



**AMBIENTE DE CULTIVO E RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS
DURANTE O PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO DE**
Annona glabra L.

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI

2004

58989

050175

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI

AMBIENTE DE CULTIVO E RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS
DURANTE O PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO DE
Annona glabra L.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. ANGELA MARIA SOARES

LAVRAS
GERAIS - BRASIL
2004

44
17-22
pg 24-25

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

Decetti, Soami Fernanda Caio

**Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de
micropropagação de *Annona glaba* L.: / Soami Fernanda Caio Decetti. -- Lavras :
UFLA, 2004.**

93 p. : il.

Orientadora: Angela Maria Soares.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

**1. Cultura de tecidos. 2. Propagação *In Vitro*. 3. Irradiância. 4. Ventilação
natural. 5. Aclimatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

CDD-631.532

-634.41

SOAMI FERNANDA CAIO DECCETTI

**AMBIENTE DE CULTIVO E RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS
DURANTE O PROCESSO DE MICROPROPAGAÇÃO DE
Annona glabra L.:**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 05 de novembro de 2004

Prof. RENATO PAIVA, PhD	UFLA
Prof. Dr. MOACIR PASCOAL	UFLA
Prof. Dr. EVARISTO MAURO DE CASTRO	UFLA
Pesq. Dr. LEONARDO FERREIRA DUTRA	EMBRAPA-CNPQ



Prof. Dra. ANGELA MARIA SOARES

UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

Aos meus pais Romero e Vera,

Às minhas irmãs Rojana, Ludmila e Jessica,

Aos meus anjinhos Bruno, Pietra e Lara

À minha avó Flora e minha tia Lúcia

Aos meus grandes amigos Ana e Gordo

Ao Palelo, por eternizarem meus momentos,

fazendo a vida valer a pena.

DEDICO

Ao meu cunhado Fernando e à minha irmã Rojana,

pelo imenso carinho e apoio nos momentos mais difíceis.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e serenidade;

Aos meus familiares, pelo apoio e carinho;

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso;

À Profa. Angela Maria Soares, por sua orientação e valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Evaristo Mauro de Castro e ao aluno Lucas pelo apoio na realização dos estudos anatômicos;

Aos amigos Alessandro e Shan pela imensurável ajuda na realização dos estudos bioquímicos;

Ao João Paulo por todo o apoio durante a realização deste trabalho;

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de tecidos: Mauro, Solange e Alvinho;

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal: Lena, Joel, Odorêncio, e Dartangan pelo agradável convívio;

Aos amigos: Grécia, Shan, Rupert, Morbeck, Alessandro, Breno, Rairys, Teresa, João Paulo, Espeto, Cristiano e Aurélio, pela amizade e companheirismo;

“A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos”.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Propagação e Cultura de tecidos	3
2.2 Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas	4
2.3 Comportamento das mudas durante a aclimatização	10
2.4 Tendências atuais da micropropagação: manipulação e controle das condições de cultivo	13
2.5 Micropropagação da <i>Annona glabra</i> L.	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Considerações gerais	26
3.2 Micropropagação	27
3.2.1 Material vegetal	27
3.2.2 Fase de multiplicação	27
3.2.3 Fase de enraizamento <i>in vitro</i>	28
3.2.4 Condições do ambiente de cultivo	29
3.3 Características avaliadas	32
3.3.1 Evolução do O ₂ fotossintético	32
3.3.2 Características bioquímicas	33
3.3.3 Características anatômicas	35
3.3.4 Perda de água do tecido foliar	36
3.3.5 Delineamento experimental e análise estatística	36

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Evolução do O ₂ fotossintético	37
4.2 Características bioquímicas	45
4.2.1 Carboidratos solúveis e amido	45
4.2.2 Teor de clorofila	51
4.3 Características da anatomia foliar	54
4.3.1 Estrutura anatômica foliar	54
4.3.2 Frequência e morfologia dos estômatos	61
4.4 Perda de água do tecido foliar	67
5 CONCLUSÕES	71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	85

RESUMO

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

A dificuldade de obtenção de mudas de *Annona glabra* L., uma espécie nativa que pertence à família das Annonaceas e apresenta grande potencial frutífero e fitofarmacológico, pode ser contornada através da utilização das técnicas de micropropagação. Considerando a provável influência do ambiente de cultivo sobre a qualidade das mudas, quanto à capacidade de crescimento e desenvolvimento após a transferência para o ambiente natural, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de três níveis de irradiância (baixa, média e alta DFFFA) e dois sistemas de vedação do recipiente de cultivo: convencional (frascos totalmente fechados) e ventilação natural (via membrana de polipropileno), os quais influenciam a disponibilidade de CO₂, a umidade relativa e a temperatura do ar no interior do recipiente, sobre as características morfofisiológicas dos explantes e plantas da *Annona glabra* L. cultivados fotomixotroficamente durante a multiplicação e o enraizamento. Os resultados desse estudo confirmam a influência do ambiente de cultivo sobre a fisiologia e a anatomia da espécie. Sob baixo nível de irradiância (50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e sistema convencional de vedação do recipiente (frascos totalmente fechados), as brotações e plantas apresentam baixa atividade fotossintética, sendo esta saturada por baixos níveis de DFFFA. O aumento no nível de irradiância (150 e 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) promove o aumento na atividade fotossintética e no ponto de saturação da fotossíntese pela luz. Sob alta irradiância e ventilação natural, principalmente durante a fase de enraizamento, aumenta a produção de açúcares solúveis e o acúmulo de sacarose e amido nas folhas. Em adição, as folhas que se desenvolvem sob estas condições ambientais apresentam maior diferenciação do parênquima paliçádico, grande número de cloroplastos nas células, estômatos com formas características e funcionais, e perdem menor quantidade de água quando submetidas às condições mais severas do ambiente externo ao recipiente. Os resultados desse estudo indicam que o aumento na disponibilidade de luz e a utilização de ventilação natural podem aumentar a capacidade fotossintética e de regulação da perda de água das plantas, favorecendo a sobrevivência e o crescimento após a transferência para o ambiente natural.

Orientadora: Angela Maria Soares - UFLA; Co-orientador: Renato Paiva - UFLA

ABSTRACT

DECCETTI, Soami Fernanda Caio. Culture environment and morphophysiological responses during the process of micropropagation of *Annona glabra* L.. 2004. 93 p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The difficulty to obtain seedlings of *Annona glabra* L., a native species member of Annonaceae family that presents a large fruit production and pharmacological potential, may be controlled through the use of micropropagation techniques. Considering the possible influence of growing environment upon the seedling's quality regarding its growth and development capacity after transfer to the natural environment, the objective of the present study was to evaluate the effect of three levels of irradiance (low, medium and high DFFFA) and two flasks sealing systems (conventional, tightly sealed flasks, and natural ventilation, using polypropylene membrane), which are able to influence the availability of CO₂, relative humidity and air temperature inside the flask, upon the morphophysiological characteristics of explants and plants of *Annona glabra* L grown photomixotrophically during multiplication and rooting. The results of these studies confirm the influence of the growing environment on the physiology and anatomy of the species. Under a low level of irradiance (50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) and conventional sealing system (tightly sealed flasks) both the sproutings and plants show a low photosynthetic activity which is saturated by low levels of DFFFA. The increase in the level of irradiance (150 and 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) promotes an increase in the photosynthetic activity and photosynthetic saturation light point. Under high irradiance and natural ventilation during the rooting phase, an increase in soluble sugars yield and accumulation of sucrose and starch was observed in leaves. In addition, the leaves that developed under these environmental conditions present increased differentiation of the palisade parenchyma, large number of chloroplasts in the cells, stomata with characteristic and functional shapes, and reduced water lost when submitted to severe environmental conditions. The results of this study indicate that the increase in the availability of light and the use of natural ventilation can increase photosynthetic capacity and regulate plant water loss, favoring survival and growth after the transfer to the natural environment.

Adviser: Angela Maria Soares - UFLA; Co-adviser: Renato Paiva - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A utilização das técnicas de propagação *in vitro*, principalmente a micropropagação, tem permitido contornar os obstáculos que atingem a propagação convencional de diversas espécies, inclusive da *Annona glabra* L., contribuindo para obtenção de um grande número de plantas mais uniformes, em tempo e espaço físico reduzidos. Entretanto, as plantas derivadas do cultivo *in vitro* requerem um período de aclimatização durante a transferência para a casa de vegetação ou para o campo, em função de alterações estruturais e fisiológicas induzidas por determinados fatores ambientais, característicos dos sistemas utilizados para a micropropagação, os quais reduzem a capacidade de sobrevivência e de crescimento das plantas após a transferência para o ambiente natural. A perda de vigor e a subsequente morte, devido ao dessecamento, são dois sérios problemas que ocorrem freqüentemente com as plantas que são transferidas das condições *in vitro*, mesmo sob um rigoroso controle para promover a adaptação da planta ao novo ambiente. Considerando que os custos de produção com o cultivo *in vitro* são altos, a perda significativa de plantas na subsequente aclimatização limita a utilização dessas técnicas para a propagação de muitas espécies.

Durante muito anos, os estudos envolvendo a micropropagação de plantas focalizaram apenas a composição de nutrientes do meio de cultura para a obtenção de altas taxas de multiplicação e de enraizamento e pouca atenção foi dada à integridade e à qualidade das plantas produzidas por essas técnicas. Recentemente, grande parte da comunidade científica modificou o enfoque dos estudos em função da necessidade de aumentar a eficiência das técnicas *in vitro* para viabilizar a sua utilização. Nesse sentido, tem sido fundamental a manipulação e o controle das condições ambientais, responsáveis pelas

alterações estruturais e fisiológicas durante o cultivo *in vitro*, para melhorar a qualidade das plantas micropropagadas, garantindo a sua capacidade de sobrevivência e de desenvolvimento no ambiente natural.

Diante dessas considerações, o presente estudo teve como objetivo desenvolver conhecimento em relação ao efeito de diferentes níveis de irradiância e sistemas de vedação do recipiente de cultivo, os quais também proporcionam variações nas condições de umidade relativa, temperatura e concentração de CO₂ da atmosfera no interior do recipiente, sobre as características morfofisiológicas da *Annona glabra* L. durante a multiplicação e o enraizamento, contribuindo assim, para aumentar a eficiência do sistema no protocolo estabelecido e otimizar a qualidade das plantas de *Annona glabra* L. micropropagadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Propagação e Cultura de tecidos

A utilização das técnicas de cultura de tecidos têm sido uma alternativa bastante eficaz para contornar os obstáculos que atingem a propagação convencional de diversas espécies e que limitam a obtenção de novos indivíduos ou contribuem para a heterogeneidade das mudas. Essas técnicas permitem o crescimento de células, tecidos ou órgãos isolados da planta mãe, em condições assépticas e controladas e, se baseiam na totipotencialidade das células da planta, o que significa que qualquer célula, no organismo vegetal, contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Torres & Caldas, 1990), desde que submetidas a tratamentos adequados.

A micropropagação, a qual se refere à propagação vegetativa *in vitro*, constitui a aplicação mais prática das técnicas de cultura de tecidos (Grattapaglia & Machado, 1998) e apresenta diversas vantagens quando comparada aos métodos convencionais de propagação vegetativa. Em inúmeras espécies agrícolas, florestais e ornamentais a utilização das técnicas de micropropagação têm permitido a obtenção de maior quantidade de mudas, livres de doenças e mais homogêneas, em tempo e espaço físico bastante reduzidos.

Embora a micropropagação se mostre eficaz para a rápida propagação de diversas espécies, a sua utilização comercial tem sido limitada, e muitas vezes inviabilizada, devido ao alto custo de produção como resultado, principalmente, do custo com laboratório, das baixas taxas de estabelecimento e crescimento *in vitro* e da alta mortalidade de plantas durante a aclimatização.

O crescimento e o desenvolvimento dos explantes e plantas, tanto *in vitro* quanto após a transferência para o ambiente natural (*ex vitro*), não dependem somente da composição de nutrientes do meio de cultura, mas também são afetados pela composição gasosa da atmosfera no interior do recipiente de cultivo (Zobayed et al., 1999). Diversos estudos conduzidos para determinar os efeitos desses fatores ambientais sobre a fisiologia e a morfologia das plantas micropropagadas têm enfatizado a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas para garantir a qualidade e a integridade das mudas (Kozai et al., 1997; Bag et al., 2000).

2.2 Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas

As vedações convencionais utilizadas nos recipientes, sob os quais as plantas crescem, para prevenir a contaminação por microorganismos, retardar a dessecação dos tecidos e a evaporação da água do meio de cultura, podem restringir a troca de gases entre o recipiente e a atmosfera externa. A consequência desse confinamento são condições ambientais peculiares, caracterizadas por alta umidade relativa, baixa disponibilidade de CO₂ e grande flutuação diurna na sua concentração, além de acúmulo de etileno e outras substâncias tóxicas (Zobayed et al., 1999). Em adição, nos sistemas clássicos de micropropagação utilizados em laboratórios comerciais, os explantes e plantas são cultivados sob baixos níveis de irradiância (15 - 75 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e altas concentrações de sacarose no meio de cultura (20 - 30 g.L⁻¹) (Kitaya et al., 1995; Kodym & Zapata-Arias, 1999).

Sob essas condições ambientais, a fotossíntese, a transpiração e a absorção de água e nutrientes são inibidas e a respiração no escuro elevada, resultando em pobre crescimento das brotações e plantas durante o cultivo *in*

vitro e em marcantes desordens morfológicas e fisiológicas no nível celular, de tecidos e de órgãos (Chenevard et al., 1997). Essas alterações reduzem a capacidade de sobrevivência e de crescimento das plantas micropropagadas no ambiente natural porque diminuem sua capacidade de suprir a necessidade de energia e carbono por meio da fotossíntese e de controlar eficientemente os processos de perda e absorção de água, mantendo um favorável balanço hídrico (Zobayed et al., 1999).

Na grande maioria das espécies micropropagadas, a transferência das mudas, de um ambiente protegido em meio estéril, com açúcares e atmosfera quanto à umidade saturada (*in vitro*), para um meio não estéril, sem suprimento de carbono e umidade reduzida (*ex vitro*), resulta na perda das plantas. Por outro lado, se a sobrevivência é alcançada, as taxas de crescimento são geralmente baixas. Dessa maneira, a perda de vigor e a subsequente morte devido ao dessecação são dois sérios problemas que ocorrem freqüentemente com as plantas que são transferidas das condições *in vitro* (Sutter & Hutzell, 1984).

Segundo Brainerd & Fuchigami (1981), o estresse hídrico é a principal causa do “choque no transplante”, sendo o resultado da transpiração excessiva por todas as partes da planta, principalmente das folhas, e da inadequada absorção de água pelas raízes. A alta umidade relativa do ar no interior do recipiente de cultivo (próxima de 100%) e a baixa irradiância são os dois principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecidos, levando a incapacidade das mudas produzidas *in vitro* de controlar a perda de água quando submetidas às condições do ambiente natural, como o aumento na demanda evaporativa (Fuchigami et al., 1981; Preece & Sutter, 1991; Khan et al., 2003).

A cutícula, juntamente com os estômatos, constituem os principais caminhos de perda de água nas folhas. A permeabilidade da cutícula a água é influenciada pela quantidade, estrutura e composição química da cera

epicuticular que a constitui. Estudos sobre as razões da excessiva perda de água após a transferência, revelaram que as folhas das plantas que crescem *in vitro* apresentam importantes alterações, como reduzida quantidade e menor estruturação de cêra epicuticular (Sutter & Langhans, 1979; Fuchigami et al., 1981; Sutter, 1988), aliado à alteração na sua composição química, com o aumento na proporção de componentes hidrofóbicos, mais permeáveis ao fluxo de água (Sutter, 1983). Essas alterações resultam no aumento da transpiração cuticular, visto que a cêra constitui uma importante barreira ao movimento de água através da cutícula.

A alta perda de água das plantas após a transferência também tem sido explicada por determinadas características estomáticas das plantas micropropagadas, como o aumento no tamanho e na densidade dos estômatos (Brainerd & Fuchigami, 1981; Lee et al., 1988; Sciutti & Morini, 1995); localização mais superficial dos estômatos na epiderme da folha (Lee et al., 1988; Capellades et al., 1990; Sciutti & Morini, 1995); alteração no desenvolvimento estomático, com o aumento na proporção de estômatos totalmente desenvolvidos, que contribuem efetivamente para a transpiração (Wardle et al., 1983) e o reduzido controle estomático (Lee et al., 1988; Capellades et al., 1990; Sciutti & Morini, 1995; Khan et al., 2003).

Durante o cultivo *in vitro* os estômatos permanecem sempre abertos, em função das condições ambientais que não favorecem a transpiração, e podem ser incapazes de se fechar rapidamente, impedindo a perda de água, quando a planta é retirada do recipiente de cultivo. A reduzida capacidade de fechamento dos estômatos em resposta às condições severas do ambiente natural tem sido observada em diversos estudos (Brainerd & Fuchigami, 1981; Fuchigami et al., 1981; Wardle et al., 1983; Sutter, 1988; Shackel et al., 1990) e associada ao desenvolvimento anormal das células-guarda, a baixa seletividade ao acúmulo de Na, K e Mg nas células-guarda (Shackel et al., 1990) e, principalmente, ao

colapso generalizado das células epidérmicas, causado pela extrema e rápida dessecação das plantas, que danifica o funcionamento dos estômatos, impedindo que estes permaneçam fechados (Sciutti & Morini, 1995). Diversos autores, entre estes Díaz-Pérez et al. (1995), têm considerado o reduzido controle estomático como a principal causa da alta condutância foliar inicial e da rápida dessecação das plantas após a transferência.

Outras alterações observadas na morfologia interna da folha, como a presença de hidatódios, exibindo gutação e com maior proximidade entre os elementos condutores de água do xilema e o poro de água (Donnelly et al., 1987; Donnelly & Skelton, 1987; Capellades et al., 1990); reduzida diferenciação do mesofilo das folhas com alta proporção de espaços intercelulares (Brainerd et al., 1981; Donnelly & Vidaver, 1984; Smith et al., 1986; Lee et al., 1988; Capellades et al., 1990; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997) e a ausência de tricomas ou a reduzida cobertura da epiderme por essas estruturas (Donnelly et al., 1987; Donnelly & Skelton, 1987) também podem contribuir para a excessiva perda de água após a transferência.

Por outro lado, fatores que aumentam a capacidade das plantas para transportar água, como a presença de raízes ou a eficiência dessas raízes, podem ser tão importantes quanto a regulação da perda de água pelos estômatos ou através da cutícula (Shackel et al., 1990). O substrato, que é o meio de sustentação ou suporte, é um dos fatores externos de maior influência sobre o enraizamento das brotações e a qualidade das raízes adventícias (Hoffmann, 1999).

O método clássico de micropropagação consiste no enraizamento *in vitro* de brotações em meio solidificado com ágar ou o produto equivalente. Embora o ágar, durante a fase de indução proporcione a emissão de maior número de raízes, quando comparado a outros substratos como vermiculita, areia e perlita, em função da maior facilidade de acesso aos nutrientes e pela condição

física uniforme em todo o meio de cultura, pode afetar o crescimento das raízes (Hutchinson, 1984) e condicionar o padrão morfológico das mesmas (Simões, 1988).

