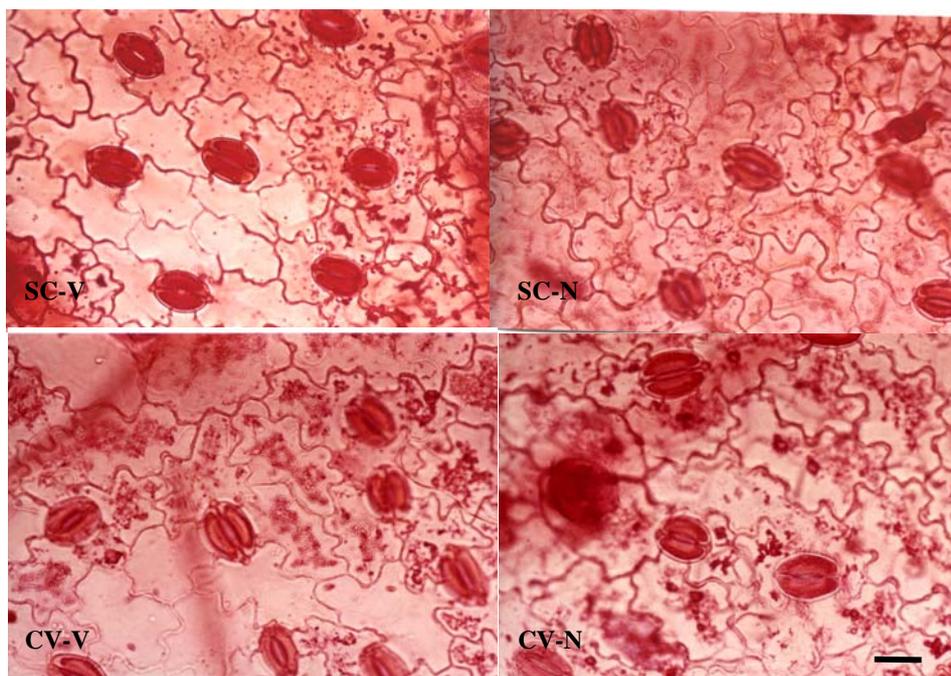


FIGURA 7. Secções paradérmicas na superfície abaxial de folhas de plântulas aclimatizadas de *D. grandiflora*. SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = sistema de vedação com ventilação e N = sistema de vedação convencional. Barra = 25 μ m. UFLA. Lavras, MG, 2006.

Maiores densidades estomáticas foram observadas em sala de crescimento, ao contrário dos resultados obtidos em folhas de plântulas cultivadas *in vitro* que evidenciaram melhor resultado em casa de vegetação. Observou-se também menor densidade de estômatos/mm² em folhas de plantas aclimatizadas. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, nos

quais a densidade estomática foi menor em folhas aclimatizadas do que aquelas obtidas *in vitro* (Dignart, 2006; Soares, 2005). Redução na densidade de estômatos durante o período de aclimatização é um processo bem característico dessa fase e já foi reportado por outros autores (Donnelly & Vidaver, 1984; Lee et al., 1985; 1988). Isso ocorre devido a células da epiderme, bem como dos demais tecidos foliares, apresentarem elevada taxa de crescimento e divisão durante o período de aclimatização. Esse crescimento ocorre em ambiente com umidade reduzida, promovendo melhor adaptação, principalmente em termos de funcionalidade dos estômatos e, conseqüentemente, diminuindo sua densidade.

TABELA 7. Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial dos estômatos de folhas de plântulas aclimatizadas cultivadas sob diferentes ambientes de luz, sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e sistema de vedação com ventilação natural e convencional.

Densidade (mm²)		
	CV	SC
	120,62b**	134,68a
	Ventilação	Convencional
	132,09a	123,21a
Diâmetro polar (µm)		
	Ventilação	Convencional
CV	44,77aA*	41,06aB
SC	40,16bB	41,73aA
Diâmetro Equatorial (µm)		
	Ventilação	Convencional
CV	27,45aA	27,22bA
SC	26,55aB	29,92aA

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

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

Para diâmetros polar e equatorial dos estômatos observados em folhas de plântulas cultivadas *in vitro*, houve interação significativa entre os fatores analisados.

