



JEFFERSON HENRIQUE SANTOS SILVA

**SISTEMA NATURAL, LUZ E NUTRIÇÃO EM PLÂNTULAS
DE *Saccharum officinarum* IN VITRO**

**LAVRAS – MG
2023**

JEFFERSON HENRIQUE SANTOS SILVA

SISTEMA NATURAL, LUZ E NUTRIÇÃO EM PLÂNTULAS DE
Saccharum officinarum **IN VITRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

LAVRAS – MG
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Jefferson Henrique Santos.

Sistema natural, luz e nutrição em plântulas de *Saccharum
officinarum in vitro* / Jefferson Henrique Santos Silva. - 2023.

97 p. : il.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Biotecnologia Vegetal. 3.
Micropropagação. I. Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II. Título.

JEFFERSON HENRIQUE SANTOS SILVA

**SISTEMA NATURAL, LUZ E NUTRIÇÃO EM PLÂNTULAS DE
Saccharum officinarum IN VITRO**

**NATURAL SYSTEM, LIGHT AND NUTRITION IN SEEDLINGS OF
Saccharum officinarum IN VITRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 17 de março de 2023.

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Dr ^a . Flavia Dionisio Pereira	IF GOIANO RIO VERDE
Dr ^a . Priscila Pereira Botrel	IFSULDEMINAS
Dr. Filipe Almendagna Rodrigues	UFLA
Dr. Alexandre Alves de Carvalho	UFLA

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação acadêmica e pessoal. Em especial à Universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia pela oportunidade concedida e, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos - Código de Financiamento 001.

Meu muito obrigado!

Aos meus pais, Nara Oliveira (In memoria) e Gilson Cavalcante, pelo amor, cuidado e carinho em todos os momentos, tornando possível esta conquista.

Dedico

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil, plantada em quase todo o território e adaptada as diferentes regiões do país. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência de sistema de ventilação natural, intensidade de luz, espectro luminoso e composição do meio de cultura no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar. Brotações laterais foram cultivadas em meio MS e mantidas sob delineamento inteiramente casualizados (DIC). Artigo I - esquema fatorial duplo 3x3, sendo três números de explante por frasco (5, 10 e 20) e três sistemas de ventilação (Sem filtro - SC, com dois filtros - SVN2 e quatro filtros - SVN4). Artigo II - mantidas sob cinco intensidades de luz: 26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sob diferentes espectros de luz: monocromática branca; vermelho; azul e combinações de azul - %A e vermelho - %V: (30:70; 70:30; e 50:50). Artigo III - redução da concentração original dos sais NH_4NO_3 e KNO_3 , em porcentagem e da intensidade de luz, sendo três concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 (25, 50 e 100%) e cinco intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O terceiro experimento também consistiu no aumento da concentração original dos sais CaCl_2 e MgSO_4 (100, 200 e 400%) e variações do pH (5,50; 5,75 e 6,00). Após 35 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados os parâmetros de crescimento agrônômico e pigmentos fotossintéticos. Houve menor acúmulo de massa seca com o aumento do número de explantes por frasco. Para os parâmetros de crescimento agrônômico o sistema de ventilação natural com quatro filtros e 5 explante por frascos proporcionaram maiores ganhos. No entanto, o sistema de ventilação natural com quatro filtros, 10 e 20 explantes por frascos resultou em acúmulo de massa seca das plântulas, o que favoreceu o crescimento da planta durante a fase de aclimatização. Recomenda-se o uso de membranas porosas na micropropagação de cana-de-açúcar com 10 e 20 explantes por frasco. A intensidade de luz de 113 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultou na maior produção de massa seca e de pigmentos fotossintéticos, proporcionando o maior vigor da plântula. Os espectros luminosos monocromáticos branco, azul e vermelho resultaram em plântulas com maior acúmulo de massa seca (MSPA, MSR, MST), e o espectro 50% azul:50% vermelhos na biossíntese dos pigmentos fotossintéticos. No terceiro experimento, o sistema radicular atingiu maiores comprimentos com maiores intensidades e menores concentrações de nitrogênio. O diâmetro do colmo das plântulas também foram melhores desenvolvidos à medida que aumentou a intensidade de luz independente da concentração de sais. O aumento da concentração dos sais de NH_4NO_3 e KNO_3 reduziu o acúmulo da massa seca da raiz. As maiores medias dos pigmentos fotossintético, foram obtidas quando submetidas a intensidade de luz mais alta, em todas as concentrações de nitrogênio. Nas intensidades 70, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve a maior produção de massa seca total. Meio de cultura com 200% da força de Ca e Mg do MS e pH 5,5 favoreceu a maior produção de massa seca.

Palavras-chaves: Cana-de-açúcar. Intensidade luminoso. Meio de cultura.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the main crops in Brazil, planted in almost the entire territory and adapted to the different regions of the country. The objective of this work was to evaluate the influence of the natural ventilation system, light intensity, light spectrum and composition of the culture medium on the in vitro cultivation of sugarcane. Lateral shoots were cultivated in MS medium and maintained in a completely randomized design (DIC). Article I - 3x3 double factorial scheme, with three numbers of explants per flask (5, 10 and 20) and three ventilation systems (Without filter - SC, with two filters - SVN2 and four filters - SVN4). Article II - kept under five light intensities: 26, 70, 100, 113 and 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and under different light spectra: monochromatic white; red; blue and combinations of blue - %A and red - %V: (30:70; 70:30; and 50:50). Article III - reduction of the original concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 salts, in percentage and light intensity, with three concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 (25, 50 and 100%) and five light intensities (26, 70, 100, 113 and 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The third experiment also consisted of increasing the original concentration of CaCl_2 and MgSO_4 salts (100, 200 and 400%) and pH variations (5.50; 5.75 and 6.00). After 35 days of in vitro cultivation, agronomic growth parameters and photosynthetic pigments were evaluated. There was less accumulation of dry mass with the increase in the number of explants per flask. For the agronomic growth parameters, the natural ventilation system with four filters and 5 explants per flask provided greater gains. However, the natural ventilation system with four filters, 10 and 20 explants per flask resulted in accumulation of seedling dry mass, which favored plant growth during the acclimatization phase. The use of porous membranes in the micropropagation of sugarcane with 10 and 20 explants per flask can be recommended. The light intensity of 113 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resulted in the highest production of dry mass and photosynthetic pigments, providing the highest seedling vigor. The white, blue and red monochromatic light spectra resulted in seedlings with higher dry mass accumulation (MSPA, MSR, MST), and the 50% blue:50% red spectrum in the biosynthesis of photosynthetic pigments. In the third experiment, the root system reached greater lengths with higher intensities and lower nitrogen concentrations. The stem diameter of the seedlings was also better developed as the light intensity increased, regardless of the salt concentration. Increasing the concentration of NH_4NO_3 and KNO_3 salts reduced root dry mass accumulation. The highest averages of the photosynthetic pigments were obtained when subjected to the highest light intensity, in all nitrogen concentrations. At intensities 70, 113 and 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ there was the highest total dry mass production. Culture medium with 200% of the Ca and Mg strength of DM and pH 5.5 favored the highest production of dry mass.