Diversos autores têm discutido a funcionalidade das raízes emitidas *in vitro* após a transferência das plantas para o ambiente natural, em função do sistema radicular adventício emitido em ágar ou produto equivalente ser, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares (Leite, 1995), ou da inadequada conexão vascular entre as raízes e as brotações (George, 1996). Estas situações reduzem a absorção e o fluxo de água e nutrientes no sentido ascendente e podem contribuir para o estresse hídrico, o qual ocorre quando a transpiração excede a absorção de água (Díaz-Pérez et al., 1995).

Em adição ao estresse hídrico, características fotossintéticas desempenham influência marcante sobre a sobrevivência e o crescimento das plantas micropropagadas após a transferência. De acordo com Serret et al. (1996), explantes ou plantas *in vitro* apresentam estrutura e fisiologia do aparelho fotossintético modificadas, resultantes, principalmente, dos baixos níveis de irradiância, limitada disponibilidade de CO₂ e elevada concentração de sacarose no meio de cultura. Esses fatores atuam em combinação resultando em plantas com atividade fotossintética insuficiente para promover o crescimento, tanto *in vitro* quanto após a transferência (De la Viña et al., 1999).

Convencionalmente, as plantas *in vitro* são expostas a baixos níveis de irradiância e adquirem características de plantas que se desenvolvem em ambientes sombreados, sendo as respostas fotossintéticas à luz também similares: baixas taxas fotossintéticas e baixos pontos de saturação da luz (Amâncio et al., 1999). Em adição, no interior dos recipientes totalmente fechados, as concentrações de CO₂, geralmente estão abaixo da concentração normal da atmosfera (340 µmol.mol⁻¹) (Zobayed et al., 2002), atingindo valores entre 100 e 200 µmol.mol⁻¹ ou menores, durante o período de luz (Serret et al.,

1996). Dessa maneira, a atividade fotossintética das plantas *in vitro* pode ser limitada pelos baixos níveis de irradiância e pela reduzida disponibilidade de CO₂ (Kozai et al., 1997).

Os estudos têm atribuído a reduzida fotossíntese *in vitro* à baixa concentração de clorofila (Smith et al., 1986); má formação dos cloroplastos, com menor desenvolvimento do grana (Serret et al., 1996; Lee et al., 1985); reduzido desenvolvimento do mesófilo foliar, com menor diferenciação do parênquima paliádico (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997) e a reduzida atividade da Rubisco (Grout & Donkin, 1987) e da Pcpase (Fischer & Alfermann, 1995).

As plantas *in vitro*, em função das condições ambientais desfavoráveis para a fotossíntese, possuem metabolismo do carbono predominantemente heterotrófico ou fotomixotrófico, sendo a sacarose no meio de cultura a única ou principal fonte de carbono e energia para o seu crescimento e desenvolvimento. Embora a sacarose seja considerada de importância primária para a organogênese *in vitro*, constituindo substrato para o crescimento e o desenvolvimento e influenciando o ciclo celular e os processos de diferenciação (Vaz et al., 1998), a utilização de altas concentrações no meio de cultura tem sido considerada uma das principais causas das reduzidas taxas fotossintéticas *in vitro*.

A inibição por "feedback" da fotossíntese constitui um mecanismo de regulação conhecido: o excesso ou o acúmulo de açúcares na folha, reprime a transcrição de muitos genes envolvidos no processo fotossintético (Sinhá & Roitsch, 2002). Diversos trabalhos têm demonstrado que o cultivo de plantas sob altas concentrações de sacarose (20 – 30 g.L⁻¹) resultam no acúmulo de açúcares solúveis, principalmente sacarose, e de amido na folha, na inibição da síntese de Rubisco e de clorofila e, conseqüentemente, na redução das taxas fotossintéticas

(Deng & Donnelly, 1993; Chenevard et al., 1997; Kanechi et al., 1998; Adelberg et al., 1999).

Nas plantas micropropagadas, o pobre desenvolvimento das folhas durante o cultivo *in vitro* tem sido considerado o principal fator de vulnerabilidade e a principal causa da baixa porcentagem de sobrevivência destas após a transferência para o ambiental natural (Lee et al., 1985; Nguyen et al., 1999). A perda de vigor observada nas plantas após a transferência para a casa de vegetação, de acordo com Marin & Gella (1988), deve-se a 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 da fotossíntese).

2.3 Comportamento das mudas durante a aclimatização

As mudas micropropagadas, em função da baixa taxa de crescimento *in vitro* e da reduzida capacidade fotossintética e de regulação da perda de água, são extremamente vulneráveis e requerem um período de aclimatização durante a transferência para o ambiente natural ou para um ambiente de transição, como a casa de vegetação ou telado (Lakso et al., 1986; Lee et al., 1985). Durante o período de aclimatização as plantas são submetidas à transição gradual do ambiente, de forma que não sofram efeitos que resultem em danos profundos ou mesmo em sua morte. Dessa forma, o processo de aclimatização tem sido considerado essencial e crítico para um sistema de micropropagação bem sucedido (Pospisilová et al., 1999; Bag et al., 2000).

A sobrevivência e o crescimento das mudas após a transferência para a casa de vegetação ou campo dependem do manejo adequado dos diversos fatores envolvidos na adaptação da planta à mudança ambiental e da formação de novas

estruturas, principalmente folhas, mais adaptadas às novas condições ambientais (Carvalho & Amâncio, 2002). Os principais fatores envolvidos na aclimatização das mudas micropropagadas são: o genótipo, a infecção por patógenos, o estresse hídrico, o estresse pela luz e, principalmente, a alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*) para fotoautotrófico (*ex vitro*) (Hoffmann, 1999; Kanechi et al., 1998; Díaz-Pérez et al., 1995; Lee et al., 1985).

A manutenção inicial das plantas, após a transferência, sob alta umidade relativa tem sido essencial para minimizar a perda das mudas (Desjardins et al., 1987). Após o período crítico inicial, a umidade relativa do ar é gradativamente reduzida. O período de decréscimo gradual da umidade relativa aumenta a capacidade de resposta dos estômatos, favorece a elaboração de cêras epicuticulares e reduz o murchamento após a transferência (Sciutti & Morini, 1995).

As plantas micropropagadas, geralmente, apresentam baixo ponto de saturação da luz (Amâncio et al., 1999) e quando são transferidas das condições *in vitro* e expostas a níveis mais altos de irradiância, geralmente não muito maiores que os recebidos *in vitro*, demonstram sintomas de estresse por fotoinibição ou foto-oxidação (Carvalho & Amâncio, 2002). Nesse contexto, o controle e a otimização da luz após a transferência também tem sido essencial para a sobrevivência da planta, sendo o período de decréscimo gradual da umidade relativa acompanhado pelo incremento progressivo na irradiância (George, 1996).

As novas folhas produzidas durante a aclimatização, possuem características de transição que podem conferir maior capacidade fotossintética (aquisição da fotoautotrofia) e de regulação hídrica às plantas (Sutter e Langhans, 1979; Smith et al., 1986; Wardle et al., 1983). De acordo com Capellades et al. (1990), o período de aclimatização *ex vitro* permite a redução na densidade de estômatos, altera o formato e a topografia destes e, de maneira

geral, favorece os diversos parâmetros foliares. Em adição, durante a aclimatização, o ganho de competência fotossintética e a aquisição da fotoautotrofia com a formação de novas folhas (Amâncio et al., 1999; Díaz-Pérez et al., 1995; Deng & Donnelly, 1993) e o desenvolvimento de um sistema radicular mais funcional (Chenevard et al., 1997) constituem comportamentos comuns às várias espécies cultivadas *in vitro*.

De acordo com Amâncio et al. (1999), baseado no comportamento fotossintético das folhas formadas *in vitro* durante a aclimatização, as espécies micropropagadas podem ser classificadas em competentes e não competentes: nas espécies não competentes a capacidade fotossintética das folhas formadas *in vitro* permanece baixa durante a aclimatização e, até que as novas folhas sejam formadas, grande parte do requerimento de energia para os processos de manutenção e crescimento, inclusive para a formação das folhas, é suprido pela mobilização dos carboidratos produzidos e armazenados nos propágulos durante a fase de enraizamento e, de maneira geral, as folhas formadas *in vitro* atuam apenas como órgãos de reserva; nas espécies competentes as folhas formadas *in vitro* aumentam sua capacidade fotossintética durante a aclimatização e permanecem na planta por períodos mais longos, desempenhando importante função, não somente como fonte de reserva para a formação de novas folhas, mas também contribuindo, através da fotossíntese, para o balanço positivo de carbono da planta.

Porém, na maioria das espécies, a atividade fotossintética das folhas formadas *in vitro* é baixa durante a aclimatização, sendo necessária rápida formação de novas folhas, com maior capacidade fotossintética, para a sobrevivência e o crescimento das plantas, visto que os carboidratos armazenados são completamente consumidos nos primeiros dias de aclimatização. Entretanto, a formação das folhas depende da atividade das

gemas, a qual é influenciada por fatores físicos, químicos e fisiológicos antes e durante a aclimatização (Chenevard et al., 1997).

Embora muitas plantas não tenham problemas durante a aclimatização e o período seja suficiente para corrigir as alterações induzidas *in vitro* e garantir a sobrevivência após a transferência, em muitas espécies ocorre significativa perda de mudas durante esse período (Lee et al., 1985; Capellades et al., 1990; Seko & Nishimura, 1996; Chenevard et al., 1997; De La Viña et al., 1999; Bag et al., 2000). A dificuldade de transferir com sucesso as plantas produzidas *in vitro* para a casa de vegetação ou campo constitui o maior obstáculo à aplicação prática das técnicas de cultura de tecidos, limitando economicamente a utilização desses sistemas para a micropropagação em escala comercial de muitas espécies (Myashita et al., 1996; Chenevard et al., 1997; Nguyen et al., 1999; De la Viña et al., 1999; Hoffmann, 1999; Kodym & Zapata-Arias, 1999), e demonstra a necessidade de otimizar e controlar o ambiente de cultivo para garantir altas taxas de multiplicação e enraizamento, favorecer o crescimento *in vitro* e o rápido estabelecimento da planta no ambiente natural (Kozai et al., 1997).

2.4 Tendências atuais da micropropagação : manipulação e controle das condições de cultivo

A necessidade de aumentar a eficiência das técnicas *in vitro* para viabilizar a sua utilização, face aos diversos problemas encontrados atualmente nos sistemas de micropropagação, impulsionou a condução de inúmeros estudos envolvendo a manipulação e o controle das condições de cultivo para otimizar o crescimento *in vitro*, aumentar a sobrevivência após a transferência e garantir a qualidade das plantas produzidas por essas técnicas.

Tradicionalmente, tem sido considerado que os explantes e plantas *in vitro* não possuem habilidade fotossintética para promover um balanço positivo de carbono e requerem a suplementação do meio de cultura com uma fonte artificial de carbono, como a sacarose, para o seu crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico durante os estágios de multiplicação e enraizamento (Niu et al., 1998). Entretanto, na última década, inúmeros estudos têm provado que as plantas *in vitro* possuem alta capacidade fotossintética e fotossintetizam de maneira satisfatória, reduzindo ou eliminando o requerimento da sacarose ou de qualquer outro açúcar no meio de cultura para o seu crescimento, se o ambiente de cultivo for controlado para que as condições sejam mais semelhantes a da casa de vegetação ou do campo (Cui et al., 2000).

A micropropagação fotoautotrófica representa um tipo especial de cultivo de explantes vegetais clorofilados caracterizada por fornecer condições ambientais, como o aumento na disponibilidade de CO₂ e nos níveis de radiação e a redução na umidade relativa, que induzem a fotossíntese e conferem às plantas a capacidade de crescimento e multiplicação em meio sem suplementos orgânicos (Fischer & Alfermann, 1995; Seko & Nishimura, 1996; Serret et al., 1996; Kanechi et al., 1998; Borkowska, 2001; Khan et al., 2003). Em adição, o ambiente de cultivo que promove o crescimento fotoautotrófico (na ausência de sacarose) também favorece o processo de transpiração da planta, beneficiando a absorção de água e elementos minerais do meio de cultura (Kozai et al., 1997).

‡ Diversas técnicas e metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de fornecer condições ambientais que promovam o aumento na capacidade fotossintética do material micropropagado e favoreçam a aquisição da fotoautotrofia *in vitro*, sendo as principais: a utilização de filtros de membranas com microporos permeáveis a gases, os quais promovem o aumento no intercâmbio 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) (Cui et al., 2000; Zobayed et al., 2002) ou enriquecida com CO₂ (sistema de ventilação forçada), visto que a concentração de CO₂ no interior do recipiente, devido à difusão, pode ser elevada quando a concentração de gases na atmosfera ao redor do recipiente é maior (Kanuchi et al., 1998; Nguyen et al., 2001; Khan et al., 2002 e 2003; Vyas & Purohit, 2003) substituição das lâmpadas fluorescentes comumente utilizadas por lâmpadas que forneçam maior densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), como as lâmpadas de halogênio (Kitaya et al., 1995; Kozai et al., 1997); utilização de iluminação natural (Kodym & Zapata-Arias, 1999) e alteração na direção da fonte de iluminação de superior para lateral (Kitaya et al., 1995; Miyashita et al., 1996).

Em diversas espécies tem sido demonstrado que a micropropagação fotoautotrófica (na ausência de sacarose) apresenta inúmeras vantagens quando comparada aos sistemas convencionais de micropropagação (heterotrófico ou fotomixotrófico) visto que promove maior crescimento e desenvolvimento *in vitro*, diminui o nível de contaminação biológica, permitindo a utilização de grandes recipientes; reduz a dependência de reguladores de crescimento, vitaminas e outras substâncias orgânicas, simplificando os meios de cultura; reduz as desordens morfológicas e fisiológicas e pode aumentar a taxa de sobrevivência, promovendo o rápido e vigoroso desenvolvimento das plantas durante a aclimatização (Kozai et al., 1997; Khan et al., 2002). Dessa maneira, os custos de produção, principalmente com laboratório, podem ser reduzidos, inclusive permitindo a automação/robotização dos processos de micropropagação (Hazarika, 2003), e a qualidade da planta pode ser significativamente melhorada.

O aumento na disponibilidade de CO₂ (1 - 5% v/v) e no nível de DFFFA (100 - 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) promovem significativo aumento nas taxas fotossintéticas e no crescimento *in vitro* de diversas espécies cultivadas na

ausência de sacarose, como *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. (Zobayed et al., 2002), *Eucalyptus tereticornis* (Khan et al., 2002), *Coffea arabusta* (Nguyen et al., 1999 e 2001), *Persea americana* Mill. (De la Viña et al., 1999), *Cucumis melo* L. (Adelberg et al., 1999); *Chrysanthemum* (Cristea et al., 1999); *Brassica oleracea* L. (Zobayed et al., 1999; Kanечи et al., 1998), *Lycopersicon esculentum* Mill (Niu et al., 1998); *Actinidia deliciosa* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997), *Gardenia jasminoides* (Serret et al., 1997), *Oryza sativa* L. (Seko & Nishimura, 1996), *Solanum tuberosum* (Kozai et al., 1995; Kitaya et al., 1995) e *Rubus idaeus* L. (Deng & Donnelly, 1993). Nessas espécies, o aumento nas taxas fotossintéticas e a aquisição da fotoautotrofia *in vitro* foram associados ao desenvolvimento de características fotossintéticas, como o aumento na concentração de clorofila e de carotenóides, na razão clorofila *a/b* e na quantidade e atividade da Rubisco e da Pcpase.

Nas plantas cultivadas sob condições fotoautotróficas o crescimento é caracterizado pelo aumento, principalmente, na matéria seca da parte aérea, no número de folhas formadas e na área foliar total (Kitaya et al., 1995; Cristea et al., 1999; Khan et al., 2003; Vyas & Purohit, 2003). Nas plantas cultivadas sob condições heterotróficas ou fotomixotróficas o acúmulo de carboidratos ocorre preferencialmente nas raízes (Cui et al., 2000). De acordo com De la Viña et al. (1999) o maior acúmulo de matéria seca nas folhas e nos caules indica que sob condições fotoautotróficas aumenta a capacidade para a formação de parte aérea e de órgãos fotossintéticos.

Muitas plantas cultivadas sob suficiente suprimento de luz e CO₂ crescem com sucesso na ausência de sacarose, sugerindo que a sacarose não é necessariamente requerida para a maioria das espécies que crescem *in vitro* sob condições fotoautotróficas (Cui et al., 2000). Porém, algumas espécies apresentam baixo nível de desenvolvimento da fotoautotrofia *in vitro* e a exclusão da sacarose do meio de cultura reduz significativamente a taxa de

multiplicação e de enraizamento e pode resultar na morte dos explantes (Vyas & Purohit, 2003). Nessas espécies, a sacarose promove o crescimento *in vitro* das plantas, porém reduz a fotossíntese *in vitro*, principalmente sob suficiente suprimento de luz e CO₂, visto que resulta no considerável acúmulo de sacarose e amido nas folhas e no decréscimo do conteúdo de clorofila (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997; Kanechi et al., 1998).

Geralmente, o efeito do aumento nos níveis de CO₂ e na DFFFA sobre a atividade fotossintética das plantas e o crescimento através da fotossíntese é claramente mais efetivo sob cultivo fotoautotrófico (na ausência de sacarose) do que sob cultivo fotomixotrófico (na presença de sacarose) (Deng & Donnelly, 1993; Seko & Nishimura, 1996; Serret et al., 1996 e 1997; Niu et al., 1998; De la Viña et al., 1999; Bag et al., 2000). De acordo Sinha & Roitsch (2002), sob cultivo fotoautotrófico, a utilização de níveis elevados de irradiância e CO₂ pode resultar no acúmulo de açúcares na folha e no decréscimo do conteúdo de clorofila, porém não reduz significativamente a eficiência fotossintética máxima.

Como já mencionado, o aumento no nível de irradiância durante o cultivo *in vitro* pode promover o desenvolvimento de características fotossintéticas. Entretanto, assim como acontece no campo, a absorção de um excesso de energia luminosa pelas folhas expostas a altos níveis de irradiância, pode levar a danos por fotoinibição e a redução nas taxas fotossintéticas, principalmente quando são mantidas outras condições convencionais *in vitro* que contribuem para o desenvolvimento da fotoinibição, como a baixa disponibilidade de CO₂ e altas temperaturas (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997). Em algumas espécies cultivadas *in vitro*, como banana (Kodym & Zapata-Arias, 1999), a fotoinibição resulta em menor concentração de açúcares solúveis nas plantas cultivadas sob alta DFFFA do que sob intensidade normal de luz, evidenciando a redução na fotossíntese sob alta irradiância, na necrose foliar e na perda de turgor das plantas.