Melhores resultados foram para diâmetro polar em casa de vegetação com sistema de vedação ventilada. O mesmo não ocorreu para anatomia *in vitro*, pois o sistema de vedação, para o qual ocorreu maior diâmetro polar foi o convencional em casa de vegetação. Já para diâmetro equatorial, o melhor resultado foi sala de crescimento com sistema de vedação convencional, diferentemente da anatomia *in vitro*, em que o melhor resultado foi casa de vegetação com sistema de vedação também convencional.

Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a funcionalidade dos estômatos mostra a capacidade de adaptação de plântulas cultivadas *in vitro* a ambientes naturais, sendo que quanto mais próximo é o ambiente de cultivo *in vitro* do ambiente natural, maior é a taxa de sobrevivência das plantas.

Quanto às características de mesofilo, somente epiderme adaxial não mostrou interação significativa entre os dois fatores. Por outro lado, os demais tecidos, epiderme adaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso, sofrem influência significativa da interação entre os fatores luz e vedação do frasco (Tabela 8).

Tanto a epiderme abaxial quanto a adaxial apresentavam células mais uniformes. O mesmo foi observado em células do parênquima paliçádico, que se apresentavam mais justapostas e organizadas; o parênquima esponjoso apresentou poucos espaços intercelulares, o que diferiu completamente dos mesófilos de plantas aclimatizadas das plantas *in vitro* (Figura 8).

TABELA 8. Espessura dos tecidos epidérmicos, parênquimas paliçádico e esponjoso de *D. grandiflora* desenvolvido durante cultivo *in vitro* sob ambiente de cultivo em casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC) e sistema de vedação com ventilação natural e convencional.

Epiderme abaxial (μm)		
	CV	SC
	30,15a**	31,57a
	Ventilação	Convencional
	30,15a	31,57a
Epiderme adaxial (μm)		
	Ventilação	Convencional
CV	34,20aA	30,30bB
SC	36,60aB	42,90aA
Parênquima esponjoso (μm)		
	Ventilação	Convencional
CV	153,30aA	132,00bB
SC	146,70aB	164,70aA
Parênquima paliçádico (μm)		
	Ventilação	Convencional
CV	64,20aA	57,77bA
SC	64,50aB	72,90aA