Keywords: Sugar cane. Intensity spectrum. Culture medium.

LISTA DE FIGURA

ARTIGO I

- Figura 1 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias cultivados *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023..... 32
- Figura 2 – Aspecto visual das plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação: A) Sistema Convencional - SC; B) Sistema de Ventilação Natural com dois Filtros - SVN2 e C) com 4 Filtros - SVN4 e números de explantes por frasco (5; 10 e 20). UFLA – Lavras, 2023..... 34
- Figura 3 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias cultivados *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.....35
- Figura 4 – Parâmetros de crescimento agrônômico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ex vitro aos 60 dias de aclimatização, oriundas de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.....37
- Figura 5 – Aspecto visual de plantas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 60 dias de aclimatização, oriundas de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação: Sistema Convencional - SC; Sistema Natural com dois Filtros - SVN2 e com quatro filtros - SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavras, 2023..... 39

ARTIGO II

- Figura 1 – Aspecto visual das plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023..... 57
- Figura 2 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 58
- Figura 3 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum oficinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 60
- Figura 4 – Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz: B – branca; A – azul; V – vermelha. UFLA – Lavras, 2023..... 62

- Figura 5 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz..... 63
- Figura 6 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz..... 65

ARTIGO III

- Figura 1 – Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, sob diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentrações de nitrogênio do meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023..... 82
- Figura 2 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio do meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). e..... 83
- Figura 3 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura MS (25%, 50% e 100%) 85
- Figura 4 – Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* em sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes pH (5,5, 5,75 e 6,0) e concentrações de cálcio e magnésio (100, 200 e 400%) no meio de cultura MS. UFLA – Lavras, 2023..... 87
- Figura 5 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* em sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes pH (5,5, 5,75 e 6,0) e diferentes concentrações de cálcio e magnésio no meio de cultura MS (100%, 200% e 400%) 88

LISTA DE TABELA

ARTIGO I

- Tabela 1 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023..... 49
- Tabela 2 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023..... 50
- Tabela 3 – Parâmetros de crescimento agrônômico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) *ex vitro* aos 60 dias de aclimatização, oriundas de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação: sistema convencional - SC; sistema natural com dois filtros - SVN2 e com quatro filtros - SVN4 e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023..... 51

ARTIGO II

- Tabela 1 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023..... 73
- Tabela 2 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023..... 74
- Tabela 3 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz. UFLA – Lavras, 2023..... 75
- Tabela 4 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz. UFLA – Lavras, 2023..... 76

ARTIGO III

- Tabela 1 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio do meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023..... 95

Tabela 2 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023.....	96
Tabela 3 – Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana de açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> em sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes pH (5,5, 5,75 e 6,0) e diferentes concentrações de cálcio e magnésio no meio de cultura MS (100%, 200% e 400%). UFLA – Lavras, 2023.....	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Importância da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	14
2.2. Aspecto Botânico e Agrônômico da Cana-de-açúcar	15
2.3. Micropropagação	16
2.4. Sistema de Ventilação.....	16
2.5. Intensidade e espectro luminoso	17
2.6. Meio de Cultivo	18
REFERÊNCIAS.....	20
ARTIGOS	25
Artigo I - SISTEMA DE MEMBRANA E NÚMERO DE EXPLANTE NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.	26
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODO	27
2.1. Material vegetal e condições de cultura.....	27
2.2. Sistema de ventilação natural e número de explante por frasco	28
2.3. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo <i>in vitro</i>	28
2.4. Análise de pigmentos fotossintéticos do cultivo <i>in vitro</i>	28
2.5. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo <i>ex vitro</i>	29
2.6. Análise estatística	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Sistema de ventilação natural e número de explante por frasco	30
3.1.1. Parâmetros de crescimento agrônômico <i>in vitro</i>	30
3.1.2. Pigmentos fotossintéticos.....	35
3.1.3. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo <i>ex vitro</i>	36
4. DISCUSSÃO.....	40
4.1. Sistema de ventilação natural e número de explante por frasco	40
4.2. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo <i>ex vitro</i>	41
5. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
Artigo II – INTENSIDADE DE LUZ E ESPECTROS LUMINOSOS NO DESEMPENHO AGRÔNÔMICO E FOTOSSINTÉTICO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA <i>IN VITRO</i>	52
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODO	53
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	53
2.2. Intensidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	54
2.3. Qualidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	54
2.4. Avaliações de Parâmetros de crescimento agrônômico.....	54

2.5.	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	54
2.6.	Análise estatística	55
3.	RESULTADOS	55
3.1.	Intensidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	55
3.1.1.	Parâmetros de crescimento agrônômico.....	55
3.1.2.	Pigmentos fotossintéticos.....	59
3.2.	Qualidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	60
3.2.1.	Parâmetros de crescimento agrônômico.....	60
3.2.2.	Pigmentos fotossintéticos.....	64
4.	DISCUSSÃO.....	65
4.1.	Intensidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	65
4.2.	Qualidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	67
5.	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	Artigo III - CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO, Ca e Mg INTENSIDADES DE LUZ, VARIÇÕES DO pH NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN VITRO</i>	77
1.	INTRODUÇÃO.....	77
2.	MATERIAL E MÉTODO	78
2.1.	Material vegetal e condições de cultura.....	78
2.2.	Diferentes concentrações de nitrogênio sob diferentes intensidades de luz	79
2.3.	Diferentes concentrações Ca e Mg sob variações do pH do meio de cultura	79
2.4.	Análise dos parâmetros de crescimento agrônômico.....	79
2.5.	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	79
2.6.	Análise estatística	80
3.	RESULTADOS	80
3.1.	Diferentes concentrações de nitrogênio sob diferentes intensidades de luz	80
3.1.1.	Parâmetros de crescimento agrônômico	80
3.1.2.	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	84
3.2.	Diferentes concentrações Ca e Mg sob variações do pH do meio de cultura	86
3.2.1.	Parâmetros de crescimento agrônômico.....	86
4.	DISCUSSÃO.....	89
4.1.	Diferentes concentrações de nitrogênio sob diferentes intensidades de luz	89
4.2.	Diferentes concentrações Ca e Mg sob variações do pH do meio de cultura	89
5.	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), é uma das plantas mais eficientes no emprego e conversão de energia solar em açúcar, sendo responsável pelo abastecimento de aproximadamente 80% de açúcar (sacarose) e 35% da produção total de etanol do mundo (TOLERA et al. 2014). Pertencente à família Poaceae (Gramineae) e ao gênero *Saccharum*, a cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea, perene, com caule cilíndrico, folhas alternadas, inflorescência do tipo espiguetas e fruto cariopse contendo semente (SOUZA, 2012). De propagação preferencialmente por meio de fragmentos vegetativo, o que exige uma enorme quantidade de material propagativo para o plantio, de 15 a 21 gemas/metro, o que corresponde de 11 a 14 toneladas de colmos/hectare.