↘
O aumento da concentração de CO₂ no interior do recipiente aumenta o ponto de saturação da fotossíntese pela luz e torna as plantas fotossinteticamente mais adaptadas a regimes de luz mais altos (Nguyen et al., 1999). Dessa maneira, o aumento na disponibilidade de CO₂ pode ser importante para impedir os danos por fotoinibição e permitir uma resposta fotossintética positiva das plantas cultivadas sob altos níveis de radiação (Kanechi et al., 1998). Em adição, segundo Serret et al. (1996 e 1997), plantas de *gardenia jasminoides* que crescem em meio sem sacarose e com fotoautotrofia mais desenvolvida são mais resistentes aos danos por fotoinibição *in vitro* em função do maior desenvolvimento dos mecanismos de fotoproteção do PSII envolvidos na dissipação do excesso de energia.

Em adição ao nível de DFFFA e CO₂, outros fatores ambientais como o fotoperíodo e a diferença de temperatura entre o período de luz e de escuro também influenciam a fotossíntese e o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro* (Kozai et al., 1997). Sob níveis elevados de CO₂ e de DFFFA, a utilização de fotoperíodo de 24 horas aumenta o crescimento fotoautotrófico de arroz (Seko & Nishimura, 1996) e fotoperíodo de 16 horas, quando comparado ao de 8 horas, aumenta o crescimento *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. (Kozai et al., 1995), principalmente porque induzem a formação de parte aérea. A diferença positiva (+8 °C) entre a temperatura do período de luz e de escuro, quando comparada à diferença de 0 ou de -8 °C, também aumenta significativamente o crescimento *in vitro*, resultando em plantas de *Rehmannia glutinosa* com maior matéria fresca e maior área foliar (Cui et al., 2000). Entretanto, Kitaya et al. (1995) sugerem que a utilização de diferenças de temperatura de 0 ou negativas, aliadas a altos níveis de radiação, mantém a produção de plantas com maior área foliar e maior número de folhas, porém com menor alongação da parte aérea (internódio), conferindo maior qualidade às mudas micropropagadas e tornando-as mais adequadas para a aclimatização.

A presença do ágar como agente geleificante do meio de cultura também pode restringir a atividade fotossintética das plantas *in vitro* que crescem sob suficiente suprimento de CO₂ e luz. A utilização de suportes que permitem maior aeração, como fibras de celulose e vermiculita, resultam em melhor desenvolvimento do sistema radicular e maior absorção de água e nutrientes, contribuindo para o aumento na fotossíntese líquida e no crescimento *in vitro* das plantas, como reportado em *Eucalyptus tereticornis* (Khan et al., 2002), *Ipomea batatas* L. (Afreen et al., 2000; Zobayed et al., 2000b) e *Coffea arabusta* (Nguyen et al., 1999).

Tem sido demonstrado que algumas práticas simples podem auxiliar o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro*, como a utilização de maiores concentrações de Mg no meio de cultura, o qual participa da construção de moléculas de clorofila e regula a atividade de carboxilases, aumentando significativamente a fotossíntese *in vitro* (Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997) ou a manutenção de folhas, ou parte delas, nos segmentos nodais, freqüentemente utilizados como explantes iniciais para a micropropagação, visto que a regeneração e o crescimento das brotações podem ser acelerados pela utilização dos carboidratos produzidos pela fotossíntese dessas folhas (Miyashita et al., 1996).

O aumento na capacidade fotossintética das plantas e o estabelecimento da fotoautotrofia *in vitro* podem favorecer a sobrevivência e o crescimento das plantas após a transferência, reduzindo o período de aclimatização *ex vitro* (Kanechi et al., 1998; Hoffmann, 1999), visto que as folhas formadas *in vitro* não constituem apenas órgãos de reserva e desempenham importante papel durante a aclimatização, contribuindo através da fotossíntese para a sobrevivência e o crescimento da planta até que as novas folhas sejam formadas (De la Viña et al., 1999). Em adição, as plantas fotoautotróficas apresentam melhores características morfoanatômicas (Adelberg et al., 1999), como o

melhor desenvolvimento do sistema radicular; maior diferenciação do parênquima paliçádico e menor proporção de espaços intercelulares; cutículas mais espessas, com maior deposição de cêra epicuticular; redução na densidade de estômatos e melhor funcionamento destes (Serret et al., 1996; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997; Khan et al., 2003). Estas características podem prevenir o desenvolvimento do estresse hídrico durante a aclimatização e reduzir o murchamento após a transferência (Serret et al., 1997), visto que conferem as plantas maior capacidade de controlar a transpiração, impedindo a excessiva perda de água, e maior capacidade para manter o fluxo de água no sentido ascendente (Zobayed et al., 2000a).

Nesse contexto, em diversas espécies, a micropropagação fotoautotrófica produz plantas com melhores características morfofisiológicas para a aclimatização do que as convencionais plantas heterotróficas e fotomixotróficas, resultando em aumento na taxa de sobrevivência e no rápido crescimento das plantas após a transferência para a casa de vegetação (Deng e Donnelly, 1993). Porém, resultados contraditórios têm sido obtidos em algumas espécies, como *Persea americana* Mill. (De la Viña et al., 1999) e *Panax quiquefolius* L. (Sfendla et al., 2003), nas quais os benefícios promovidos pela redução na sacarose e o aumento nos níveis de radiação e CO₂ não foram suficientes para promover aumento significativo na taxa de sobrevivência durante a aclimatização, embora as plantas fotoautotróficas que sobreviveram tenham apresentado maior crescimento, quando comparadas às plantas fotomixotróficas.

Em plantas cultivadas sob altas concentrações de sacarose, a maior disponibilidade de carbono facilmente assimilável aumenta a síntese dos denominados componentes do “sistema de proteção”, constituídos pelos carboidratos estruturais (celulose, hemicelulose e lignina), e de substâncias de reserva, principalmente o amido. Esse fato pode ser de extrema importância para

a planta durante a aclimatização, visto que confere maior resistência aos estresses do ambiente natural, principalmente os danos por fotoinibição (Serret et al., 2001), e auxilia a planta fornecendo substrato para o crescimento até que as novas folhas sejam formadas (Serret et al., 1997). Nesse contexto, a baixa taxa de sobrevivência das plantas fotoautotróficas provavelmente esteja associada à pequena reserva de carboidratos e as grandes áreas foliares dessas plantas, que podem contribuir para o estresse hídrico e para a fotoinibição (De la Viña et al., 1999).

O problema do baixo nível de carboidratos nas plantas durante e após a aclimatização pode ser contornado através da otimização das condições ambientais de aclimatização, quanto aos níveis de irradiância e de CO₂ na atmosfera. Estas estratégias podem acelerar o desenvolvimento de novas estruturas, principalmente folhas, e aumentar a capacidade fotossintética destas, resultando em alta produção de açúcares solúveis e no acúmulo de amido, fatos essenciais para a sobrevivência e o crescimento das mudas micropropagadas (Chenevard et al., 1997). O acúmulo de carboidratos, como o amido, evidencia a completa aquisição da fotoautotrofia *ex vitro*, pois o amido acumulado durante o dia suporta o crescimento da planta à noite (Amâncio et al., 1999).

Alguns trabalhos demonstraram que a aclimatização sob níveis mais elevados de irradiância exerce influência direta e positiva sobre a transição das características *in vitro* e sobre a eficiência fotossintética final das mudas micropropagadas, sem sintomas de estresses pela luz. De acordo com Amâncio et al. (1999), as plantas de videira aclimatizadas sob densidade do fluxo de fótons (DFFFA) de 90 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, quando comparado a 40 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, investem mais no desenvolvimento de novas folhas do que no desenvolvimento do aparelho fotossintético das folhas formadas *in vitro*, o que resulta em aumento na taxa fotossintética e no crescimento das plantas, sendo a biomassa total e a

área foliar dessas plantas quatro vezes maiores que das plantas aclimatizadas sob DFFFA mais próximas daquelas utilizadas durante o cultivo *in vitro*.

↘ A atividade fotossintética durante a aclimatização também pode ser limitada pela disponibilidade de CO₂, visto que as técnicas utilizadas para a manutenção de alta umidade relativa após a transferência, impedindo a excessiva perda de água das plantas, constituem outro sistema fechado e possivelmente repetem a condição sub-ótima quanto à concentração de CO₂. Alguns trabalhos têm demonstrado que o crescimento da planta pode ser estimulado pelo aumento nas concentrações de CO₂ da atmosfera. A aclimatização de mudas micropropagadas de videira sob 1200 μmolmol⁻¹ de CO₂ (Lakso et al., 1986) e de morango sob 900 – 1500 μmolmol⁻¹ de CO₂ (Desjardins et al., 1987), quando comparado a 350 μmolmol⁻¹, promove o aumento na área foliar total e no crescimento do sistema radicular, resultando em aumento na capacidade fotossintética das plantas e na maior resistência dessas ao estresse hídrico. Em adição, sob concentração mais elevada de CO₂ (700 μmolmol⁻¹) diminui a possibilidade de ocorrer fotoinibição sob alta irradiância em função de maior proporção da energia absorvida ser dirigida para as reações bioquímicas, e diminui os danos por foto-oxidação, visto que aumenta a síntese dos componentes do sistema de proteção a esse estresse, como o 'pool' de glutatona responsável pela eliminação das espécies de oxigênio ativo produzidos pelo excesso de elétrons provenientes da oxidação da água, quando a DFFFA é maior do que a requerida para a fixação de CO₂ (Carvalho & Amâncio, 2002).

Embora seja certo que a alteração do ambiente de cultivo possa favorecer a capacidade fotoautotrófica, a dificuldade tem sido em determinar qual o grau de fotoautotrofia atingida pela planta em uma determinada condição de cultivo, principalmente em função das metodologias disponíveis para esses tipos de estudo (Serret et al., 1996 e 1997). Além disso, uma única característica

da planta ou um único fator ambiental não podem expressar um processo tão complexo como a aquisição da fotoautotrofia.

É indiscutível a necessidade do controle ambiental durante os estágios de multiplicação e enraizamento para um rápido e uniforme crescimento de mudas micropropagadas de alta qualidade (Miyashita, et al., 1996). Porém, torna-se fundamental o conhecimento de todas as interações entre as condições ambientais e as respostas morfofisiológicas das plantas micropropagadas. Somente dessa maneira, podem ser realmente definidas quais condições de cultivo podem ser manipuladas, de maneira viável, com o objetivo de eliminar, ou pelo menos amenizar, os problemas encontrados atualmente nos sistemas de micropropagação, aumentando a eficiência do sistema em protocolos estabelecidos ou viabilizando o uso da técnica em outras espécies de interesse econômico com dificuldades de propagação por métodos convencionais.

2.5 Micropropagação da *Annona glabra* L.

A *Annona glabra* L. é uma espécie frutífera tropical, pertencente à família *Annonaceae*, que ocorre naturalmente na América do Sul (Le et al., 1998) e foi introduzida na Ásia, África e Austrália (Swarbrick, 1993; Swarbrick & Skarrat, 1994), conhecida popularmente como “araticum do brejo”, no Brasil e “pond apple” na Austrália e Ásia, e que se destaca pelo fornecimento de frutos bastante saborosos de uso *in natura* ou processados e, mais recentemente pelas propriedades biológicas de suas sementes, folhas e frutos (Padmaja et al., 1995; Ming et al., 1998).

Em função do crescente interesse comercial por espécies de Annonáceas e da propagação da *Annona glabra* L., e de maneira geral das *Annonas*, ser limitada por métodos convencionais, que dificultam a obtenção de novos

indivíduos ou contribuem para a produção de plantas muito heterogêneas, de porte elevado, com menor precocidade e de frutificação mais tardia (Manica, 1994), a espécie tem sido estudada no Laboratório de Cultura de tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal/Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), como parte das atividades que integram as pesquisas para o desenvolvimento de metodologias alternativas de propagação de espécies nativas.

A propagação clonal utilizando técnicas de micropropagação tem-se mostrado uma importante alternativa para a propagação da *Annona glabra* L. (Deccetti, 2000) e de outras espécies de *Annona* (Rasai et al., 1995), permitindo a rápida obtenção de plantas mais uniformes. Porém, assim como acontece com outras espécies micropropagadas, há necessidade de aumentar a eficiência das técnicas *in vitro* para otimizar as taxas de multiplicação e de enraizamento e favorecer a sobrevivência e o crescimento das plantas após a transferência para o ambiente natural

De acordo com Zobayed et al. (2002), o cultivo fotoautotrófico da *Annona esquamosa* L. e da *Annona muricata* L. sob alta DFFFA e aumento no intercâmbio de gases entre o recipiente de cultivo e a atmosfera externa, principalmente sob ventilação forçada (atmosfera externa enriquecida com CO₂), aumenta a regeneração e o crescimento das brotações, como resultado do aumento no número de folhas, na área foliar total e na capacidade fotossintética, e reduz a abscisão foliar, desordem fisiológica freqüentemente observada nessas espécies, em função do menor acúmulo de etileno no recipiente, tornando as brotações mais adequadas para a fase posterior de enraizamento.

Entretanto poucos estudos foram conduzidos com as espécies de *Annonas* e o conhecimento da influência que o ambiente de cultivo, principalmente durante o enraizamento, exerce sobre as características morfofisiológicas das plantas de *Annona glabra* L. micropropagadas pode

otimizar o crescimento *in vitro* da espécie e favorecer o seu desenvolvimento após a transferência para o ambiente natural, contribuindo efetivamente para viabilizar a utilização dessas técnicas para a propagação em grande escala da *Annona glabra* L. e de outras espécies de *Annona*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos localizado no Setor de Fisiologia Vegetal/Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A *Annona glabra* L, espécie do presente estudo, foi selecionada em função do crescente interesse comercial por espécies de Anonáceas, por seu potencial frutífero e fitofarmacológico, e pela existência de um protocolo de micropropagação, que permite contornar os obstáculos que atingem a sua propagação por métodos convencionais.

Nos estudos preliminares que definiram a metodologia para a micropropagação da espécie foram utilizadas técnicas usuais quanto às condições do ambiente de cultivo, como baixos níveis de irradiância, recipientes totalmente fechados e altas concentrações de sacarose no meio de cultura (Deccetti et al., 2000). Sob essas condições, os tratamentos que resultaram nas maiores taxas de multiplicação (1,5 brotação/segmento nodal) e de enraizamento (2 raízes/brotação e raízes com comprimento médio de 2,0 cm) definiram o protocolo utilizado neste estudo.

3.2 Micropropagação

3.2.1 Material vegetal

Foram utilizados como explantes primários para a micropropagação segmentos nodais obtidos através da secção das hastes caulinares jovens (não lenhosas), contendo apenas uma gema e tamanho aproximado de 1,5 a 2,0 cm, derivados de plantas matrizes com três anos de idade, obtidas por germinação *in vitro* e mantidas em sala de crescimento sob condições ambientais controladas.

Para a desinfestação, os explantes foram mantidos em água corrente por 40 minutos e lavados com detergente comercial. A seguir, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto em associação com a imersão em hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, foram lavados por três vezes em água destilada e autoclavada para eliminação do excesso de soluções desinfestantes. Após a desinfestação os explantes foram mantidos em solução de ácido ascórbico (200 mg.L^{-1}) por 20 minutos.

3.2.2 Fase de multiplicação

Os explantes (segmentos nodais) foram inoculados na posição vertical em frascos de 285 mL contendo 40 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar, enriquecido com 20 g.L^{-1} de sacarose e sem a adição de reguladores de crescimento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 antes da autoclavagem.

Após a inoculação de um segmento nodal em cada frasco, esses foram transferidos para sala de crescimento com temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e mantidos no escuro durante 15 dias. Após este período, os segmentos nodais

foram cultivados por 30 dias sob fotoperíodo de 16 horas e diferentes ambientes de cultivo, quanto à densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos incidente sobre o recipiente de cultivo (frasco), umidade relativa, temperatura e concentração de CO₂ no interior do recipiente, que definiram os diferentes tratamentos, como está apresentado no item 3.2.4.

3.2.3 Fase de enraizamento *in vitro*

Para promover o enraizamento *in vitro*, as brotações apicais, com no mínimo 2 cm de comprimento e 2-3 folhas mais próximas do meristema apical, removidas do meio de multiplicação, foram transferidas para frascos de 270 mL contendo 40 mL do meio Wood Plant Medium (WPM), definido por Lloyd & McCown (1980), com metade da concentração de sais, enriquecido com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6,5 g.L⁻¹ de ágar, 4 g.L⁻¹ de carvão ativado e sem a adição de reguladores de crescimento. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,0 antes da autoclavagem para estimular o enraizamento, como definido em estudos preliminares.

Foi inoculado, em câmara de fluxo laminar, apenas uma brotação em cada frasco. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura constante de 25 ± 1°C e cultivados por um período de 30 dias sob fotoperíodo de 16 horas e os mesmos ambientes de cultivo que definiram os tratamentos durante a fase de multiplicação, como apresentado no item a seguir.

3.2.4 Condições do ambiente de cultivo

Para as fases de multiplicação e enraizamento foram utilizados três níveis de densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA): $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (baixa irradiância), $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (média irradiância) e $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (alta irradiância). A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca-fria e a intensidade de luz foi ajustada em função do número de lâmpadas e da distância entre as lâmpadas e o recipiente de cultivo. As medidas de DFFFA foram obtidas utilizando-se o quantômetro acoplado a um porômetro (modelo 1600M; LI-COR, Lincoln, Neb.).

Em cada nível de irradiância, foram utilizados dois sistemas diferentes para vedação do recipiente de cultivo (frasco): tampas plásticas transparentes e selamento com parafilme, que restringem as trocas de gases entre o recipiente e a atmosfera externa (sistema convencional); e tampas plásticas modificadas, contendo um par de orifícios (10 mm de diâmetro) cobertos por dois filtros de membranas permeáveis a gases (Milliseal, Millipore, Tokyo) com poros de $0,5 \mu\text{m}$, que aumentam a ventilação no recipiente de cultivo (sistema de ventilação natural) (Figura 1). Devido à evaporação da água do meio de cultura e da dessecação dos explantes, o sistema de ventilação natural foi utilizado apenas nos últimos dez dias do período de cultivo.