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

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

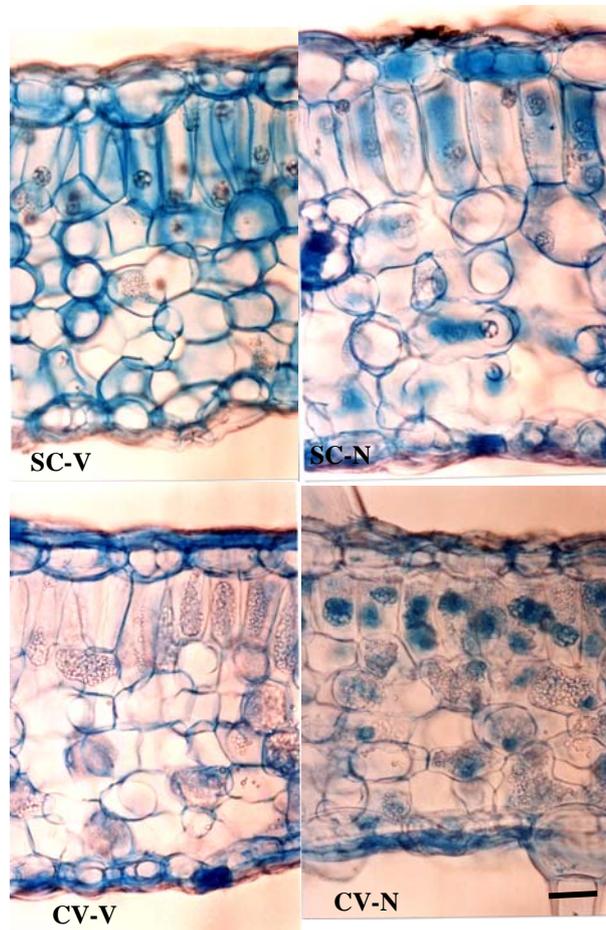


FIGURA 8. Seções transversais de folhas de plântulas aclimatizadas de *D. grandiflora* desenvolvidas durante o cultivo *in vitro* sob SC = sala de crescimento; CV = casa de vegetação; V = ventilação natural e N = convencional. Barra = 25 μ m. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A espessura da epiderme abaxial não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, tendo a maior espessura sido encontrada em sala de crescimento sob frasco com vedação ventilada. Comparando-se a epiderme abaxial de

plântulas cultivadas *in vitro*, constata-se que as mesmas apresentaram maior espessura quando cultivadas em maiores níveis de irradiância. Nas plantas aclimatizadas houve aumento nessa espessura quando as plantas cultivadas em menores níveis de irradiância foram colocadas em locais com maiores níveis de irradiância. Isso mostra que há tendência de aumentar a espessura de tecidos quando o nível de irradiação aumenta.

Resultados semelhantes foram encontrados para os demais tecidos, epiderme adaxial e parênquimas paliçádico e esponjoso, ocorrendo maiores espessuras nos tecidos cujas plântulas foram cultivadas durante micropropagação em sala de crescimento e sistema convencional de vedação. A anatomia dessas mesmas plantas analisadas, quando cultivadas *in vitro*, mostrou melhores resultados em ambiente casa de vegetação, ou seja, com maiores níveis de irradiação com o mesmo sistema de vedação convencional. Porém, quando todos os tratamentos foram expostos à alta irradiância, observou-se que os tratamentos em sala de crescimento aumentaram a espessura dos tecidos. A capacidade de alterar a estrutura da folha em resposta ao ambiente, principalmente ao nível de irradiância, tem sido comumente observada em diversas espécies cultivadas *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997; Serret et al., 1996; Donnelly & Vidaver, 1984).

6 CONCLUSÕES

O uso de luz natural e sistema de vedação com ventilação natural aumenta as taxas de crescimento, alterando a morfoanatomia de folhas de plântulas de crisântemo cultivadas sob esses ambientes.

Os teores de clorofilas diminuem com o aumento do nível de irradiação.

A alteração na anatomia das folhas indica uma adaptação da planta ao ambiente de cultivo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELBERG, J. et al. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.57, p.95-104, 1999.

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.58, p.31-37, 1999.

ARAUS, J.L. et al. Relationships between photosynthetic capacity and leaf structure in several shade plants. **American Journal of Botany**, v.73, n.12, p.1760-1770, 1986.

ARIGITA, L.; GONZALES, A.; TAMES, R.S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.166-173, 2002.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.34, p.1-15, 1949.

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.16, n.4, p.515-518, 1981.

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J.S.; ALLEMAND, C.J. Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23 x *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, p.207-217, 1997.

DECETTI, S.F.C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DENG, R.; DONNELLY, D. In vitro hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.10, p.1048-1051, 1993.

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.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. Effects of light, magnesium and sucrose of leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation in Kiwifruit cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, p.127-134, 1997.

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, Mar. 1984.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.3:** sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 1999. Software.

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

KANECHI, M.; OCHI, M. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.2, p.176-181, 1998.

KHAN, S.V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.46, n.2, p.161-166, 2003.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198p.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, v.27, p.1312-1314, 1992.

LABORIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-252, 1961.

LEE, 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.

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.1, p.167-171, Jan. 1988.

LEE, D.W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, v.87, n.4, p.447-455, 2000.

MENEZES, N.L. et al. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438p.

NGUYEN, Q.T. et al. Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.66, p.217-225, 2001.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In. DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.

SERRET, M.D. et al. The effect of different closure types, light, and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during the micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.47, p.217-230, 1996.

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

SHACKEL, K.A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E.G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.468-472, 1990.

SOARES, F.P. **Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 121p.Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

SUTTER, E.G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and Swwetgum plants after removal from in vitro culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.2, p.234-238, 1988.

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