A cultura de tecidos é uma ferramenta amplamente utilizada na agricultura para contornar problemas relacionados à produção vegetal. O cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar possibilita a produção de mudas em larga escala, de forma rápida e em pouco espaço de tempo, com produção ao longo do ano sem influência de fatores ambientais. Além de possibilitar melhorias nas características fisiológicas das plantas, como também no aumento do rendimento da cultura de 10 para 30% e longevidade de 30% (LEE et al. 2007). Sendo assim, uma excelente alternativa para a redução de material propagativo para a renovação ou implantação de um canavial.

Porém, sabe-se que alguns fatores no condicionamento do cultivo *in vitro* promovem anomalias nas estruturas morfo-anatômicas das plantas, proporcionando alto índice de mortalidade quando os levados a campo (ALVAREZ et al., 2012). Diversos métodos vêm sendo estudados para contornar essa condição no cultivo *in vitro*, dentre eles, o uso de tampas com membranas permeáveis a gases com ventilação natural, aumento da intensidade luz, espectro luminoso e, a composição do meio de cultura.

Dessa forma, esta pesquisa teve como principal objetivo avaliar a influência de sistema de ventilação natural, intensidade de luz, espectro luminoso e composição do meio de cultura no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Dentre os mais de 100 países produtores de cana-de-açúcar, o Brasil se destaca atualmente como a maior produção e exportação de açúcar, seguido pela Índia, China, Tailândia e Paquistão, e segundo colocado na produção e exportação de etanol (FAO, 2022; CONAB, 2022).

A estimativa da safra 2022/2023 é que o Brasil produza 33,89 milhões de tonelada de açúcar e 30,35 bilhões de litros de etanol derivado da cana-de-açúcar colhidas nos 8.127,7 mil hectares. A Região Centro-Sul representa cerca de 90% da produção total do país, com produtividade estimada atualmente em 71.345 kg/ha, 1,3% superior à obtida na safra anterior. Já para a Região Norte/Nordeste, as boas condições climáticas vêm beneficiando as lavouras, indicando ganho de 5,9% na produtividade, estimada em 63.709 kg/ha. (CONAB, 2022).

A crescente busca por fontes de energias renováveis leva o país a investir cada vez mais no aumento de áreas para cultivo de cana-de-açúcar. Espera-se que a área de cultivo desta cultura no Brasil, aumente mais de 5 milhões de hectares até 2030, principalmente, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Pará, através da conversão de pastagens (ALKIMIM et al., 2015).

No Brasil, o período entre 2000 e 2008 foi marcante para o crescimento do setor sucroenergético. A abertura da economia brasileira para o mercado externo na década de 1990 permitiu o crescimento do comércio do açúcar (SCHEITERLE et al., 2017). O aumento da demanda para o consumo de etanol com advento dos veículos flex fuel impulsionou ainda mais esse crescimento. Dessa forma, o setor sucroenergético tem efeitos socioeconômicos nas regiões produtoras de cana-de-açúcar, gerando empregos, aumentando as receitas municipais e, conseqüentemente, é fundamental para o crescimento da economia brasileira (MORAES et al., 2016).

O maior interesse pela cana-de-açúcar é devido à alta concentração de sacarose (90%) em seu caule, além de glicose e frutose (SINDHU et al., 2016), e os principais produtos derivados desta cultura são açúcar e etanol. O açúcar é amplamente utilizado na alimentação humana, na conservação de alimentos e também na indústria farmacêutica. O etanol é considerado uma energia limpa e renovável para o setor de biocombustíveis com grande demanda pelo mercado nacional e internacional, e pode ser usado na sua forma hidratada em

veículos flex fuel ou misturado à gasolina para reduzir a emissão de poluentes, sendo este denominado etanol anidro (CARPIO; SOUZA, 2017).

Além disso, o setor sucroalcooleiro tem buscado o uso de subprodutos como forma de reduzir custos de produção e aumentar a produtividade. O resíduo gerado pela produção de cana-de-açúcar e seus principais produtos, tem potencial para ser utilizado como fonte de subprodutos. A cana-de-açúcar é altamente eficiente na conversão de energia luminosa em energia química, sendo o componente de maior interesse é a sacarose. Contudo, a palha derivada da colheita, o bagaço gerado da extração do caldo, o melaço e a vinhaça, resíduos da produção de açúcar e etanol, são subprodutos com alto valor agregado (VU et al., 2006; SINDHU et al., 2016).

2.2. Aspecto Botânico e Agrônômico da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea, pertencente à família Poaceae (Gramineae) e ao gênero *Saccharum*. Planta perene, com caule cilíndrico, folhas alternas, inflorescência do tipo espiguetas e fruto cariopse, com uma semente (SOUZA, 2012). Seus atuais cultivares são híbridos interespecíficos, sendo que nas constituições genéticas participam as espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* (GUPTA et al., 2010).

As características varietais definem o número de colmos por planta, a altura e o diâmetro do colmo, o comprimento e a largura das folhas e a arquitetura da parte aérea, sendo a expressão destes caracteres muito influenciados pelo clima, pelo manejo e pelas práticas culturais utilizadas (MAGRO et al., 2011).