Em função do efeito das condições de irradiância e do sistema de vedação na atmosfera do ambiente de cultivo, foram feitas avaliações da umidade relativa, temperatura e concentração de CO_2 no interior do recipiente. Para determinar a umidade relativa e a temperatura do ar utilizou-se um sensor LI-104, adequadamente introduzido no recipiente e acoplado a um sistema de registro (LI 1400; Licor, Lincoln, Neb) (Figura 2). Para a medida da concentração de CO_2 no interior do recipiente utilizou-se um IRGA (ADC-LCA-4., Hoddesdon, UK). Todas as medidas foram realizadas 7 horas

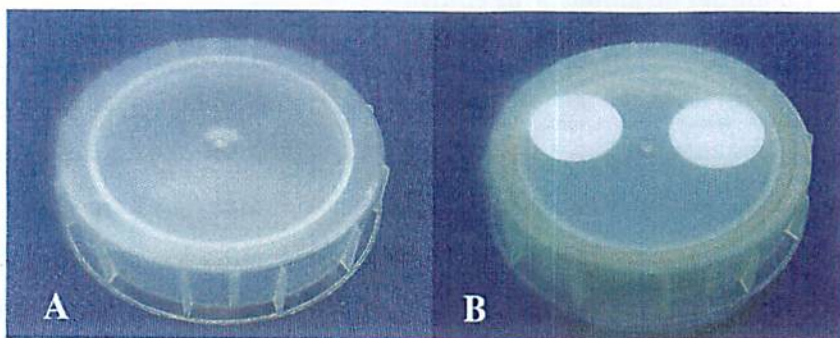


Figura 1. Tampas plásticas utilizadas para a vedação dos recipientes de cultivo. A) Tampas convencionais; B) Tampas modificadas com um par de membranas permeáveis a gases. UFLA, Lavras, MG, 2004

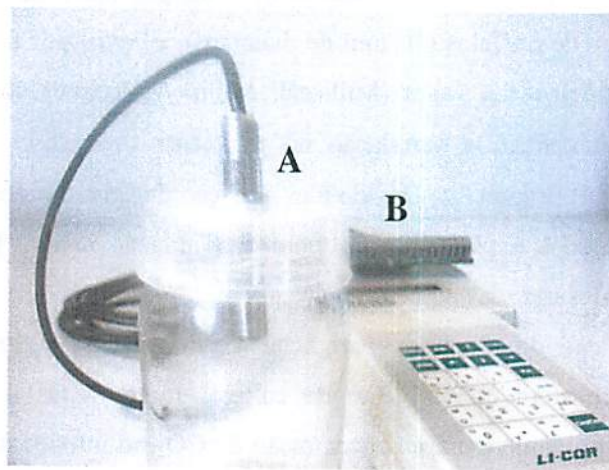


Figura 2. Metodologia utilizada para determinar a umidade relativa e a temperatura do ar no interior do recipiente de cultivo. A) Sensor introduzido no recipiente; B) Sistema de registro (Datalogger). UFLA, Lavras, MG, 2004

após o início do período de iluminação, quando as condições da atmosfera no interior do recipiente de cultivo estavam estabilizadas. Em adição, foram calculados o déficit de pressão de vapor da atmosfera (DPV) a que as plantas e brotações foram submetidas durante o cultivo, sendo: $DPV = es - ea$, onde es corresponde à pressão de saturação de vapor determinada em função da temperatura do ar no recipiente em °C ($es = 0,61078 \exp(17,269T/T+237,30)$) e ea , a pressão atual de vapor ($ea = (UR.es)/100$), onde UR é a umidade relativa do ar no interior do recipiente. A tabela 1 apresenta as condições da atmosfera do ambiente de cultivo referente às diferentes condições de irradiância e sistemas de vedação do frasco. Sob ventilação natural, quando comparado ao sistema convencional, independente do nível de irradiância, diminui a umidade relativa e a temperatura do ar e aumenta o DPV e a disponibilidade de CO₂ no interior do recipiente.

Tabela 1. Condições da atmosfera do ambiente de cultivo em função do sistema de vedação do frasco: convencional (C) ou ventilação natural (N); e do nível de irradiância: baixa (B), média (M) e alta (A). UFLA, Lavras, MG, 2004.

Ambiente de cultivo	Temperatura (°C)	UR (%)	DPV (kPa)	[CO ₂] (μmolmol ⁻¹)
CB	28	90	0,46	150 – 300
CM	30	90	0,55	150 – 300
CA	32	90	0,58	150 – 300
NB	25	70	0,89	400 – 500
NM	26	70	1,02	400 – 500
NA	27	70	1,12	400 – 500

3.3 Características avaliadas

Ao término das fases de multiplicação e enraizamento foram analisadas a evolução do O₂ fotossintético e as características bioquímicas e anatômicas das brotações e plantas cultivadas sob os diferentes ambientes. As características hídricas foram determinadas ao final do período de enraizamento. Para efeito de comparação foram quantificados os teores de clorofila em plantas matrizes com três anos de idade, obtidas por germinação *in vitro* e mantidas em sala de crescimento. O estudo anatômico também foi realizado em plantas que crescem *in vivo*, obtidas por germinação convencional, mantidas por um ano em sala de crescimento sob condições controladas e aclimatizadas no campo por um período de 41 dias através do aumento progressivo no nível de radiação solar incidente.

3.3.1 Evolução do O₂ fotossintético

Para determinar a resposta fotossintética à luz das brotações e plantas que crescem sob os diferentes ambientes de cultivo foram medidas as taxas de evolução do O₂ sob saturação de CO₂ e diferentes níveis de DFFFA (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), utilizando o monitor de oxigênio com eletrodo tipo Clark (Hansatech, UK).

Foi utilizado como fonte de luz uma lâmpada de halogênio, a qual fornece intensidade máxima de luz de 1600 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Os diferentes níveis de DFFFA, medidos utilizando o quantômetro acoplado a um porômetro (modelo 1600M; LI-COR, Lincoln, Neb.), foram determinados em função da distância entre a fonte de luz e o sensor do monitor de O₂.

Em cada determinação, foram utilizadas duas folhas expandidas de uma mesma planta. Quando não foi possível cobrir a área da câmara (área total de 2,5 cm²) com as folhas de uma única planta, foi utilizada uma folha expandida de outra planta com aspecto visual semelhante. Para cada condição ambiental foram realizadas três determinações fotossintéticas (repetições), sendo cada repetição constituída por 1 ou 2 brotações/planta.

O ajuste da curva de resposta fotossintética a luz foi obtido através de análise de regressão não linear. A eficiência quântica aparente, razão entre a taxa de evolução do O₂ e a DFFFA, foi calculada a partir da inclinação inicial da curva de resposta da fotossíntese à luz (fase linear), após análise de regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, quando a intensidade de luz aumenta para 50 μmolm⁻²s⁻¹. Foi considerada como capacidade fotossintética da brotação/planta a taxa de evolução do O₂ fotossintético máxima, medida sob saturação da luz (Guidi et al., 2002).

3.3.2 Características bioquímicas

O estudo das características bioquímicas foi efetuado nas folhas utilizadas para as medições fotossintéticas, as quais foram imediatamente armazenadas a -80 °C após as referidas medições. Foram analisadas três amostras de 200 mg de tecido foliar fresco para cada ambiente de cultivo durante a multiplicação e o enraizamento.

Para a realização das análises bioquímicas, as amostras de tecidos foliares foram homogeneizadas em tubo de ensaio, com auxílio de nitrogênio líquido e utilizando-se para a extração 6 mL de MCW (metanol: clorofórmio: água, na proporção 12:5:3). Em seguida, procedeu-se à centrifugação a 3.000 g durante 30 minutos. O extrato obtido foi utilizado para a quantificação de

açúcares solúveis totais e açúcares redutores. O precipitado foi utilizado para a quantificação de amido.

Ao precipitado foi adicionado 10 mL de ETOH 10%, seguido por incubação a 35 °C por 30 minutos e centrifugação a 1.200 g durante 15 minutos. Nesse novo precipitado obtido, o amido foi separado da proteína através da adição de 10 mL de PCA 30%, seguida pela incubação a 5 °C por 40 minutos e pela centrifugação a 3.000 g durante 15 minutos. O extrato obtido foi utilizado para a quantificação do amido, empregando-se a metodologia para açúcares solúveis totais (método da Antrona), sendo este expressado em miligrama de açúcares solúveis por grama de matéria fresca ($\text{mgAST.g}^{-1}\text{MF}$).

Os lipídeos juntamente com a clorofila foram separados dos açúcares e de outras micromoléculas, em funil de separação, adicionando-se clorofórmio e água ao extrato bruto, obtido na centrifugação do homogeneizado (4 mL de sobrenadante: 1 mL de clorofórmio: 1,5 mL de água). O extrato da fase aquosa foi utilizado para a quantificação de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, empregando-se os métodos da Antrona (Yemm & Cocking, 1954) e do ácido dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959), respectivamente. A estimativa da concentração de sacarose foi obtida por diferença entre os açúcares solúveis totais e os açúcares redutores.

Para quantificar os teores de clorofila foram utilizadas três amostras de 100 mg de tecido foliar fresco para cada ambiente de cultivo durante a multiplicação e o enraizamento. As concentrações de clorofila *a*, *b* e total foram determinadas de acordo com o método de Arnon (1949), após a obtenção dos dados de absorvância com base nas leituras em espectrofotômetro a 663 e 645 nm.

3.3.3 Características anatômicas

Para a realização dos estudos anatômicos foram coletadas cinco folhas expandidas das brotações e plantas em cada ambiente de cultivo durante a multiplicação e o enraizamento. Após a coleta, as folhas foram fixadas em álcool 50° GL até a realização dos estudos anatômicos.

Os estudos anatômicos foram efetuados com base no exame microscópico de seções foliares obtidas à mão livre. As seções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio e, em seguida, lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50%. Foi utilizado como corante a mistura azul de astra-safranina, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997).

A partir das seções transversais, com o auxílio de ocular micrométrica, foram efetuadas medições da espessura total do limbo foliar, das células epidérmicas de ambas faces da folha, dos parênquimas paliçádico e lacunoso em cinco folhas oriundas de cinco indivíduos diferentes, sendo efetuadas três medições em cada folha, do terço mediano de cada folha, totalizando 15 repetições para cada ambiente de cultivo.

Também foram efetuados cortes paradérmicos na região mediana das folhas para o estudo da epiderme na face abaxial, e como corante empregou-se a safranina hidroalcoólica 1%. A contagem do número de estômatos (frequência estomática) foi realizada com o auxílio de câmara clara, em microscópio OLIMPUS CBB, segundo técnica de Labouriau et al. (1961). Em cada corte foram observados quatro campos, totalizando 20 repetições para cada ambiente de cultivo. As fotomicrografias foram realizadas utilizando-se um fotomicroscópio OLYMPUS BX-60.

3.3.4 Perda de água do tecido foliar

Ao término do enraizamento, as plantas obtidas nos diferentes ambientes de cultivo foram retiradas dos respectivos recipientes e submetidas, em laboratório, a umidade relativa de 40 – 50%. Em intervalos de 10 minutos, durante um período de 110 minutos, discos foliares de 10 mm foram pesados para determinar a perda de água dos tecidos. Foram utilizados seis discos foliares (folhas expandidas) para cada ambiente de cultivo. No final do período, os discos foram submetidos à secagem em estufa a 60 °C por 48 horas para obtenção da massa seca. Os valores de perda de água foram expressos como porcentagem do conteúdo total de água do tecido foliar.

3.3.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos, instalados em delineamento inteiramente casualizado, foram constituídos durante as fases de multiplicação e enraizamento por 12 tratamentos (ambientes de cultivo *in vitro*), dispostos em esquema fatorial completo 3 (níveis de DFFFA) x 2 (sistemas de vedação do recipiente de cultivo) x 2 (fases da micropropagação).

O programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado para a realização das análises de variância dos dados não transformados e dos testes para comparação dos contrastes entre médias. As médias foram comparadas pelo Teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Evolução do O₂ fotossintético

Nas Figuras 3 e 4 são apresentadas as taxas de evolução do O₂ fotossintético (taxa fotossintética) sob diferentes níveis de DFFFA (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), respectivamente, das brotações e plantas de *Annona glabra* L. ao término dos períodos de multiplicação e de enraizamento sob diferentes condições ambientais.

Pode-se observar que as brotações e plantas de *Annona glabra* L. cultivadas fotomixotroficamente, ou na presença de sacarose, sob diferentes níveis de irradiância (baixa, média e alta) e diferentes sistemas de vedação do frasco (convencional e ventilação natural) apresentam padrões similares de resposta fotossintética a luz. Independente do ambiente de cultivo ou da fase da micropropagação, as taxas fotossintéticas aumentam linearmente com o aumento na densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) até determinado nível, a partir do qual a inclinação da curva decresce e a fotossíntese se torna menos responsiva ao aumento na DFFFA. Nas brotações ou plantas cultivadas sob baixa irradiância (50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) a fotossíntese aumenta linearmente até 30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto sob média (150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e alta irradiância (300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) as taxas fotossintéticas aumentam de maneira linear, respectivamente, até 100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Acima dos respectivos níveis de DFFFA, que caracterizam as condições de luz limitantes para o processo fotossintético, as taxas fotossintéticas continuam aumentando até um limite máximo, onde atingem a saturação de luz.

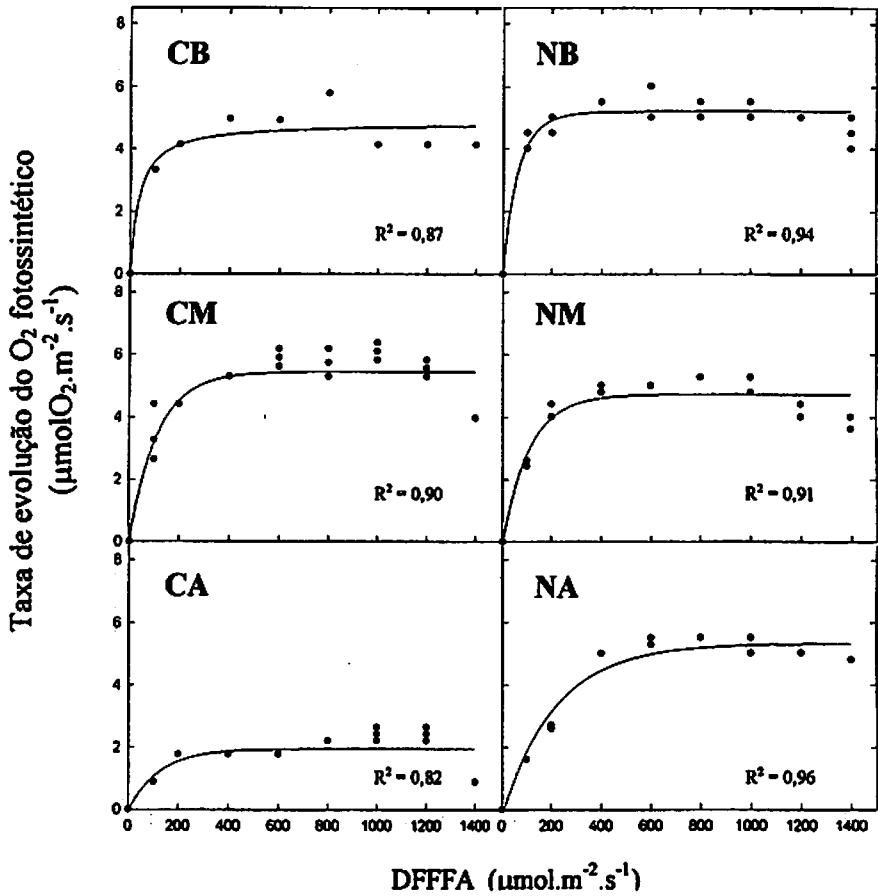


Figura 3. Taxas de evolução do O₂ fotossintético sob diferentes níveis de DFFFA das brotações de *Annona glabra* L. ao término da multiplicação sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: 50 μmolm⁻²s⁻¹ (B), 150 μmolm⁻²s⁻¹ (M) e 300 μmolm⁻²s⁻¹ (A). UFLA. Lavras, MG, 2004.

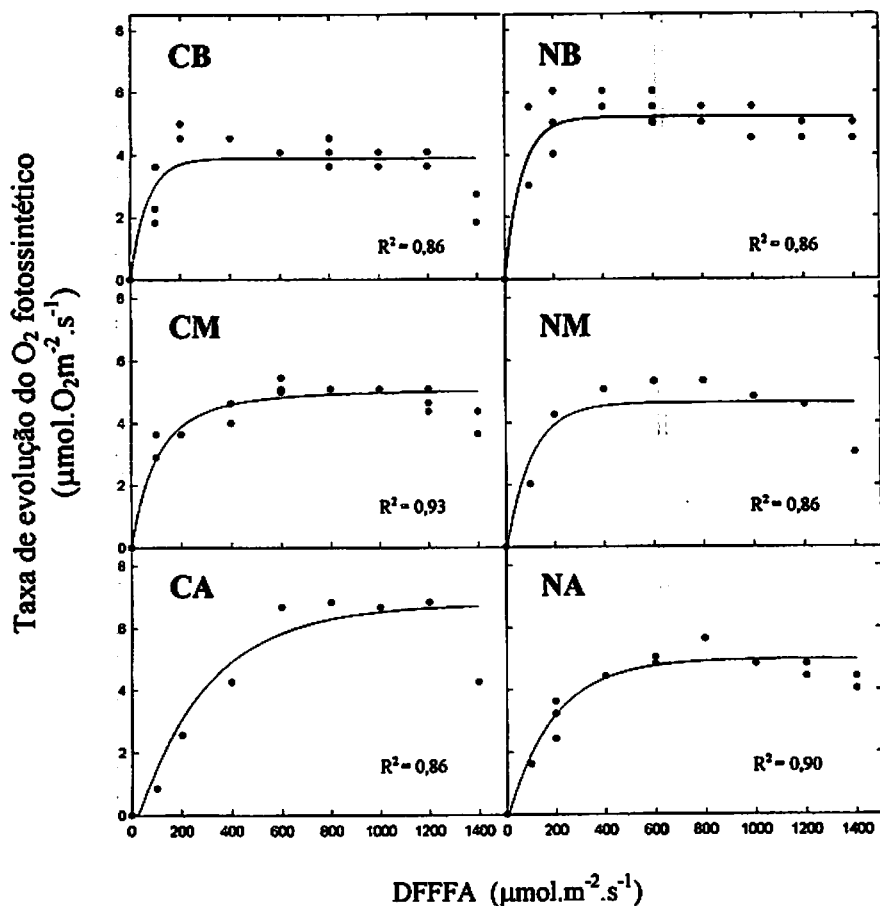


Figura 4. Taxas de evolução do O₂ fotossintético sob diferentes níveis de DFFFA das plantas de *Annona glabra* L. ao término do enraizamento sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: 50 μmolm⁻²s⁻¹ (B), 150 μmolm⁻²s⁻¹ (M) e 300 μmolm⁻²s⁻¹ (A). UFLA. Lavras, MG, 2004.