O florescimento da cana-de-açúcar é um processo natural entre as gramíneas e é indispensável para a sobrevivência da espécie. Porém, do ponto de vista da produção, isso se caracteriza como uma desvantagem, uma vez que o florescimento paralisa o crescimento vegetativo do colmo e com evidente perda do rendimento de açúcar, haja vista que a planta inicia a translocação de assimilados para a formação da folha bandeira, a qual protegerá a inflorescência, que também recebem assimilados. Após o florescimento pleno a cultura entra em senescência, permitindo novas brotações, o que impacta negativamente no açúcar total recuperável (ATR), uma vez que a planta também precisa translocar assimilados para os novos brotos (CHABREGAS, 2010; CONAB, 2022).

Trata-se de uma planta de reprodução sexuada, porém como o florescimento é uma característica indesejável em cultivos comerciais de cana-de-açúcar, por reduzir a produção de

sacarose, quando cultivada comercialmente é multiplicada assexuadamente, por propagação vegetativa, pedaços de colmo (rebolo ou tolete) contendo uma ou mais gemas (JADOSKI et al, 2010; CHABREGAS, 2010; BRAMBILLA, 2013).

O chamado colmo-semente apresenta uma série de desuniformidades, oriunda de fatores fisiológicos, morfológicos e climáticos e uma amplitude de manejos fitotécnicos aplicados ou não ao longo do processo (XAVIER et al., 2014). Esforços combinados estão sendo realizados para o aperfeiçoamento de técnicas para sua propagação. A quantidade de estudos envolvendo a cana de açúcar não é proporcional à sua importância em termos de fonte alimentar e de energia (BRAMBILLA, 2013).

2.3. Micropropagação

Na técnica de micropropagação, são fornecidos todos os nutrientes, fonte de carbono, vitaminas e água no meio de cultura para a morfogênese do explante. Após inoculado, os explantes são condicionados em salas de crescimento com iluminação, temperatura e fotoperíodo controlados essenciais para o crescimento e desenvolvimento do explante. O desenvolvimento do explante pode, ser manipulado pela adição de reguladores de crescimento da planta em estádios específicos de crescimento ou maturação (PHILLIPS; GARDA, 2019).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ser influenciada por diversos fatores, como o genótipo, fonte e condições fisiológicas do explante, combinação de fitorreguladores de crescimento, meio de cultivo e as condições de cultivo (LUCIANI et al., 2006; DUTRA et al., 2009).

A cultura de tecidos apresenta como vantagens para a produção de mudas a facilidade de produção em larga escala em curto espaço de tempo, com produção ao longo do ano sem a influência de fatores ambientais, em condições controladas. Além disso, permite garantia de mudas com características genéticas superiores às produzidas por outras técnicas de propagação (GONÇALVES e ROMANO, 2013; AMARAL-BAROLI et al., 2016), bem como a possibilidade de melhoria nas características fisiológicas das plantas derivadas *in vitro*, como um aumento no rendimento da cultura de 10 para 30% e longevidade de 30% (LEE et al. 2007).

2.4. Sistema de Ventilação

No sistema convencional de cultivo os explantes são acondicionados em frascos lacrados, sem ventilação ou troca gasosa. Tais condições podem resultar em vários distúrbios

morfológicos, os quais são causados pelo acúmulo de gases no interior dos frascos, proporcionado pela alta umidade relativa. Como distúrbios morfológicos incluem alterações anatômicas, como estômatos deformados ou anomalias estomáticas, causadas pela falta de trocas gasosas no ambiente, além de comprometer os teores dos pigmentos fotossintéticos, bem como a condutância estomática (MONJA-MIO et al., 2015; GAGO et al., 2016).

Diferentes métodos para contornar essa condição no cultivo *in vitro* vêm sendo estudados, dentre eles, o uso de tampas com membranas permeáveis a gases com ventilação natural. A troca gasosa entre o ambiente interno e externo reduz a umidade relativa dentro dos recipientes de cultivo e aumenta a transpiração e absorção de água e, conseqüentemente de nutrientes pelas plantas, podendo resultar em maior fotossíntese e, conseqüentemente, em maior taxa de crescimento e melhoria no processo de aclimatização (KITAYA et al., 2005; KOZAI 2010; IVANOVA e STADEN, 2010, XIAO et al., 2011).

O cultivo de plantas micropropagadas em ambientes que permitem a troca gasosa, com sistema de ventilação natural, podem aumentar a biossíntese de pigmentos, melhorar o desempenho fotossintético promovido pelo aumento de CO₂ e redução da umidade relativa do ar. Além de permitir que as plantas desenvolvam mecanismos de adaptação para evitar a perda excessiva de água, melhorar a qualidade nutricional das mudas, e conseqüentemente reduzir as perdas de plantas micropropagadas, durante a aclimatização (BAKER, 2008; CHA-UM et al., 2011; SALDANHA et al., 2013).

Atualmente, vários estudos vêm sendo realizados com uso de membranas que permitem trocas gasosas com o propósito de obter melhores plântulas na propagação *in vitro* em diferentes espécies, como *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2014), *Cattleya walkeriana* (SILVA et al., 2014), *Lippia alba* (BATISTA et al., 2017). *Plectranthus amboinicus* (SILVA et al., 2017). *Lippia gracilis Schauer* (LAZZARINI et al., 2018) e *Eugenia dysenterica* (SILVEIRA et al., 2019).

2.5. Intensidade e espectro luminoso

As plantas são organismos fotoautotróficos oxigenados, que necessitam da luz para realizar fotossíntese e sintetizar compostos carbonados complexos. Elas percebem os sinais de luz através de fotorreceptores que detectam comprimentos de onda específicos, traduz e gera respostas fisiológica (SHIN et al., 2013).

No cultivo *in vitro* a luz solar é substituída por lâmpadas de LED e/ou fluorescentes em salas de crescimento. (ROCHA et al., 2017). O uso de lâmpadas de LED (diodo emissor de luz)

como fonte de iluminação na sala de crescimento dos laboratórios de micropropagação, é uma alternativa que apresenta diversas vantagens, tais como, controle do espectro de luz emitido, baixo consumo de energia elétrica e maior durabilidade. Além disso, devido às propriedades espectrais atingida pela luz de LED é possível regular as respostas morfogênicas *in vitro* como variações anatômicas, morfológicas e atributos fisiológicos, alongamento, e rizogênese, bem como habilidades fotossintéticas (FAÇANHA et al., 2018; DUTTA-GUPTA et al., 2020).

As plantas cultivadas *in vitro* apresentam diferentes respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários quando expostas a diferentes condições de luz (ALVARENGA et al., 2015). A carência de fóton pode reduzir a capacidade fotossintética da planta de produzir fotoassimilado, interferindo negativamente no crescimento do vegetal. Já o excesso, pode formar espécies reativas de oxigênio, afetando a produção de subprodutos da fotossíntese (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001; TAIZ e ZEIGER, 2017).

Assim, a modificação da intensidade de luz e do espectro luminoso, no microambiente *in vitro*, pode trazer diversos benefícios fisiológicos para as plantas. Já que, cada planta apresenta necessidades específicas de fótons e comprimentos de onda para o seu desenvolvimento (KOZAI e ZHANG 2016; HSIE et al., 2019).

Outros fatores, como influência da intensidade luminosa e qualidade espectral vem sendo bastante estudadas na morfogênese de plântulas em várias espécies, como: *urtica dioica* (COELHO et al., 2021), *Mentha arvensis* (DE OLIVEIRA et al., 2021), e *Aeollanthus suaveolens* (ARAÚJO et al., 2021).

2.6. Meio de Cultivo

O meio de cultivo é composto basicamente das combinações de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e hidratos de carbono (DAVEY e ANTHONY, 2010), o qual permite condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* do tecido vegetal (CORDEIRO et al., 2014).

Um dos fatores que mais influenciam o sucesso da propagação *in vitro* é o equilíbrio nutricional do meio de cultura, e este deve interagir positivamente com o material genético (ALMEIDA, 2012). A maioria dos protocolos de micropropagação utilizam meios de culturas com composição nutricional estabelecida, sem considerar as necessidades nutricionais da espécie cultivada, podendo representar um fator limitante às respostas morfogênicas, o que pode ocasionar o insucesso do processo para espécies mais exigentes (ALMEIDA, 2012).

No entanto, o desenvolvimento de um meio adequado para uma cultura específica é uma tarefa bastante complexa, já que deve-se considerar as necessidades nutricionais da espécie e dos fatores genéticos do material em estudo. Recentemente os nutrientes requeridos por concentrações intermediárias, classificados como componentes Mesos foram identificados como um dos grupos de nutrientes mais influentes no meio Murashige e Skoog (WADA et al., 2013). Em algumas espécies estudadas, a quantidade de nutrientes que compõe o grupo Meso apresentaram insuficientes para o bom crescimento e multiplicação de *Pyrus* sp. (HAND et al., 2014); *Rubus idaeus* L. (POOTHONG e REED 2014) e *Corylus avellana* L. (REED et al., 2013); *Dysphania ambrosioides* L. (DE CARVALHO et al., 2018).

Protocolos de propagação *in vitro* de cana-de-açúcar têm sido estabelecidos a partir do meio de cultura Murashige e Skoog. Porém, não se sabe se, este meio é o que melhor responde aos processos morfogênicos desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ALKIMIM, A., SPAROVEK, G., CLARKE, K. C. **Converting Brazil's pastures to cropland: An alternative way to meet sugarcane demand and to spare forestlands.** *Applied Geography*, v. 62, p. 75-84, 2015.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação in vitro de brotações de Eucalyptus citriodora** (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALVARENGA, I. C. A. et al. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.
- ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 110(1):93–101, 2012.
- AMARAL-BAROLI, A. et al. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 180-185, 2016.
- ARAÚJO, D. X.; ROCHA, T. T.; DE CARVALHO, A. A.; et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under *in vitro* conditions. **Ind Crops Prod**, 168:113597, 2021.
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. **Annual Reviews of Plant Biology**, 59:89-113, 2008.
- BATISTA, D. S.; CASTRO, K. M.; KÖEHLER, A. D.; et al. Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates qualitative essential oil production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Cultivo de órgão de tecido celular vegetal**, 128: 357-368, 2017.
- BRAMBILLA, W. P. **Estudo da fisiologia de gemas laterais de cana-de-açúcar durante o armazenamento.** 2013. 39 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). UNESP – Campus de Botucatu, 2013.
- CARPIO, L. G. T., SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and secondgeneration ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771-780, 2017.
- CHABREGAS, S. M. **Melhoramento molecular da cana-de-açúcar CTC para eficiência fisiológica.** In: CRUSCIOL, C. A. C.; SILVA, M. A.; ROSSETTO, R.; SORATTO, R.P. Tópicos em ecofisiologia da cana-de-açúcar. Botucatu: FEPAF - Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2010. 111 p.
- CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A. et al. Promoting

root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s.l.], v. 106, n. 3, p. 435, 2011.

COELHO, A. D. et al. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 1, p. 59-74, 2021.

CONAB. (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília: Conab, 2022.

CORDEIRO, G.M.; BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação in vitro de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 103, p. 337-344, 2014.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Singapore: Markono Print Media Pte, 2010. 341 p.

DE CARVALHO, A. A.; VILELA BERTOLUCCI, S. K.; DA SILVA, G. M. et al. Mesos componnets (CaCl, MgSO , KH PO) induced changes in growth and ascaridole content of *Dysphania ambrosioides* L. in vitro. **Ind Crops Prod**, 122: 28–36, 2018.

DE OLIVEIRA, T. et al. The effect of alternative membrane system, sucrose, and culture methods under photosynthetic photon flux on growth and volatile compounds of mint in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, n. 3, p. 529-540, 2021.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009.

DUTTA-GUPTA, S.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep**, 7:211–220, 2013.

FAÇANHA, D. C.; SILVA, E. J.; SANTOS, C. A.; PEREIRA, M. C. N.; LOPES, R., QUISEN, R. C. Efeitos de diferentes tipos de luz na micropropagação de brotações de bananeira cultivar Pacovan. **Anais da XV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**, 2018.

FAO, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, FAOSTATS. 2019.

GAGO, J.; DALOSO, D.; DE, M.; FIGUEROA, C. M.; FLEXAS, J.; FERNIE, A. R.; NIKOLOSKI, Z. Relationships of Leaf Net Photosynthesis, Stomatal Conductance, and Mesophyll Conductance to Primary Metabolism: A Multispecies Meta-Analysis Approach. **Plant Physiology**, 171:265-279, 2016.

GONÇALVES, S; ROMANO, A. Cultura in vitro de alfazema (*Lavandula* spp.) E produção de metabólitos secundários. **Avanços da biotecnologia**, v. 31, n. 2, pág. 166-174, 2013.

GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M.N.; GUPTA, R.S.; SINGH, J.; DUTTAMAJUMDER, S.K.; SUMAN, A.; KHURANA, J.P.;

KAPUR, R.; TYAGI, A.K. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. **Functional Integrative Genomics**, New Delhi, v.10, n.2, p.207-214, 2010.

HAND, C.; REED, B. M. Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 119: 427–439, 2014.

HSIE, B. S. D.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Growth regulators induce shoot regeneration and volatile compound production in *Lippia rotundifolia* Cham., an endangered medicinal plant. **Ind Crop Prod**, 137:401–409, 2019.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, n.2, p.143-150, 2010.

JADOSKI, C.; TOPPA, E. V. B.; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v.3, n.2, p.169-176, 2010.

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Manipulation of the culture environment on in vitro air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 83, n.3, p. 251–257, 2005.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, n.4, p.188-204, 2010

KOZAI, T.; ZHANG, G. Some Aspects of the Light Environment. In: In: Kozai T., Fujiwara K., Runkle E. (eds) LED Lighting for Urban Agriculture. **Springer**, p. 49-55, 2016

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V. et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 135(3):367–379, 2018.

LEE, T. S. G.; BRESSAN, E. A.; CORRÊA DA SILVA, A. D.; LEE, L. L. **Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos**. 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais / 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas / 1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas. 2007.

LUCIANI, G.F.; MARY, A.K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N.R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.87, p.39-143, 2006.

MAGRO, F. J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P. E.; TAKAMATSU, S. Y. **Biometria em cana-de-açúcar**. Universidade de São Paulo escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. lpv0684- produção de cana-de-açúcar, Piracicaba, 2011.

MONJA-MIO, K. M.; POOL, F. B.; HERRERA, G. H.; ESQUEDAVALLE, M.; ROBERT, M. L. Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. “Bacanora” plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. **Scientia Horticulturae**,

189:32-40, 2015.

MORAES, M. A. F. D.; BACCHI, M. R. P.; CALDARELLI, C. E. Accelerated growth of the sugarcane, sugar, and ethanol sectors in Brazil (2000–2008): Effects on municipal gross domestic product per capita in the south-central region. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 116-125, 2016.

MÜLLER, P.; LI, X.-P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant physiology**, [s.l.], v. 125, n. 4, p. 1558-1566, 2001.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 242-257, 2019.

POOTHONG, S.; REED, B. M. Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. **Sci Hortic** 165: 132–14, 2014.

REED, B. M.; WADA, S.; DENOMA, J.; NIEDZ, R. P. Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. **In Vitro Cell Dev Biol – Plant**, 49: 343–355, 2013.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; BASTOS, C. R.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, n. 55, p. 14–19, 2013.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F.; NETO, A. R.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 4, p. 433-444, 2013.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D.I. et al. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of in vitro Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 118, 87–99 (2014).

SCHEITERLE, L., ULMER, A., BIRNER, R., PYKA, A. From Commodity-Based Value Chains to Biomass-Based Value Webs: The Case of Sugarcane in Brazil's Bioeconomy. **Journal of Cleaner Production**, 2017.

SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Sugar metabolism, photosynthesis and in vitro seedling growth of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cell Dev Bio-Plant**, 49: 445–454, 2013.

SILVA, A. B. D.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S. D.; MOREIRA, A. L. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Rev Ceres**, 61(6):883–890, 2014.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B, et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the in vitro cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 129(3) :501–510, 2017.

- SILVEIRA, A. A. C; et al. Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems. **Revista Ceres**, v. 66, n. 5, p. 363-371, 2019.
- SINDHU, R., GNANSOUNOU, E., BINOD, P., PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products—An overview. *Renewable Energy*, v. 98, p. 203-215, 2016.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG III. 3., SP: Instituto Plantarum. Editora Nova Odessa, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2017) **Plant physiology and development**, 6th edn. Artmed Editora, Porto Alegre.
- TOLERA, B.; DIRO, M.; BELEW, D. Effects of 6-benzyl aminopurine and kinetin on in vitro shoot multiplication of sugar cana (*Saccharum officinarum* L.) variedades. **Adv Crop Sci Tech**. 2: 1-5, 2014.
- VU, J. C. V., ALLEN, L. H., GESCH, R. W. Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. **Plant Science**, v. 171, n. 1, p. 123-131, 2006.
- WADA, S.; NIEDZ, R. P.; DENOMA, J.; REED, B. M. Mesos components (CaCl₂, MgSO₄, KH₂PO₄) are critical for improving pear micropropagation. **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant** 49, p. 356–365, 2013.
- XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; MENDONÇA, J. R. Fatores de desuniformidade e kit de pré-brotação IAC para sistema de multiplicação de cana-de-açúcar mudas pré-brotadas (MPB). **Instituto Agrônomo**. Campinas, 2014. 22 p.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.2, p.149-158, 2011.

ARTIGOS

Artigo I - Sistema de membrana e número de explante no crescimento de plântulas de cana-de-açúcar.

Resumo

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil, plantada em quase todo o território e adaptada as diferentes regiões do país. O objetivo do trabalho foi determinar a relação mais adequada entre o sistema de ventilação natural e número de explantes por frasco no desempenho agrônomo *in vitro* e *ex vitro* e fisiológico de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivadas *in vitro*. Plântulas de aproximadamente 2cm, cultivadas *in vitro* oriundas de embriogênese somática foram utilizadas no experimento. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, sendo três diferentes números de explantes por frasco (5, 10 e 20) e três sistemas de ventilação (sem o filtro - SC, com dois filtros - SVN2 e quatro filtros - SVN4). Menor acúmulo de massa seca ocorreu com o aumento do número de explantes por frasco. O sistema de ventilação natural com quatro filtros e 5 explante por frascos proporcionou maior ganho em relação ao crescimento agrônomo. Já o sistema de ventilação natural com quatro filtro, 10 e 20 explantes por frascos resultou em acúmulo de massa seca das plântulas, o que favoreceu o crescimento na aclimatização. Assim, o uso de membranas porosas na micropropagação com 10 e 20 explantes por frasco é recomendado

Palavras-chaves: Micropropagação. Aclimatização. Competição *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é das principais culturas do Brasil, plantada em quase todo o território e adaptada as diferentes regiões do país. A estimativa para a safra atual é que ocorra a colheita de 8,12 milhões de hectares (CONAB, 2022). A cana-de-açúcar propaga preferencialmente por meio de fragmentos vegetativos, porém exige enorme quantidade de material propagativo para o plantio de um hectare. Uma alternativa para a redução de material propagativo no plantio, é a utilização de mudas pré-brotadas (MPB). Essas mudas podem ser oriundas de um nó do caule ou obtidas por meio de clonagem do material vegetal. O uso de MBP na implantação ou renovação de um canavial permite redução na quantidade de material, e melhora o controle de vigor das plantas (LANDELL et al., 2012; XAVIER et al., 2014; XAVIER et al., 2016).