O ponto de saturação da DFFFA, o qual determina a taxa fotossintética máxima, foi influenciado significativamente pelo nível de irradiância utilizado durante a multiplicação e o enraizamento ($P < 0,05$). As brotações ou plantas cultivadas sob baixa irradiância, independente do sistema utilizado para vedação, apresentam baixo ponto de saturação da DFFFA, sendo a saturação atingida em níveis de DFFFA próximos a $290 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. De maneira geral, o ponto de saturação aumenta para aproximadamente $470 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob média irradiância e $720 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob alta irradiância. Nas brotações cultivadas sob sistema convencional o ponto de saturação não aumenta sob alta irradiância, quando comparado à média irradiância, sendo a saturação atingida em níveis de DFFFA próximos a $400 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Em algumas espécies cultivadas *in vitro* tem sido demonstrado que o aumento da concentração de CO_2 no interior do recipiente aumenta o ponto de saturação da fotossíntese pela luz e torna as plantas fotossinteticamente mais adaptadas às condições de maior luminosidade (Kanechi et al., 1998). Nesse estudo, o ponto de saturação das brotações sob baixa e média irradiância aumenta pouco no sistema de ventilação natural, quando comparado ao sistema convencional. Sob sistema de ventilação natural, que devido à membrana aumenta a disponibilidade de CO_2 no interior do recipiente quando comparado ao sistema convencional, o ponto de saturação aumenta de 250 para $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ nas brotações sob baixa irradiância e de 400 para $460 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ nas brotações sob média irradiância. Porém, sob alta irradiância, o ponto de saturação demonstra um considerável aumento sob ventilação natural, de $400 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ para $770 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Por outro lado, ao término do enraizamento, de maneira geral, não foram observadas diferenças entre o ponto de saturação nos dois sistemas de vedação do frasco, e somente as plantas cultivadas sob baixa irradiância apresentam um pequeno aumento no ponto de saturação, de 290 para $320 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob ventilação natural. Resultados

semelhantes foram obtidos por Nguyen et al. (1999), os quais observaram que o ponto de saturação da luz de plantas de *Coffea arabusta* cultivadas *in vitro* sob $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ aumenta pouco quando a concentração de CO_2 na sala de crescimento aumenta de $400 \mu\text{molmol}^{-1}$ para $1400\text{-}1500 \mu\text{molmol}^{-1}$, aumentando indiretamente a concentração de CO_2 no interior do recipiente de cultivo.

As taxas fotossintéticas máximas, determinadas em níveis de DFFFA que caracterizam a saturação do processo fotossintético (capacidade fotossintética), tanto das brotações, quanto das plantas, não diferiram significativamente nos diferentes ambientes de cultivo ($P>0,05$). Porém, quando se considera a taxa fotossintética máxima sob baixa irradiância e sistema convencional de vedação do frasco, condições comumente utilizadas na multiplicação e no enraizamento da *Annona glabra* L., podem ser observadas consideráveis variações na capacidade fotossintética das brotações ou das plantas sob os demais ambientes de cultivo.

Ao término da multiplicação (figura 3), as brotações cultivadas sob sistema convencional e baixa irradiância apresentam taxa fotossintética máxima de $4,2 \mu\text{molO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto sob média irradiância, a taxa fotossintética aumenta 26% ($5,3 \mu\text{molO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), porém reduz 56% sob alta irradiância ($1,86 \mu\text{molO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), sugerindo a ocorrência de fotoinibição durante a multiplicação sob nível elevado de irradiância e sistema convencional de vedação do frasco. Sob sistema de ventilação natural as taxas fotossintéticas também foram superiores a taxa fotossintética sob condição clássica de cultivo, inclusive sob alta irradiância. Nesse sistema, as taxas fotossintéticas aumentam 22% ($5,13 \mu\text{molO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sob baixa irradiância, 12% ($4,72 \mu\text{molO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sob média irradiância e 23% ($5,17 \mu\text{molO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sob alta irradiância. De acordo com Dimassi-Theriou & Bossabalidis (1997), sob alta irradiância, a baixa disponibilidade de CO_2 no interior do recipiente pode contribuir para o desenvolvimento da fotoinibição e para a redução nas taxas fotossintéticas.

Dessa maneira, a utilização de ventilação natural, a qual promove o aumento na disponibilidade de CO₂ no interior do recipiente de cultivo e eleva consideravelmente o ponto de saturação da fotossíntese pela luz (770 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), quando comparado ao sistema convencional, pode ser fundamental para dirigir maior proporção de energia luminosa absorvida para o centro de reação e, conseqüentemente, impedir os danos por fotoinibição durante a multiplicação sob alto nível de irradiância.

Ao término do enraizamento (figura 4) as plantas produzidas sob baixa irradiância e sistema convencional apresentam taxa fotossintética máxima de 3,86 $\mu\text{molO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$ e, em relação a esta, no sistema convencional, as taxas fotossintéticas aumentam 24% sob média irradiância (4,80 $\mu\text{molO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$) e 60% sob alta irradiância (6,17 $\mu\text{molO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$). No sistema de ventilação natural foram observados aumentos de 33% sob baixa irradiância (5,15 $\mu\text{molO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$), 18% sob média irradiância (4,54 $\mu\text{molO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$) e 26% sob alta irradiância (4,85 $\mu\text{molO}_2\text{.m}^{-2}\text{.s}^{-1}$).

A eficiência quântica aparente, razão entre a taxa de evolução do O₂ fotossintético e a DFFFA absorvidos, determinada sob condições de luz limitantes (fase linear da curva de resposta fotossintética a luz), foi significativamente reduzida nas brotações cultivadas sob níveis mais altos de irradiância, quando comparado às brotações sob baixa irradiância, independente do sistema utilizado para vedação do frasco ($P < 0,05$). Sob 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (DFFFA limitante) foram determinados valores médios de eficiência quântica, respectivamente, de 0,055 e 0,036 para as brotações cultivadas sob baixa e média irradiância e de 0,015 sob alta irradiância. Em valores acima de 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, a eficiência quântica para a fotossíntese de todas as brotações, independente do ambiente de cultivo, é gradativamente reduzida com o aumento na DFFFA. Quando a DFFFA aumenta de 50 para 250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ as eficiências

são reduzidas para 0,017, 0,018 e 0,010 nas brotações cultivadas sob baixa, média e alta irradiância, respectivamente.

A eficiência quântica determinada para as plantas ao término do enraizamento demonstra a mesma tendência apresentada pelas brotações durante a multiplicação, sendo reduzidas nas plantas que são cultivadas *in vitro* sob níveis mais altos de irradiância. Sob $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ as plantas cultivadas sob baixa irradiância apresentam eficiência quântica de 0,045, enquanto as plantas cultivadas sob média e alta irradiância apresentam eficiências quânticas, respectivamente, de 0,035 e 0,017. Quando a DFFFA é elevada de 50 para $250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ as eficiências são reduzidas para 0,017 nas plantas cultivadas sob baixa irradiância e 0,019 nas plantas cultivadas sob média irradiância. Nas plantas cultivadas sob alta irradiância a eficiência quântica é reduzida para 0,012 sob DFFFA de $350 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

A maior eficiência quântica sob baixa irradiância é frequentemente observada nas plantas que se desenvolvem em outros ambientes, visto que a baixa disponibilidade de luz, geralmente, é compensada por uma maior eficiência quântica ou fotoquímica da planta, ou seja, pela capacidade de fixar maior quantidade de CO_2 por unidade de fóton absorvido. Guidi et al. (2002) também demonstrou que a eficiência quântica de *Phaseolus vulgaris* decresce significativamente de 0,029 para 0,008 nas plantas que crescem na casa de vegetação sob $1000 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, quando comparado a $400 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nesse estudo, os resultados sugerem a influência da eficiência quântica sobre a fixação de CO_2 quando as condições de luz são limitantes e evidenciam que as brotações ou plantas cultivadas *in vitro* possuem mecanismos fotossintéticos semelhantes ao de plantas que crescem em ambientes naturais.

Os resultados descritos anteriormente demonstram que durante a multiplicação sob baixo nível de irradiância ($50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), a capacidade fotossintética da brotação aumenta sob sistema de ventilação natural. A

utilização de nível intermediário de irradiância ($150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) também promove o aumento na atividade fotossintética da brotação, independente do sistema utilizado para vedação do frasco. Porém, sob alto nível de irradiância ($300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) a resposta fotossintética positiva depende da utilização do sistema de ventilação natural, e mais precisamente do aumento na disponibilidade de CO_2 , visto que sob sistema convencional, a utilização de alta irradiância reduz significativamente a eficiência quântica e a taxa fotossintética das brotações, provavelmente associadas à fotoinibição. Em adição, a redução da temperatura no interior do frasco (tabela 1) sob ventilação natural (27°C), quando comparado ao sistema convencional (32°C), pode ter contribuído para a manutenção da atividade fotossintética sob alta irradiância.

Durante a fase de enraizamento as plantas respondem positivamente ao aumento nos níveis de irradiância durante o cultivo *in vitro* e a utilização de alta irradiância ($300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) aumenta consideravelmente a taxa fotossintética das plantas, quando comparada à média ($150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) ou a baixa ($50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) irradiância. Embora a eficiência quântica seja reduzida nas plantas cultivadas sob níveis mais altos de irradiância, estas são mantidas acima do limite teórico de 0,125 (Nguyen et al., 1999). Esses resultados sugerem que as plantas durante a fase de enraizamento possuem, relativamente, maior habilidade fotossintética para responder ao aumento nos níveis de irradiância do que as brotações durante a multiplicação, fato provavelmente associado à presença do sistema radicular e, conseqüentemente, a maior eficiência na absorção de água e nutrientes. Serret et al. (1997) e Díaz-Pérez et al. (1995), também observaram, respectivamente, que as plantas de *Gardenia jasminoides* e *Malus pumila*, quando comparadas às brotações, apresentam maior capacidade fotossintética. Em adição, nesse estudo, é provável que as plantas cultivadas sob alta irradiância apresentem maior adaptação dos mecanismos fotossintéticos a

alta disponibilidade de luz, visto que foram produzidas a partir de brotações também cultivadas sob alta irradiância durante a multiplicação.

De maneira geral, o aumento na taxa fotossintética, principalmente durante o enraizamento, não foi consideravelmente superior sob ventilação natural. Nessa condição, as brotações e plantas de *Annona glabra* L. podem não ter expressado completamente a sua capacidade fotossintética, principalmente sob média e alta irradiância, visto que sob condições ambientais que favorecem o processo fotossintético, como o aumento na disponibilidade de CO₂ e nos níveis de irradiância, a atividade fotossintética pode ser limitada pela presença da sacarose no meio de cultura, que contribui para aumentar o acúmulo de açúcares solúveis e amido nas folhas, reduzindo a atividade fotossintética. Em outras espécies de *Annona*, como a *Annona squamosa* e a *Annona muricata* (Zobayed et al., 2002), as taxas fotossintéticas aumentam significativamente sob níveis mais altos de irradiância (100 ou 250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e sistema de ventilação natural quando estas são cultivadas na ausência de sacarose (cultivo fotoautotrófico). De acordo com Niu et al. (1998), plantas de *solanum tuberosum* L. e *Lycopersicon esculentum* Mill. também apresentam maiores taxas fotossintéticas com o aumento na disponibilidade de luz e CO₂ sob cultivo fotoautotrófico do que sob cultivo fotomixotrófico (na presença de sacarose).

4.2 Características bioquímicas

4.2.1 Carboidratos solúveis e amido

A concentração de açúcares solúveis totais nas folhas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* foi influenciada significativamente pelos níveis de irradiância e pelo sistema de vedação do frasco utilizados durante o período de multiplicação e de enraizamento.

De acordo com os resultados apresentados na figura 5, pode-se observar que somente na multiplicação sob sistema convencional o nível de irradiância não influenciou a concentração de açúcares solúveis nas folhas. Nas demais condições de multiplicação e enraizamento, o cultivo sob níveis mais altos de irradiância ($150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ou $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) resulta em significativo aumento na concentração de açúcares solúveis ($P < 0,05$). Embora não tenha sido considerada significativa, a concentração de açúcares solúveis sob sistema convencional foi consideravelmente inferior nas brotações submetidas a

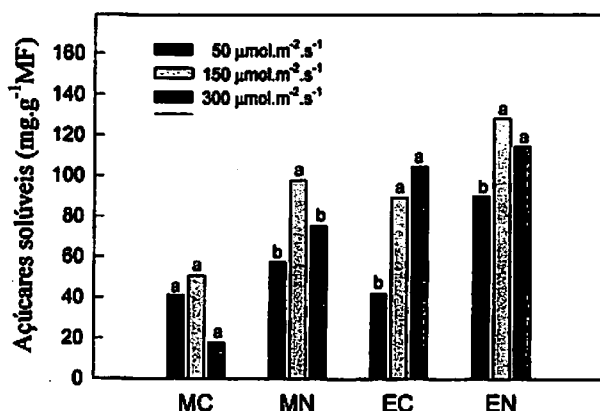


Figura 5. Concentrações médias de açúcares solúveis em folhas de *Annona glabra* L. ao término do período de multiplicação (M) e de enraizamento (E) sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (baixa), $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (média) e $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (alta). Cada barra representa a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada sistema de vedação, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2004.

300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (17,9 mg.g^{-1} MF), quando comparado às brotações sob 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (40,4 mg.g^{-1} MF) ou 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (50,8 mg.g^{-1} MF). Este resultado reflete a redução observada na taxa fotossintética das brotações cultivadas sob alta irradiância e baixa disponibilidade de CO_2 .

Na multiplicação sob ventilação natural a quantidade de açúcares solúveis aumenta significativamente nas folhas das brotações cultivadas sob 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (97,75 mg.g^{-1} MF), quando comparado a 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (75,06 mg.g^{-1} MF) ou 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (75,06 mg.g^{-1} MF), e de maneira geral, sob ventilação natural, as concentrações foram superiores, quando comparadas ao sistema convencional nos mesmos níveis de irradiância ($P<0,05$).

As plantas ao término do enraizamento apresentam quantidade de açúcares solúveis significativamente superior que as brotações sob as mesmas condições ambientais ($P<0,05$). No sistema convencional, a concentração aumenta sob 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (89,24 mg.g^{-1} MF) e 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (104,62 mg.g^{-1} MF), quando comparado a 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (42 mg.g^{-1} MF). Sob ventilação natural, a concentração de açúcares também é superior nas plantas cultivadas sob 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (128,09 mg.g^{-1} MF) e 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (114,35 mg.g^{-1} MF), quando comparado às plantas cultivadas sob 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (89,93 mg.g^{-1} MF) e, de maneira geral, estas foram superiores, quando comparadas ao sistema convencional nos mesmos níveis de irradiância ($P<0,05$). Os resultados descritos anteriormente sugerem que o aumento no nível de irradiância e a utilização de ventilação natural, principalmente durante a fase de enraizamento, podem estimular a produção de açúcares solúveis.

A concentração de sacarose e o acúmulo de amido nas brotações e plantas foram influenciados significativamente pelas condições ambientais durante a multiplicação e o enraizamento ($P<0,05$). Não foi observado acúmulo de sacarose nas folhas que crescem sob sistema convencional, durante a multiplicação ou o enraizamento, em todos os níveis de irradiância. Porém, sob

ventilação natural, a concentração de sacarose nas folhas aumenta significativamente em ambas as fases (figura 6).

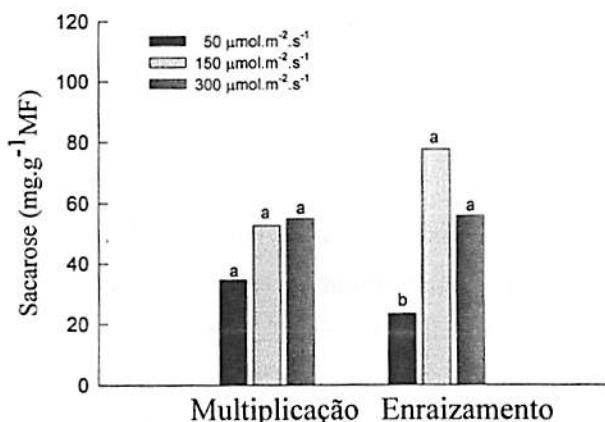


Figura 6. Concentrações médias de sacarose em folhas de *Annona glabra* L. ao término da multiplicação e do enraizamento sob ventilação natural e três níveis de irradiância: 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (baixa), 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (média) e 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (alta). Cada barra representa a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada fase da micropropagação, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2004.

Ao término da multiplicação, não foram observadas variações significativas nas concentrações de sacarose das brotações cultivadas sob 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (34,54 $\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$), 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (52,55 $\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$) e 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (54,79 $\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$). Porém, na fase de enraizamento, a concentração de sacarose foi influenciada significativamente pelo nível de irradiância e aumenta nas plantas cultivadas sob 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$

(77,27 mg.g⁻¹ MF) e 300 μmolm⁻²s⁻¹ (55,63 mg.g⁻¹MF), quando comparadas a 50 μmolm⁻²s⁻¹ (23, 27 mg.g⁻¹ MF).

O acúmulo de amido nas folhas também aumenta significativamente sob ventilação natural durante a multiplicação e o enraizamento, quando comparado ao sistema convencional (P<0,05), principalmente sob 150 μmolm⁻²s⁻¹ e 300 μmolm⁻²s⁻¹ (figura 7).

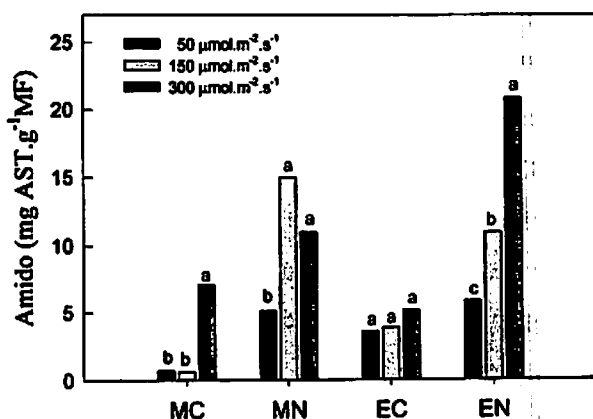


Figura 7. Concentração média de amido em folhas de *Annona glabra* L. ao término do período de multiplicação (M) e de enraizamento (E) sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: 50 μmolm⁻²s⁻¹ (baixa), 150 μmolm⁻²s⁻¹ (média) e 300 μmolm⁻²s⁻¹ (alta). Cada barra representa a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada sistema de vedação, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. UFLA. Lavras, MG, 2004.

As brotações cultivadas sob sistema convencional e 300 μmolm⁻²s⁻¹ acumulam quantidade significativa de amido (7,08 mgAST.g⁻¹ MF), quando comparadas a 50 μmolm⁻²s⁻¹ (0,64 mgAST.g⁻¹MF) ou 150 μmolm⁻²s⁻¹

(0,73 mgAST.g⁻¹MF). Considerando que nessas brotações as taxas fotossintéticas foram reduzidas, esse resultado pode refletir o acúmulo da sacarose absorvida a partir do meio de cultura. Os maiores acúmulos de amido foram observados nas brotações cultivadas sob ventilação natural e 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (14,94 mgAST.g⁻¹ MF) ou 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (11,0 mgAST.g⁻¹ MF).

Ao término do enraizamento sob sistema convencional, não foram observadas variações significativas na quantidade de amido acumulado sob os diferentes níveis de irradiância, e as folhas acumulam em média 4,21 mgAST.g⁻¹ MF. Porém, sob ventilação natural, a concentração de amido aumenta nas plantas cultivadas sob 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (10,97 mgAST.g⁻¹ MF) e, principalmente, sob 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (20,84 mgAST.g⁻¹ MF). O aumento no acúmulo de amido durante o cultivo pode indicar a aquisição de comportamento fotoautotrófico *in vitro*, visto que o amido acumulado durante o fotoperíodo pode suportar o crescimento durante o subseqüente período de escuro (Amâncio et al., 1999).