A produção de mudas via cultura de tecidos apresenta algumas vantagens, como a facilidade de produção em larga escala em curto espaço de tempo, além da produção ao longo do ano sem que ocorra a influência de fatores ambientais, e em condições controladas, e a garantia da obtenção de mudas com características genéticas superiores às demais técnicas de propagação (AMARAL-BAROLI et al., 2016; GONÇALVES e ROMANO, 2013). Porém, o

sucesso desse processo depende de diversos fatores, entre eles as condições de cultivo *in vitro*, e o número de explantes por recipiente (DESCHAMPS; PINTO, 1995).

No entanto, no sistema convencional de cultivo os explantes são acondicionadas em frascos selados, com pouca ventilação ou troca gasosa. Tais condições podem apresentar vários distúrbios morfológicos, que são causados pelo acúmulo de gases no interior dos frascos, proporcionado pela alta umidade relativa. Esses distúrbios morfológicos incluem alterações anatômicas, como estômatos deformados ou anomalias estomáticas, causadas pela falta de trocas gasosas no ambiente, além de comprometer os teores dos pigmentos fotossintéticos, bem como a condutância estomática (MONJA-MIO et al., 2015; GAGO et al., 2016).

O cultivo de plantas micropropagadas em ambientes que permitem a troca gasosa, com sistema de ventilação natural, podem aumentar a biossíntese de pigmentos, melhorar desempenho fotossintético promovido pelo aumento de CO₂ e redução da umidade relativa do ar. Além de permitir que as plantas desenvolvam mecanismos de adaptação para evitar a perda excessiva de água, melhorar a qualidade nutricional das mudas e, conseqüentemente reduzir as perdas de plantas micropropagadas, durante a aclimatização (BAKER, 2008; CHA-UM et al., 2011; SALDANHA et al., 2013).

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi determinar uma relação mais adequada entre o sistema de ventilação natural e número de explantes por frasco no desempenho agrônômico *in vitro* e *ex vitro* e fisiológico de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Material vegetal e condições de cultura

Foram utilizadas plântulas de aproximadamente 2cm, cultivadas *in vitro* oriundas de embriogênese somática obtidas pelo o protocolo de Dutra et al. (2011). Os explantes foram inoculados em frascos (300 mL) contendo 50 mL de meio cultura básico do MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), suplementado 6 g L⁻¹ de ágar (A7921, Sigma-Aldrich®), e pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem à 125 °C e 1,2 atm durante 15 minutos. Após a inoculação, o material foi mantido em sala de crescimento durante trinta e cinco dias a temperatura de 25 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 h sob lâmpadas de LED brancas, com intensidade de 39 μmol m⁻² s⁻¹.

2.2. Sistema de ventilação natural e número de explante por frasco

O sistema de ventilação natural foi obtido pela presença de membranas de politetrafluoroetileno nas tampas dos frascos de cultivo. As membranas foram montadas conforme Saldanha et al. (2012). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x3, sendo três números de explante por frasco (5, 10 e 20) e três sistemas de ventilação (Sem o filtro – SC, com dois filtros – SVN2 e quatro filtros – SVN4). Totalizando nove tratamentos, constituído por 5 frascos/tratamento sendo 1 frascos/repetição.

2.3. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo *in vitro*

Após 35 dias, as plântulas foram avaliadas quanto aos comprimentos da parte aérea - CPA (cm) e da maior raiz - CMR (cm), diâmetro do colmo - DC (mm), matérias secas da parte aérea - MSPA (mg), do sistema radicular - MSR (mg) e total – MST (mg). Para a determinação da matéria seca, a parte aérea e sistema radicular foram colocados em sacos de papel e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a 35 °C, até peso constante, e posteriormente pesados em balança analítica de precisão (0,001g).

2.4. Análise de pigmentos fotossintéticos do cultivo *in vitro*

Pigmento fotossintético foi extraído e analisado de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃), em estufa a 65 °C por 48 h. As amostras foram preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃) na proporção de 5 g L⁻¹ de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), contra DMSO saturado em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculado pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo: Clorofila *a* 649 = (12,47 x A665) - (3,62 x A649); Clorofila *b* 665 = (25,06 x A649) - (6,5 x A665); Carotenoides 480: (1000 x A480 - 1,29 x Ca - 53,78 x Cb) / 220. A clorofila total (*a* + *b*) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo todos os resultados expressos em mg. g⁻¹ matéria fresca.

2.5. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo *ex vitro*

As plantas cultivadas *in vitro* do experimento anterior foram aclimatizadas aos 35 dias. Transferidas para ambiente *ex vitro*, em tubetes plásticos com capacidade de 60ml contendo substrato comercial (Bioplanta). O delineamento experimental foi em blocos ao acaso - DBC, em esquema fatorial 3x3, do experimento anterior descrito acima. Totalizando 9 tratamentos, com 3 blocos/tratamento, e cada bloco constituído por 5 plantas. As plantas foram acondicionadas em estufa agrícola, com 50% da redução da luminosidade e irrigação intermitente por micro aspersão.

Após 60 dias de cultivo, foram avaliados os parâmetros de crescimento agrônômico; altura da planta (cm), massa seca da parte aérea e sistema radicular (g. planta⁻¹) e diâmetro do colmo (mm). E para a determinação da massa seca, as amostras foram secadas em estufas de circulação de ar forçada, a 40°C por 5 dias, e posteriormente pesados em balança analítica de precisão (0,001g).

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Sistema de ventilação natural e número de explante por frasco

3.1.1. Parâmetros de crescimento agrônômico *in vitro*

Os sistemas de ventilação e número de explantes influenciaram significativamente nos parâmetros de crescimento agrônômico e sobrevivência das plântulas de *Saccharum officinarum* variedade RB966928 durante o cultivo *in vitro* (Figura 1).

Os tratamentos com maiores números de explantes por frascos apresentaram mortalidades das plântulas, dentro dos sistemas de ventilação natural, o que resultou em um menor número de plântulas viva por frasco no final do cultivo *in vitro*. Os tratamentos com 10 explantes apresentaram porcentagem de sobrevivência de 68, 84 e 86% e, os tratamentos com 20 explantes apresentaram porcentagem de sobrevivência de 64, 65 e 78%, nos sistemas de ventilação natural com 0, 2 e 4 filtros, respectivamente.