A sacarose presente no meio de cultura contribui consideravelmente para aumentar a quantidade de carboidratos, principalmente solúveis, na folha (De Riek et al., 1997). Porém, considerando que independente do nível de irradiância ou do sistema de vedação do frasco, todas as brotações e plantas foram cultivadas na presença de sacarose (cultivo fotomixotrófico), o significativo aumento observado na concentração de açúcares solúveis e no acúmulo de amido sob ventilação natural e níveis mais elevados de irradiância, quando comparado às demais condições ambientais, evidenciam que sob essas condições aumenta a contribuição dos fotoassimilados no total de carbono presente na folha. Dessa maneira, os resultados apresentados confirmam o aumento na capacidade fotossintética da *Annona glabra* L. sob maior disponibilidade de luz e de CO₂, principalmente durante o enraizamento. Por

outro lado, além destes, outros fatores podem estar envolvidos na aquisição da fotoautotrofia *in vitro*, que se refere à capacidade de crescimento somente através da fotossíntese, principalmente a sacarose presente no meio de cultura, que contribui para aumentar o acúmulo de carboidratos na folha e para reduzir a atividade fotossintética da brotação e da planta (Sinhá & Roitsch, 2002; Kanechi et al., 1998; Dimassi-Theriou & Bosabalidis, 1997).

4.2.2 Teor de clorofila

A influência das diferentes condições de cultivo durante a multiplicação e o enraizamento sobre o teor de clorofila nas folhas pode ser observada na tabela 2. As plantas matrizes de *Annona glabra* L. que crescem *in vivo* apresentam teores médios de clorofila *a*, *b* e total superiores que as plantas *in vitro*, independente do ambiente de cultivo, demonstrando que as condições *in vitro* inibem, em determinado grau, a síntese de clorofila. Em diversas espécies a presença da sacarose no meio de cultura tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila e conseqüentemente, na fotossíntese (Adelberg et al., 1999; Kanechi et al., 1998; Chenevard et al., 1997; Deng & Donnelly, 1993).

Quando se consideram as variações *in vitro* sob as diferentes condições ambientais, existe uma tendência de reduzir o teor de clorofila total com o aumento no nível de irradiância durante o enraizamento, e em menor extensão durante a multiplicação, embora os teores de clorofila não tenham sido estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

Tabela 2. Teores médios de clorofila *a*, *b*, total (*a* + *b*) e razão de clorofila *a/b* em folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas durante o período de multiplicação e enraizamento sob sistema convencional de vedação do recipiente de cultivo ou ventilação natural e três níveis de irradiância (baixa, média e alta). UFLA. Lavras, MG, 2004.

Ambiente de cultivo	Teor de clorofila (mg.g ⁻¹ MF)			
	Clorofila <i>a</i>	clorofila <i>b</i>	total (<i>a</i> + <i>b</i>)	<i>a/b</i>
Multiplicação				
Sistema convencional				
50 µmol. m ⁻² .s ⁻¹	0,61	0,31	0,93	1,96
150 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	0,66	0,25	0,91	2,68
300 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	0,52	0,20	0,72	2,63
Ventilação natural				
50 µmol. m ⁻² .s ⁻¹	1,08	0,45	1,54	2,41
150 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	0,82	0,26	1,08	3,18
300 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	0,66	0,25	0,91	2,68
Enraizamento				
Sistema convencional				
50 µmol. m ⁻² .s ⁻¹	1,24	0,63	1,87	1,96
150 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	1,79	0,60	2,39	2,98
300 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	1,25	0,43	1,69	2,89
Ventilação natural				
50 µmol. m ⁻² .s ⁻¹	0,90	0,42	1,32	2,12
150 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	0,87	0,35	1,22	2,47
300 µmol..m ⁻² .s ⁻¹	0,83	0,26	1,09	3,19
In Vivo				
Matriz (sala de crescimento)	1,99	0,83	2,82	2,40

O teor total de clorofila sob alta irradiância ($300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) é reduzido de 20 a 40% durante o enraizamento e de 10 a 20% durante a multiplicação. O efeito do nível de irradiância foi menos evidente sobre a clorofila *a* e *b*. O teor superior de clorofila total nas folhas sob baixa irradiância constitui uma resposta frequentemente observada, visto 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). Em adição, esses resultados justificam a maior eficiência quântica observada nas brotações e plantas cultivadas sob baixo nível de irradiância.

De maneira geral, os teores de clorofila *a*, *b* e total são maiores nas folhas durante o enraizamento, quando comparados à fase de multiplicação. Esses resultados auxiliam a interpretar a maior habilidade fotossintética observada nas plantas de *Annona glabra* L. em fase de enraizamento. Em adição, somente durante o enraizamento o teor de clorofila total reduz significativamente sob sistema de ventilação natural, em todos os níveis de irradiância ($P < 0,05$). O efeito foi similar sobre a clorofila *a* e *b*. Considerando que altos níveis de açúcares nas células inibem a síntese de clorofila, esses resultados podem confirmar o aumento na capacidade fotossintética da *Annona glabra* L. durante o enraizamento e, principalmente, sob sistema de ventilação natural.

Quanto à razão clorofila *a/b*, as variações nas duas fases da micropropagação foram menos evidentes em resposta as mudanças no nível de irradiância ou no sistema de vedação do frasco. De maneira geral, a redução no teor de clorofila total é acompanhada pela redução nos teores de clorofila *a* e *b*. Dessa maneira, as razões de clorofila *a/b* são mantidas. Similar padrão de mudanças na clorofila total e a ausência de um efeito claro das condições de cultivo sobre a razão clorofila *a/b*, também foram reportados em plantas de *Gardenia jasminoides* (Serret et al., 1996) e *Chrysanthemum*

(Cristea et al., 1999) que se desenvolvem *in vitro*, respectivamente, sob diferentes regimes de luz e diferentes concentrações de CO₂.

4.3 Características da anatomia foliar

4.3.1 Estrutura anatômica foliar

O espessamento das superfícies adaxial e abaxial e dos tecidos que compõem o mesofilo, os parênquimas paliçádico e lacunoso, sofreu influência significativa do ambiente de cultivo, quanto aos níveis de irradiância e ao sistema utilizado para vedação do frasco ($P < 0,05$). De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, pode-se observar que na fase de multiplicação sob sistema convencional a espessura da epiderme adaxial é superior nas folhas que crescem sob $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, mas não é influenciada pelo nível de irradiância sob ventilação natural. Na fase de enraizamento, independente do sistema utilizado para vedação do frasco, a espessura da epiderme adaxial aumenta sob $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, porém nessa irradiância, o aumento é superior sob ventilação natural do que sob sistema convencional. Nas folhas que crescem sob $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a espessura da epiderme adaxial também aumenta significativamente sob ventilação natural. De maneira geral, o sistema de vedação não influencia o desenvolvimento da epiderme adaxial.

Em relação aos tecidos que compõem o mesofilo, a espessura do parênquima paliçádico, nas duas fases da micropropagação, aumenta significativamente sob $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, quando comparado aos demais níveis de irradiância, independente do sistema utilizado para vedação do frasco. Apenas

Tabela 3. Espessura dos tecidos epidérmicos, parênquimas paliçádico e lacunoso e espessura total de folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas durante o período de multiplicação e enraizamento sob sistema convencional de vedação do recipiente de cultivo ou ventilação natural e três níveis de irradiância: baixa ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), média ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e alta ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). UFLA. Lavras, MG, 2004.

Ambiente de cultivo	Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima lacunoso μm	Epiderme abaxial	Limbo foliar
Multiplicação					
Sistema convencional					
$50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	27,03b	40,21b	66,50a	22,23a	156,01b
$150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	30,80a	38,24b	66,55a	22,57a	154,86b
$300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	28,29b	49,66a	74,28a	22,10a	174,33a
Ventilação natural					
$50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	27,95a	40,55b	68,96a	19,18b	160,77b
$150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	28,82a	38,67b	74,85a	22,76a	165,13b
$300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	28,71a	47,26a	79,87a	23,29a	179,25a
Enraizamento					
Sistema convencional					
$50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	24,78c	33,78b	61,50b	20,71a	140,81c
$150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	27,68b	55,44a	61,39b	22,60a	167,35b
$300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	32,57a	55,26a	74,23a	20,57a	182,63a
Ventilação natural					
$50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	28,57b	44,99b	67,94c	18,51b	160,23c
$150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	26,25b	38,32c	87,82b	23,41a	175,72b
$300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	38,21a	53,55a	96,88a	21,92a	210,95a
In Vivo					
Matriz (sala de crescimento)	42,34	64,16	92,46	18,42	217,38

Os valores representam a média de 15 repetições. Em cada fase da micropropagação e para cada sistema de vedação do frasco, as médias dentro da coluna seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

na fase de enraizamento sob sistema convencional, a espessura deste tecido também foi significativamente superior sob $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. O sistema de vedação do frasco não exerce influência sobre a espessura do parênquima paliçádico durante a multiplicação. Porém, na fase de enraizamento sob ventilação natural, a espessura deste tecido aumenta sob $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e decresce sob $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, quando comparado ao sistema convencional nos mesmos níveis de irradiância. De maneira geral pode ser observado um maior desenvolvimento do parênquima paliçádico durante a fase de enraizamento, principalmente sob alta irradiância, do que na fase de multiplicação sob as mesmas condições ambientais. O maior desenvolvimento do parênquima paliçádico sob nível mais alto de irradiância ($100 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e durante o enraizamento, também foi observado em plantas de *Gardenia jasminoides* cultivadas *in vitro* (Serret et al., 1996).

As variações observadas na espessura do parênquima lacunoso entre os diferentes ambientes de cultivo durante a multiplicação não foram consideradas significativas, porém pode ser observada uma tendência de aumento na espessura deste tecido sob níveis mais altos de irradiância, principalmente sob ventilação natural. Na fase de enraizamento a espessura do parênquima lacunoso foi significativamente superior sob $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ no sistema convencional e sob $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ no sistema de ventilação natural. Em relação à espessura da epiderme abaxial, de maneira geral, não foram observadas variações em resposta ao ambiente de cultivo. Nas duas fases da micropropagação, somente sob ventilação natural a espessura da epiderme abaxial aumenta significativamente sob 150 ou $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Em função das diferenças observadas na espessura das epidermes e dos parênquimas, a espessura do limbo foliar varia significativamente nos diversos ambientes de cultivo ($P < 0,05$). Sob alta irradiância as folhas são mais espessas e, geralmente, a espessura do limbo foliar decresce com a redução no nível de

irradiância. Como resultado do maior espessamento das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, as folhas desenvolvidas durante o enraizamento sob $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ e ventilação natural assemelham-se às folhas das plantas matrizes que se desenvolvem na sala de crescimento. A diferenciação pronunciada dos parênquimas pode ser um fator crítico na otimização da fotossíntese e, potencialmente vantajoso para a sobrevivência da plantas sob condições *ex vitro*. Por outro lado, a espessura total das folhas que crescem sob baixa irradiância e sistema convencional, condições ambientais usuais da micropropagação, devido ao menor espessamento dos tecidos no mesofilo e da epiderme adaxial, difere consideravelmente das folhas que desenvolvem *in vivo*.

Nas figuras 8 e 9 podem ser observados os efeitos do ambiente e da fase de cultivo sobre o grau de desenvolvimento dos tecidos foliares. As folhas que crescem durante a multiplicação sob sistema convencional e baixa ou média irradiância, apresentam menor diferenciação do mesofilo e aparentemente maior volume de espaço intercelular, as células do parênquima paliçádico são menores e menos alongadas. A utilização de alta irradiância ou de ventilação natural, mesmo sob níveis mais baixos de irradiância, resultam em maior estruturação das células epidérmicas, maior diferenciação dos parênquimas no mesofilo, as células paliçádicas são mais alongadas e aumenta consideravelmente o número de cloroplastos presentes nas células.

Durante o enraizamento sob sistema convencional e níveis mais baixos de irradiância, ao contrário da fase de multiplicação, o mesofilo se apresenta diferenciado com uma camada bem definida de células paliçádicas, que exibem a forma alongada típica, e aparentemente, menor volume de espaço intercelular. Em adição pode ser observado que sob média irradiância ($150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) as células do mesofilo apresentam um grande número de cloroplastos. Sob alta

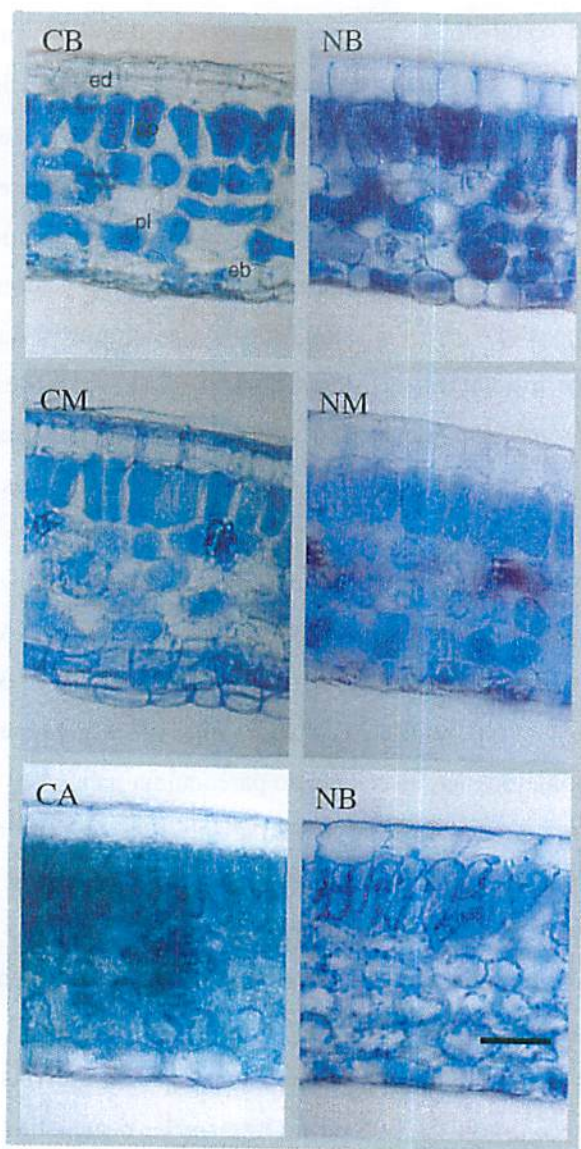


Figura 8. Seções transversais das folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas durante a multiplicação sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiação: $50\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B), $150\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (M) e $300\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A). Barra = 50 μm . Epidermes adaxial (ed) e abaxial (eb), parênquimas paliçádico (pp) e lacunoso (pl). UFLA. Lavras, MG, 2004.

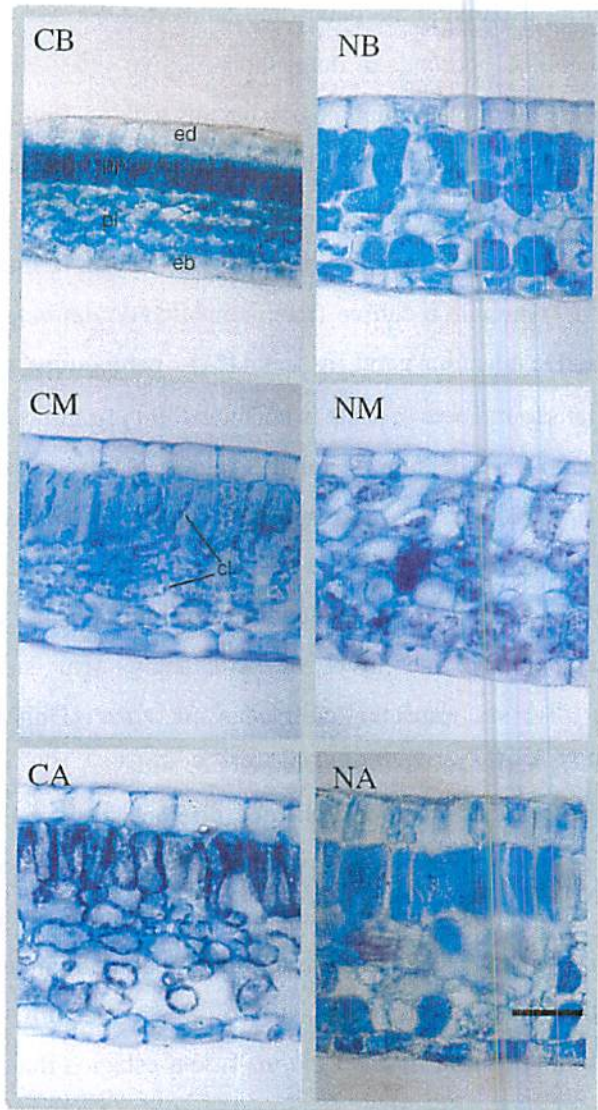


Figura 9. Seções transversais das folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas durante o enraizamento sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiação: 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B), 150 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (M) e 300 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A). Barra = 50 μm . Epidermes adaxial (ed) e abaxial (eb), parênquimas paliádico (pp) e lacunoso (pl), cloroplasto (cl). UFLA. Lavras, MG, 2004.

irradiância e sistema convencional e ou em todos os níveis de irradiância sob ventilação natural, o parênquima paliçádico também é formado por uma única camada de células, porém o tamanho relativo das células aumenta consideravelmente neste parênquima e nos demais tecidos. Entretanto, sob essas condições ambientais, as células, principalmente as paliçádicas, apresentam formato mais irregular, provavelmente associado ao acúmulo de amido nos cloroplastos. Observações semelhantes foram feitas por Dimassi-Theriou & Bosabalidis (1997) durante o cultivo fotomixotrófico de *Actinidea deliciosa* sob alta irradiância. De maneira geral, as células do parênquima paliçádico e da epiderme adaxial são maiores sob alta irradiância ($300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$).

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 *Annona glabra* L.. 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 desse estudo demonstram que diferentes níveis de irradiância e diferentes sistemas de vedação do frasco podem modificar o desenvolvimento da folha *in vitro*, tomando a anatomia desta mais semelhante a das plantas que crescem *in vivo*. Em adição, a estrutura da folha pode determinar a capacidade fotossintética da planta (Arans et al., 1986). Dessa maneira, o aumento na capacidade fotossintética da *Annona glabra* L. em estágios mais avançados de desenvolvimento (enraizamento), principalmente sob alta irradiância e ventilação natural, pode estar associado ao maior desenvolvimento das características estruturais relacionadas ao processo fotossintético, como a maior diferenciação do mesofilo, principalmente do parênquima paliçádico, e o aumento no número de cloroplastos.

4.3.2 Freqüência e morfologia dos estômatos

A análise da epiderme na face abaxial em vista frontal demonstrou o efeito do ambiente de cultivo durante a multiplicação e o enraizamento sobre a freqüência de estômatos nas folhas da *Annona glabra* L.. O número de estômatos/mm² varia significativamente entre as plantas cultivadas sob diferentes níveis de irradiância e diferentes sistemas de vedação do frasco (P<0,05). De acordo com os resultados apresentados na figura 10, pode-se observar que as maiores freqüências de estômatos são associadas, geralmente, à

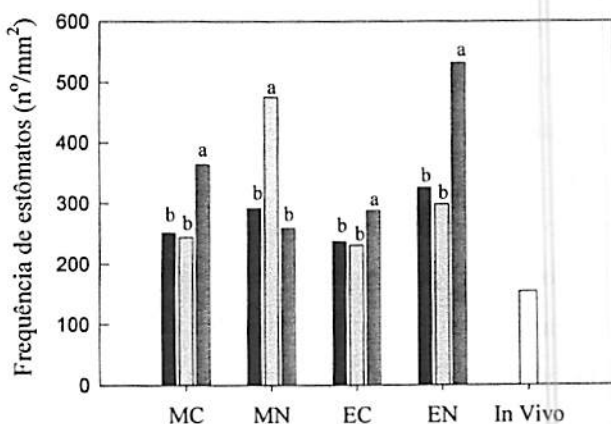


Figura 10. Freqüência de estômatos em folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas *in vivo* e durante os períodos de multiplicação (M) e de enraizamento (E) sob sistema convencional de vedação do frasco (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: alta (— 300 μmolm⁻²s⁻¹), média (— 150 μmolm⁻²s⁻¹) e baixa (— 50 μmolm⁻²s⁻¹). Cada barra representa a média de 20 repetições. UFLA. Lavras, MG, 2004.

alta irradiância (300 μmolm⁻²s⁻¹), exceto na fase de multiplicação sob ventilação natural em que o maior número de estômatos/mm² foi observado sob média

irradiância ($150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e existe uma tendência de reduzir o número de estômatos sob $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, embora este valor não tenha sido estatisticamente diferente do valor observado sob baixa irradiância ($50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Na fase de enraizamento, o número de estômatos/ mm^2 aumenta significativamente sob ventilação natural, quando comparado ao sistema convencional nos mesmos níveis de irradiância. Porém, na fase de multiplicação os resultados foram contraditórios, visto que a frequência de estômatos nos dois sistemas de vedação do frasco não varia sob baixa irradiância, aumenta no sistema de ventilação natural sob média irradiância e no sistema convencional sob alta irradiância. As máximas frequências de estômatos foram observadas sob ventilação natural e média irradiância na multiplicação ($475,82$ estômatos/ mm^2) ou alta irradiância no enraizamento ($532,06$ estômatos/ mm^2). Por outro lado, nas duas fases da micropropagação, as menores frequências, de 230 a 250 estômatos/ mm^2 , foram observadas sob baixa ou média irradiância e sistema convencional.

O aumento no número de estômatos/ mm^2 sob níveis mais altos de irradiância e ventilação natural demonstra que as plantas *in vitro* apresentam a mesma tendência que as plantas em outros ambientes de aumentar a frequência de estômatos sob maior disponibilidade de luz e CO_2 . Entretanto, as folhas que se desenvolvem *in vitro*, independente do ambiente de cultivo, apresentam frequências de estômatos consideravelmente maiores que as folhas de plantas matrizes da *Annona glabra* L. que se desenvolvem *in vivo* (154 estômatos/ mm^2). O aumento no número de estômatos/ mm^2 nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, quando comparado às plantas da mesma espécie que crescem em outros ambientes, tem sido reportado em diversos estudos e associado, principalmente, a alta umidade relativa do ar no interior do recipiente (Khan et al., 2003; Sciutti & Morini, 1995; Lee et al., 1988; Brainerd & Fuchigami, 1981). Através das figuras 11 e 12 podem ser observadas as variações na morfologia dos estômatos

e as características das células epidérmicas na superfície abaxial das folhas sob os diferentes ambientes de cultivo.

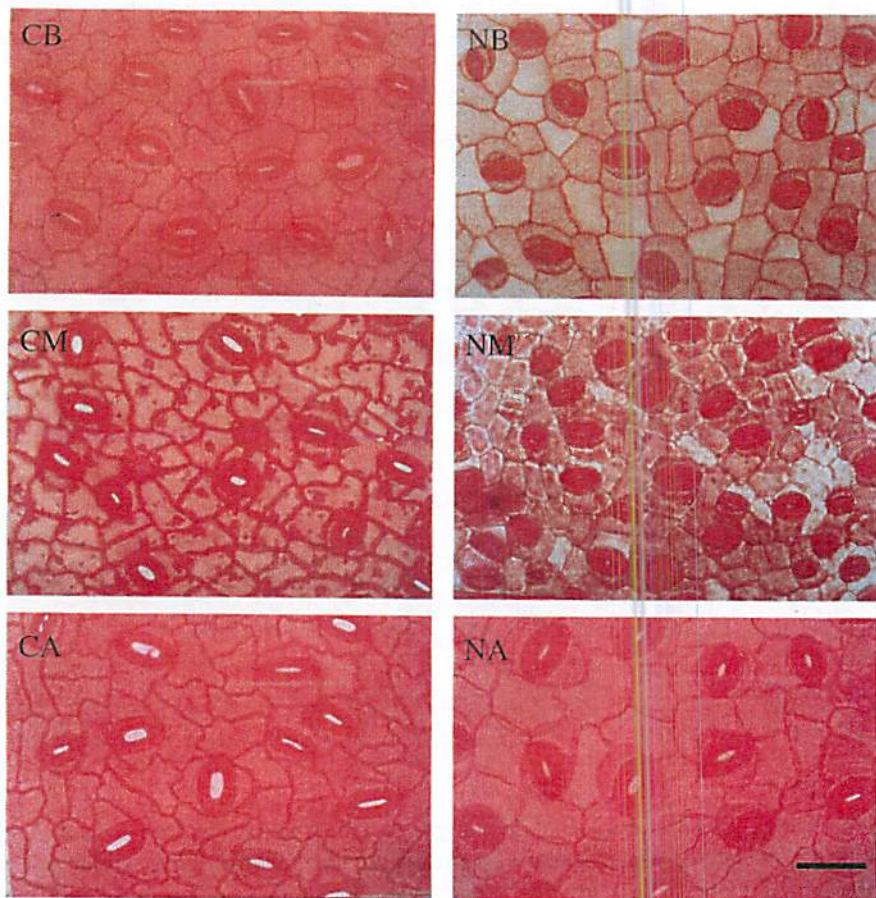


Figura 11. Seções parádérmicas da epiderme da face abaxial das folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas durante a multiplicação sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B), $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (M) e $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A). Barra = 50 μm . UFLA. Lavras, MG, 2004.

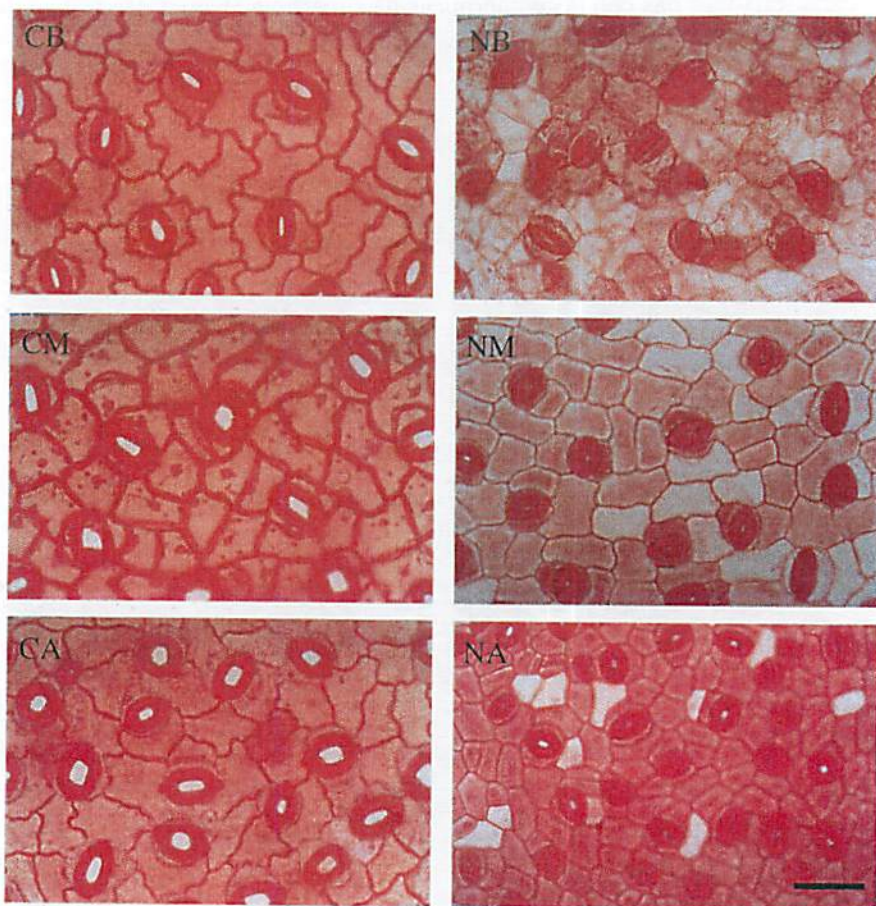


Figura 12. Seções paradérmicas da epiderme da face abaxial das folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas durante o enraizamento sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B), $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (M) e $300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A). Barra = 50 μm . UFLA. Lavras, MG, 2004.


Nas duas fases da micropropagação, os estômatos das folhas que desenvolveram sob sistema convencional, independente do nível de irradiância, são maiores e as células guarda apresentam forma mais esférica, enquanto nas folhas que desenvolveram sob ventilação natural os estômatos são

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

Como pode ser observado, nas folhas que se desenvolveram sob sistema convencional, independente do nível de irradiância, os estômatos permanecem abertos após a tampa do recipiente de cultivo ter sido retirada para a coleta do material a ser fixado. Por outro lado, os estômatos presentes nas folhas que se desenvolveram sob ventilação natural se fecham rapidamente quando submetidos às condições da sala de crescimento. Esses resultados evidenciam a influência do sistema utilizado para vedação do frasco sobre a funcionalidade dos estômatos, sugerindo que sob sistema convencional os estômatos podem ser incapazes de se fechar rapidamente, impedindo a perda de água, quando a planta é retirada do recipiente de cultivo.

Diversos estudos têm demonstrado que a presença da sacarose no meio de cultura, o acúmulo de etileno e, principalmente, a alta umidade relativa do ar no interior dos recipientes totalmente fechados resultam no desenvolvimento anormal dos estômatos e na reduzida capacidade de fechamento destes em resposta às condições severas do ambiente natural, como o aumento na demanda evaporativa (Shackel et al., 1990; Sutter, 1988; Wardle et al., 1983; Fuchigami et al., 1981; Brainerd & Fuchigami, 1981). O reduzido controle estomático e a alta freqüência de estômatos tem sido consideradas as principais causas da alta condutância foliar inicial e da rápida dessecação das plantas micropropagadas após a transferência (Díaz-Pérez et al., 1995; Sciutti & Morini, 1995; Capellades et al., 1990).

No presente estudo, o aumento na capacidade de resposta dos estômatos sob ventilação natural pode estar associado à redução significativa de 90% para 70% na umidade relativa do ar e, conseqüentemente, ao aumento de



aproximadamente 0,5 para 1,0 kPa no déficit de pressão de vapor da atmosfera no interior do recipiente, além da provável redução no acúmulo de etileno. Embora o número de estômatos/mm² aumente sob ventilação natural, a capacidade de resposta dos estômatos as variáveis ambientais pode ser mais importante para a determinação da condutância foliar do que a frequência dos estômatos (Kozlowski et al., 1991). Dessa maneira, o aumento na funcionalidade dos estômatos sob ventilação natural pode impedir a excessiva dessecação das plantas micropropagadas após transplante, aumentando as suas chances de sobrevivência no ambiente natural.

Em adição, as células epidérmicas das folhas que crescem sob os diferentes ambientes variam no tamanho e na forma. Sob sistema convencional as células epidérmicas são maiores e exibem paredes anticlinais acentuadamente sinuosas, principalmente sob baixa irradiância, enquanto sob ventilação natural, as células são menores, regularmente arranjadas e as paredes são retilíneas ou levemente sinuosas. Nos dois sistemas de vedação do frasco, o tamanho das células epidérmicas tende a diminuir com o aumento no nível de irradiância. Porém, a redução no tamanho das células com o aumento no nível de irradiância é mais acentuada durante o enraizamento sob ventilação natural. Essas alterações evidenciam a adaptação das brotações e das plantas ao aumento nos níveis de irradiância e a redução na umidade relativa do ar, sob ventilação natural.

A menor sinuosidade da parede celular pode estar relacionada às características adaptativas contra a perda excessiva de água. A redução no tamanho das células constitui uma resposta comumente observada nas folhas que se desenvolvem sob alta irradiância, como resultado da redução no alongamento celular e do aumento no espessamento da parede. De acordo com Castro et al. (2002), células menores e com parede mais espessas são o resultado da alta concentração de açúcares solúveis na folha que diminuem o teor de água nos

tecidos, paralisando o alongamento da célula, e aumentam a síntese de carboidratos insolúveis que constituem a parede celular, aumentando a sua espessura. Nesse estudo, a redução no tamanho das células epidérmicas sob níveis mais altos de irradiância e ventilação natural pode ser atribuída ao aumento significativo na concentração de açúcares solúveis nas folhas sob essas condições ambientais, associado ao aumento na capacidade fotossintética e a absorção da sacarose presente no meio de cultura.

4.4 Perda de água do tecido foliar

Os resultados para a perda de água dos tecidos, após a retirada das plantas dos recipientes de cultivo apresentados na figura 13, demonstram uma considerável influência do sistema utilizado para vedação do frasco e do nível de irradiância durante o enraizamento ($P < 0,05$). Após 20 minutos de exposição, em laboratório, a umidade relativa de 40 - 50%, as folhas das plantas produzidas sob sistema convencional, independente do nível de irradiância (baixa, média ou alta) perdem uma quantidade de água significativamente maior (19 - 51%), que as folhas das plantas cultivadas sob ventilação natural, sendo as diferenças progressivamente acentuadas com o aumento no tempo de exposição. Ao término do período de determinação, a perda total de água foliar das plantas cultivadas sob sistema convencional varia de 66 a 89 %, enquanto nas plantas cultivadas sob ventilação natural as folhas perdem de 13 a 33 % da água presente nos tecidos, o que representa menos da metade da quantidade de água perdida no mesmo período pelas plantas que se desenvolveram sob sistema convencional.

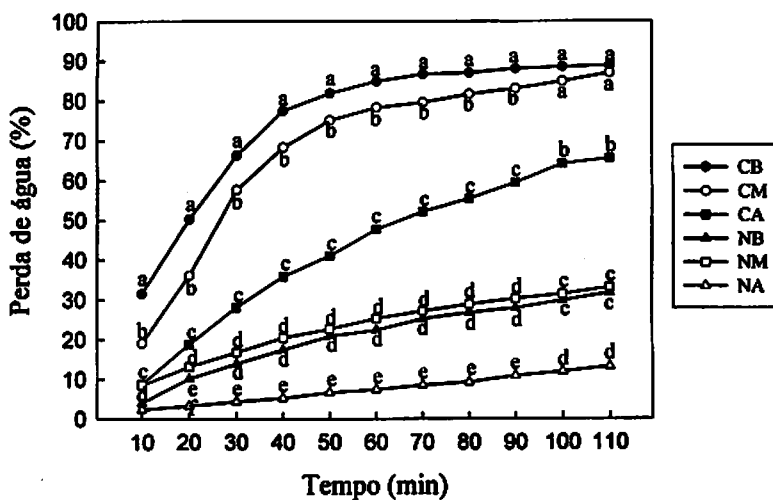


Figura 11. Porcentagem de perda de água durante 110 minutos de exposição à umidade relativa de 40 - 50 % das folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e três níveis de irradiância: $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B), $150 \mu\text{molm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (M) e $300 \mu\text{molm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A). Cada ponto representa a média de 6 repetições. Em cada tempo de determinação, as diferentes letras indicam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. UFLA. Lavras, MG, 2004.

Nos dois sistemas de vedação do frasco não foram observadas diferenças significativas na quantidade total de água foliar perdida pelas plantas cultivadas sob $50 \mu\text{molm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (baixa irradiância) e $150 \mu\text{molm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (média irradiância). Entretanto, nas plantas cultivadas sob alta irradiância ($300 \mu\text{molm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a quantidade de água perdida é significativamente menor que nos níveis mais baixos de irradiância, sendo a porcentagem total de perda de água foliar reduzida de 86% para 66%, nas plantas cultivadas sob sistema convencional, e de 33 para 13%, nas plantas cultivadas sob ventilação natural.

As maiores porcentagens de perda de água foliar foram observadas nas plantas cultivadas sob sistema convencional e $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (89%), que correspondem às condições usuais de cultivo da *Annona glabra* L., ou $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (87%). De acordo com Brainerd & Fuchigami (1981) perdas de água acima de 50% causam um colapso generalizado nas células epidérmicas e nas células-guarda, fato que provavelmente ocorreu com apenas 20 ou 30 minutos de exposição das plantas cultivadas sob sistema convencional e baixa ou média irradiância, respectivamente, mas que possivelmente não ocorreu em 110 minutos de exposição das plantas cultivadas sob ventilação natural, independente do nível de irradiância.

De acordo com os resultados, a utilização de ventilação natural, que proporciona o decréscimo de 90 % para 70% na umidade relativa do ar durante o cultivo *in vitro* da *Annona glabra* L., principalmente aliado à alta irradiância ($300 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), aumenta a capacidade das plantas para controlar as perdas de água quando são posteriormente expostas a um ambiente com baixa umidade relativa. A influência da utilização de umidades mais baixas do que as convencionais sobre a capacidade da planta controlar a perda de água também tem sido descrita em outras espécies cultivadas *in vitro*, como *Prunus cerasifera* (Sciutti & Morini, 1995) e *Malus domestica* (Brainerd & Fuchigami, 1981).

Segundo Capellades et al. (1990) o aumento na intensidade luminosa e a redução na umidade relativa do ar durante o cultivo induzem *in vitro* as mesmas modificações anatômicas observadas nas plantas durante o período de aclimatização na casa de vegetação, como o aumento na deposição de cêra epicuticular e redução no tamanho e na frequência dos estômatos. No presente estudo, o aumento na capacidade de controle da perda de água das plantas produzidas sob ventilação natural, principalmente sob alta irradiância, pode estar associado às alterações estruturais e funcionais observadas nas folhas sob essas condições e envolvidas no aumento da resistência estomática e cuticular à perda

de água, como o aumento na espessura da epiderme adaxial e, possivelmente na camada de cutícula, redução no tamanho dos estômatos e alteração na sua forma, além do maior controle estomático. O aumento na capacidade de controle da perda de água pode ser de extrema importância para prevenir a dessecação das plantas de *Annona glabra* L. durante a aclimatização e garantir a sua sobrevivência após a transferência para o ambiente natural.

5 CONCLUSÕES

1. Em ambas fases da micropropagação, a *Annona glabra* L. demonstra capacidade de realizar fotossíntese *in vitro*. A capacidade fotossintética aumenta sob média e alta irradiância, principalmente na fase de enraizamento, sendo pouco influenciada pelo sistema de vedação do frasco. Sob baixa irradiância a atividade fotossintética aumenta no sistema de ventilação natural.
2. O ponto de saturação da fotossíntese pela luz aumenta sob média irradiância e, principalmente, sob alta irradiância, não sendo influenciado pelo sistema de vedação do frasco. Somente na fase de multiplicação as brotações cultivadas sob alta irradiância são saturadas em níveis mais altos de DFFFA no sistema de ventilação natural.
3. A eficiência quântica aparente é superior nas brotações e plantas cultivadas sob baixa irradiância e reduz sob níveis mais altos de irradiância. Na fase de multiplicação sob sistema convencional e alta irradiância a eficiência quântica das brotações atinge valores abaixo de um limite teórico para a eficiência das plantas.
4. A concentração de açúcares solúveis e o acúmulo de amido nas folhas aumentam com o aumento no nível de irradiância, principalmente sob ventilação natural e na fase de enraizamento. Sob ventilação natural, o nível de irradiância não influencia a concentração de sacarose nas brotações, mas durante o enraizamento, o acúmulo de sacarose nas folhas aumenta sob alta irradiância.
5. O aumento no nível de irradiância tende a diminuir o teor de clorofila total, principalmente sob ventilação natural na fase de enraizamento, porém não influencia a razão *a/b*.

6. A espessura da folha aumenta sob alta irradiância ou sob ventilação natural, mesmo em níveis mais baixos de irradiância. As folhas que se desenvolvem sob estas condições ambientais apresentam maior diferenciação do mesofilo e grande quantidade de cloroplastos nas células parenquimáticas.
7. A frequência de estômatos na superfície abaxial das folhas aumenta sob alta irradiância. Na fase de enraizamento o número de estômatos/mm² é superior sob ventilação natural, em todos os níveis de irradiância. Sob sistema convencional de vedação do frasco, independente do nível de irradiância, os estômatos são maiores, apresentam forma mais esférica e permanecem abertos após a retirada das brotações ou plantas dos recipientes de cultivo. Sob ventilação natural, reduz o tamanho dos estômatos, estes apresentam a forma elíptica característica e se fecham quando submetidos às condições ambientais da sala de crescimento. O tamanho das células epidérmicas diminui com o aumento no nível de irradiância, principalmente sob ventilação natural e na fase de enraizamento.
8. As folhas das plantas que se desenvolvem sob baixa irradiância e sistema convencional de vedação do frasco perdem alta quantidade de água quando são retiradas dos recipientes de cultivo. A perda de água diminui nas folhas que se desenvolvem sob ventilação natural, principalmente aliado à alta irradiância.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados nesse estudo confirmam a influência das condições do ambiente de cultivo sobre a morfologia e a fisiologia da *Annona glabra* L. micropropagada. De acordo com os resultados, as brotações, e principalmente, as plantas em fase de enraizamento, possuem capacidade para realizar fotossíntese *in vitro*. Entretanto, a atividade fotossintética parece ser limitada pela baixa disponibilidade de luz e de CO₂ nas técnicas freqüentemente utilizadas para a micropropagação da espécie. O aumento nos níveis de irradiância e a utilização de ventilação natural sugerem o aumento na capacidade fotossintética, visto que promovem o desenvolvimento das características fotossintéticas, principalmente relacionadas à estrutura foliar, resultando na maior produção de açúcares solúveis e no maior acúmulo de sacarose e amido nas folhas. Em resultam em plantas com maior capacidade de regular os processos de perda de

Em adição, o desenvolvimento das características fotossintéticas indica que as brotações e plantas de *Annona glabra* L. podem ser capazes de se desenvolver fotoautotroficamente sob ventilação natural e níveis mais altos de irradiância. Entretanto, a definição das condições ótimas para o crescimento fotoautotrófico *in vitro* depende de considerações adicionais, em função da complexidade do processo de aquisição de fotoautotrofia, o qual envolve inúmeras características fisiológicas em resposta a interação de diversos fatores ambientais. Portanto, ha necessidade da condução de estudos posteriores de outras características relacionadas ao processo fotossintético, bem como o efeito da ausência de sacarose, sob outras variáveis do ambiente de cultivo (níveis de CO₂ e de irradiância, fotoperíodo, temperatura, umidade relativa, substratos, etc).

Embora exista dificuldade em medir e controlar as variáveis ambientais *in vitro* em função do tamanho reduzido dos recipientes, os métodos utilizados nesse estudo são relativamente simples e constituem alternativas interessantes para aumentar a eficiência das técnicas *in vitro* e reduzir os custos de micropropagação da *Annona glabra* L. e de outras espécies.

A influência das mudanças na anatomia e na fisiologia sobre o comportamento das plantas de *Annona glabra* L. após a transferência não foi definida neste estudo, mas espera-se que o aumento na capacidade fotossintética e de regulação da perda de água facilite a adaptação da planta no campo, acelerando o processo de aclimatização. Estas considerações certamente podem ser investigadas em estudos posteriores, contribuindo de maneira significativa para otimizar as condições de cultivo, maximizar o processo regenerativo e garantir a integridade e a qualidade das mudas de *Annona glabra* L. produzidas por micropropagação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELBERG, J. et al. Micropropagation, decontamination, transcontinental shipping and hidroponic growth of *Cattleya* while sealed in semipermeable membrane vessels. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.73, p.23-35, 1998.

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.

AFREEN, F. et al. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. *Plant Science*, Clare, v.157, n.2, p.225-231, 2000.

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.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, Rockville, v.24, p.1-15, 1949.

BAG, N. et al. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between in vitro propagated plants and seedlings. *Plant Science*, Clare, v.156, p.125-135, 2000.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.89, p.195-206, 2001.

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

BRAINERD, K.E. et al. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. *HortScience*, Alexandria, v.16, n.2, p.173-175, 1981.

BUKASTSH, F. Benerkungren zur doppelfarbung astrablausafranina. *Microkosmos*, Stuttgart, v.61, n.2, p.255, 1972.

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

CARVALHO, L.C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defence system in plantlets transferred from in vitro to ex vitro: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. *Plant Science*, Clare, v.162, p.33-40, 2002.

CASTRO, E.M. Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento. 2002. 221p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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.

CRISTEA, V.; VECCHIA, F.D.; ROCCA, N.L. Developmental and photosynthetic characteristics of a photoautotrophic *Chrysanthemum* culture. *Photosynthetica*, Prague, v.37, n.1, p.53-59, 1999.

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.

DE LA VIÑA, G. et al. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. *Plant Physiology Biochemistry*, Montrouge, v.37, n.7/8, p.587-595, 1999.

DECCEITI, S.F.C. Propagação in vitro de *Annona glabra* L. 2000. 101p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

DE RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. Sucrose and metabolism in a double system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.47, p.269-278, 1997.

DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.112, n.5, p.846-851, 1987.

DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SHACKEL, K.A.; SUTTER, E.G. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.120, n.3, p.435-440, 1995.

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 Culture*, Dordrecht, v.47, p.127-134, 1997.

DONNELLY, D.J.; SKELTON, F.E. Hydathode structure of micropropagated plantlets and greenhouse-grown 'Totem' strawberry. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.112, n.5, p.755-759, 1987.

DONNELLY, D.J.; SKELTON, F.E.; NELLES, J.E. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. *The Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.112, n.3, p.566-569, 1987.

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

FERREIRA, D.F. SISVAR 4.3 - Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999.

FISCHER, U.; ALFERMANN, A. W. Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, v.41, p.19-28, 1995.

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

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1. The technology, 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1. The technology, 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1574p.

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: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 331-353.

GROUT, B.W.; DONKIN, M.E. Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture *in vitro* and at transplanting into soil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.212, p.323-327, 1987.

GUIDI, L.; DEGL'INNOCENTI, E.; SOLDATINI. Assimilation of CO₂, enzyme activation and photosynthetic electron transport in bean leaves, as affected by high light and ozone. **New phytologist**, New York, v.156, p.377-388, 2002.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimação de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira "Marubakaido" e "M-26"**. 1999. 240p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.22, p.347-358, 1984.

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. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.2, p.176-181, 1998.

KHAN, 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**, Dordrecht, v.71, p.141-146, 2002.

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

KITAYA, Y. et al. Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.62, p. 15-24, 1995.

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**, Dordrecht, v.55, p.141-145, 1999.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, p.49-56, 1997.

KOZAI, T.; WATANABE, K.; JEONG, B.R. Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.64, p.1-9, 1995.

KOZLOWSKI, T.; KRAMER, P.I.; PALLARDY, S.G. **The physiological ecology of woods plants**. London: Academic, 1991. 657p.

LABOURIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABOURIAU, M.L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.23, p.237-257, 1961.

LAKSO, A.N. et al. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of in vitro-propagated grapevines after transfer from culture. **The Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.111, n.4, p.634-638, 1986.

LE, H.T.; HANCOCK, J.F.; TRINH, T.T. The fruit crops of Vietnam: introduced species and their native relatives. **Fruit Varieties Journal**. v.52, n.3, p.158-168, 1998.

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

LEE, N.; 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**, Rockville, v.78, p.637-641, 1985.

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

LEITE, G.B. Efeito de regulador de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação da pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. 1995. 50p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, 416, 1980. (abst. 321).

MANICA, I. Fruticultura - cultivo das Anonáceas: ata, cherimólia e graviola. Porto Alegre: EVANGRAF, 1994. 116p.

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.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MING, L.C. et al. Cyclopeptides from seeds of *Annona glabra*. *Phytochemistry*, Oxford, v.47, n.7, p.1293-1296, 1998.

MIYASHITA, Y. et al. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.65, p.199-202, 1996.

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

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.215-225, 2001.

NGUYEN, Q.T.; KOZAL, 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.

NIU, G.; KOZAL, T.; KUBOTA, C. A System for measuring the *in situ* CO₂ exchange rates of *in vitro* plantlets. *HortScience*, Alexandria, v.33, n.6, p.1076-1078, 1998.

PADMAJA, V. et al. Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, Ireland, v.48, p.21-24, 1995.

POSPISILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions-a review. *Biologia Plantarum*, v.42, n.4, p.481-497, 1999.

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

RASAI, S.; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.62, p.1-14, 1995.

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.

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

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I.; ARAUS, J.L. The effect of *in vitro* culture on the pattern of photoinhibition during acclimation of *Gardenia* plants to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*, Prague, v.39, n.1, p.67-73, 2001.

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

SERRET, M.D. et al. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.45, p.1-16, 1996.

SFENDLA, R. et al. Acclimatization of micropropagated American Ginseng plantlets for the replenishment of its wild populations and its production in Forest farming systems. *Biannual AFTA Convention*, Corvallis, p. 233-243, 2003.

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.

SIMÕES, M.O.M. Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra cultivadas *in vitro*. 1988. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Effect of different sugars on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in photoautotrophic tomato suspension cell cultures. *Photosynthetica*, Prague, v.39, n.4, p.611-614, 2002.

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.

SUTTER, E. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. *Canadian of Journal Botanical*, v.62, p.74-77, 1983.

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

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

SWARBRICK, J.T. The biology distribution, impact and control of five weeds of the wet tropics world heritage area. Queensland, Austrália Wet Tropics Management Agency, 1993. 63p.

SWARBRICK, J.T.; SKARRAT, D.B. The ecological requirements and potential Australian distribution of pond apple (*Annona glabra*). Queensland, Austrália: Wet Tropics Management Agency, 1994. 8p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos em plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433p.

VAZ, A.P.A.; KERBAUY, G.B.; RIBEIRO, R.C.L.F.; Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catsetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.54, p.105-111, 1998.

VYAS, S.; PUROHIT, S.D. *In vitro* growth and shoot multiplication of *Wrightia tomentosa* Roem et Schult in a controlled carbon dioxide environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.75, p.283-286, 2003.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, London, v.57, n.3, p.508-514, 1954.

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.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG W. Cauliflower shoot-culture: effects of different types of ventilation on growth and physiology. **Plant Science**, Clare, v.141, p.209-217, 1999.

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.

ZOBAYED, S.M.A. et al. Water control of *Ipomea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation. **Annals of Botany**, London, v.86, p.603-610, 2000a.

ZOBAYED, F.A. et al. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. **Plant Science**, Clare, v.157, p.225-231, 2000b.

ANEXO A**Página**

- TABELA 1A.** Resumo da análise de variância para o ponto de saturação da DFFFA em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 88
- TABELA 2A.** Resumo da análise de variância para a eficiência quântica aparente em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 88
- TABELA 3A.** Resumo da análise de variância para a concentração de açúcares solúveis em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 89
- TABELA 4A.** Resumo da análise de variância para a concentração de sacarose em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 89
- TABELA 5A.** Resumo da análise de variância para a concentração de amido em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 90

- TABELA 6A.** Resumo da análise de variância para o desdobramento dos valores médios de clorofila total nas fases de enraizamento (E) e multiplicação (M) em relação ao sistema de ventilação natural (N) sob baixa (B), média (M) e alta irradiância (A). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 90
- TABELA 7A.** Resumo da análise de variância para a espessura da epiderme adaxial em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 91
- TABELA 8A.** Resumo da análise de variância para a espessura do parênquima paliçádico em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 91
- TABELA 9A.** Resumo da análise de variância para a espessura do parênquima lacunoso em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 92
- TABELA 10A.** Resumo da análise de variância para a espessura da epiderme abaxial em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 92

TABELA 11A. Resumo da análise de variância para a espessura total do limbo foliar em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 93

TABELA 12A. Resumo da análise de variância para a frequência de estômatos em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004. 93

Tabela 1A. Resumo da análise de variância para o ponto de saturação da DFFFA em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	44.408,3333	2,324	0,1879
Irradiância (B)	1	179.808,3333	9,410	0,0202 *
Fecham. (C)	1	675,0000	0,035	0,8583
A x B x C	2	26.325,0000	1,378	0,3338
Resíduo	5	19.108,3333		
Total	11	552.891,6666		
CV (%)	28,16			
Média geral	490,83			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 2A. Resumo da análise de variância para a eficiência quântica aparente em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	0,000034	1,010	0,3610
Irradiância (B)	1	0,001180	35,402	0,5414
Fecham. (C)	1	0,000014	0,429	0,0011*
A x B x C	2	0,000016	0,476	0,6468
Resíduo	5	0,000033		
Total	11	0,002606		
CV (%)	16,91			
Média geral	0,0341			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 3A. Resumo da análise de variância para a concentração de açúcares solúveis em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	12.974,0126	40,302	0,0000 *
Fecham. (B)	1	11.754,9809	36,515	0,0000 *
Irradiância (C)	2	3.462,3964	10,755	0,0000 *
A x B x C	2	1.173,2731	3,645	0,6704
Resíduo	29	321,9206		
Total	35	43.336,0304		
CV (%)		23,69		
Média geral		75,72		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 4A. Resumo da análise de variância para a concentração de sacarose em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	101,9542	0,477	0,4986
Fecham. (B)	1	21.336,8675	92,296	0,0000*
Irradiância (C)	2	1.098,9701	5,063	0,0130*
A x B x C	2	277,6608	1,279	0,2935
Resíduo	29	217,0975		
Total	35	30.487,0409		
CV (%)		58,17		
Média geral		25,33		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 5A.Resumo da análise de variância para a concentração de amido em relação à fase da micropropagação (multiplicação e enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase	1	5,1938	0,369	0,5484
Fecham. (B)	1	430,6400	30,595	0,0000*
Irradiância (A)	2	99,2465	7,051	0,0033*
A x B x C	2	31,1714	2,215	0,1280
Resíduo	29	14,0757		
Total	35	1.090,7894		
CV (%)		52,30		
Média geral		7,18		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 6A.Resumo da análise de variância para o desdobramento dos valores médios de clorofila total nas fases de enraizamento (E) e multiplicação (M) em relação ao sistema de ventilação natural (N) sob baixa (B), média (M) e alta irradiância (A). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
E N A	(1)	0,04949	29,997	0,0054*
E N M	(1)	0,06284	38,084	0,0035*
E N B	(1)	0,02803	18,988	0,0146*
M N A	1	0,00038	0,233	0,6547
M N M	1	0,00419	2,541	0,1862
M N B	1	0,00303	8,365	0,1280
Resíduo	(5)	0,00660		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 7A. Resumo da análise de variância para a espessura da epiderme adaxial em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	52,1645	3,640	0,0581
vedação (B)	1	67,5894	4,716	0,0312*
Irradiância (A)	2	379,6815	26,493	0,0000*
A x B x C	2	20,4169	1,425	0,2434*
Resíduo	173	14,3313		
Total	179	3.399,2699		
CV (%)	12,99			
Média geral	29,14			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Tabela 8A. Resumo da análise de variância para a espessura do parênquima palicádico em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	646,7635	15,477	0,0001*
vedação (B)	1	34,4969	0,825	0,3648
Irradiância (A)	2	1.912,9069	45,775	0,0000*
A x B x C	2	604,7715	14,472	0,0000*
Resíduo	173	41,7895		
Total	179	12.946,1964		
CV (%)	14,37			
Média geral	44,99			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F

Tabela 9A. Resumo da análise de variância para a espessura do parênquima lacunoso em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	439,9220	3,259	0,0728
vedação (B)	1	6.456,0222	47,820	0,0000*
Irradiância (A)	2	3.440,9069	25,485	0,0000*
A x B x C	2	232,5604	1,723	0,1816
Resíduo	173	135,0054		
Total	179	37.598,1991		
CV (%)	15,83			
Média geral	73,40			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F

Tabela 10A. Resumo da análise de variância para a espessura da epiderme abaxial em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	24,2000	3,169	0,0768
vedação (B)	1	3,6409	0,477	0,4908
Irradiância (A)	2	112,1003	14,684	0,0000*
A x B x C	2	0,4571	0,060	0,9419
Resíduo	173	7,6362		
Total	179	1.574,0864		
CV (%)	12,76			
Média geral	21,65			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F

Tabela 11A. Resumo da análise de variância para a espessura total do limbo foliar em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	2.801,3445	13,068	0,0004*
vedação (B)	1	7.228,8694	33,721	0,0000*
Irradiância (A)	2	16.152,2800	75,346	0,0000*
A x B x C	2	618,4970	2,885	0,0585
Resíduo	173	214,3740		
Total	179	80.658,4686		
CV (%)		8,66		
Média geral		169,00		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F

Tabela 12A. Resumo da análise de variância para a frequência de estômatos em relação à fase da micropropagação (multiplicação ou enraizamento), ao sistema utilizado para vedação do frasco (convencional e ventilação natural) e ao nível de irradiância (baixa, média e alta). Dados não transformados. UFLA. Lavras, MG, 2004.

F.V.	G.L.	QM	Fc	Pr.>Fc
Fase (A)	1	1.179,2667	0,175	0,6761
vedação (B)	1	535.437,0667	79,450	0,0000*
Irradiância (A)	2	142.236,2907	21,105	0,0000*
A x B x C	2	332.862,6587	49,391	0,0000*
Resíduo	233	6.739,3064		
Total	239	3.057.072,4686		
CV (%)		25,93		
Média geral		316,59		

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F