Maior comprimento da parte aérea foi observado com a utilização do sistema de ventilação com filtros (Figura 1A). Onde o cultivo com quatro filtros contendo cinco, dez e vinte explantes apresentaram as maiores médias (4,44; 3,99 e 3,56cm), respectivamente. Proporcionando ganho no crescimento em média de 115% quando comparado ao tratamento controle (sem ventilação). Também foi observado a redução no comprimento da parte aérea quando se utilizou uma maior quantidade de explantes por frasco (Figura 1A).

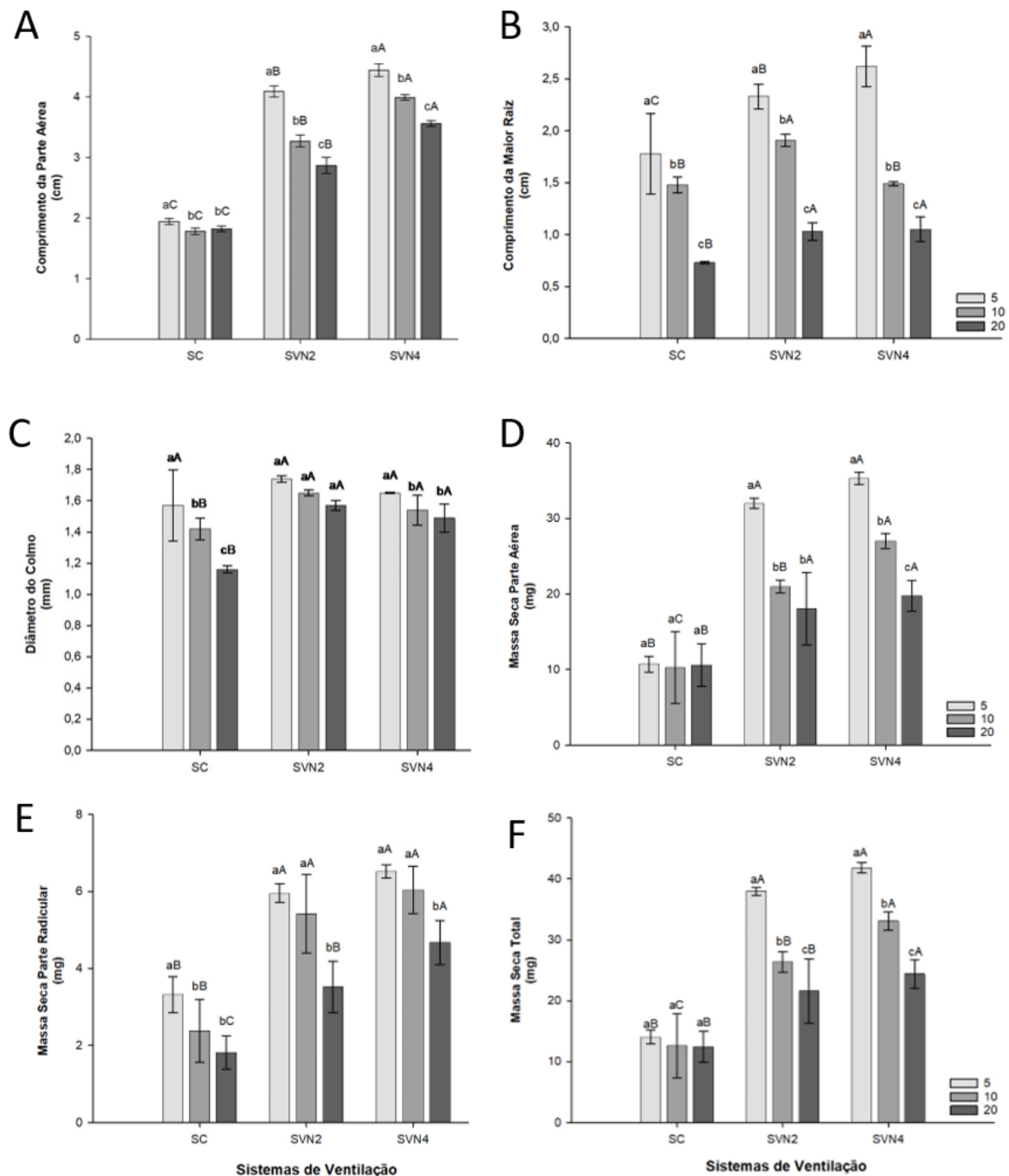
O sistema de ventilação com membranas também afetou o comprimento da maior raiz, conforme reduzia a ventilação e aumentava o número de explante por frasco, reduzia o crescimento do sistema radicular (Figura 1B). O cultivo com cinco explantes por frasco apresentaram maiores médias nos sistemas de ventilação sem filtro (1,78) e com 2 (2,33) e 4 filtros (2,62 cm).

O cultivo sem a utilização do sistema de ventilação com filtros e maior número de explantes por frasco reduziu o diâmetro do colmo (Figura 1C). O sistema de ventilação com dois filtros assegurou o desenvolvimento do colmo em todos os tratamentos, mesmo com o aumento da competição dentro do frasco.

O cultivo sem a utilização do sistema de ventilação com filtros e maior número de explantes por frasco reduziu o diâmetro do colmo (Figura 1C). O sistema de ventilação com dois filtros assegurou o desenvolvimento do colmo em todos os tratamentos, mesmo com o aumento da competição dentro do frasco.

A produção de massa seca da parte aérea é de fundamental importância para subsidiar o crescimento das plântulas *in vitro*. O cultivo do explante utilizando o sistema de ventilação com filtros beneficiou o acúmulo de massa seca das plântulas. A produção máxima de massa seca da parte aérea e total das plântulas ocorreu com a utilização do sistema de ventilação natural com dois (32,04 e 37,99 mg plântula⁻¹) e quatro filtros (35,32 e 41,84 mg plântula⁻¹), com cinco explantes por frasco, respectivamente. Os sistemas de ventilação natural com 2 e 4 filtros proporcionaram o incremento na massa seca da parte aérea de 2,98 e 3,29 vezes, respectivamente, quando comparado as plântulas cultivadas no sistema sem filtro (Figura 1D, E, F). Menor acúmulo de massa seca foi observado com o aumento do número de explantes por frasco.

Figura 1. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias cultivadas *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas natural de ventilação (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.



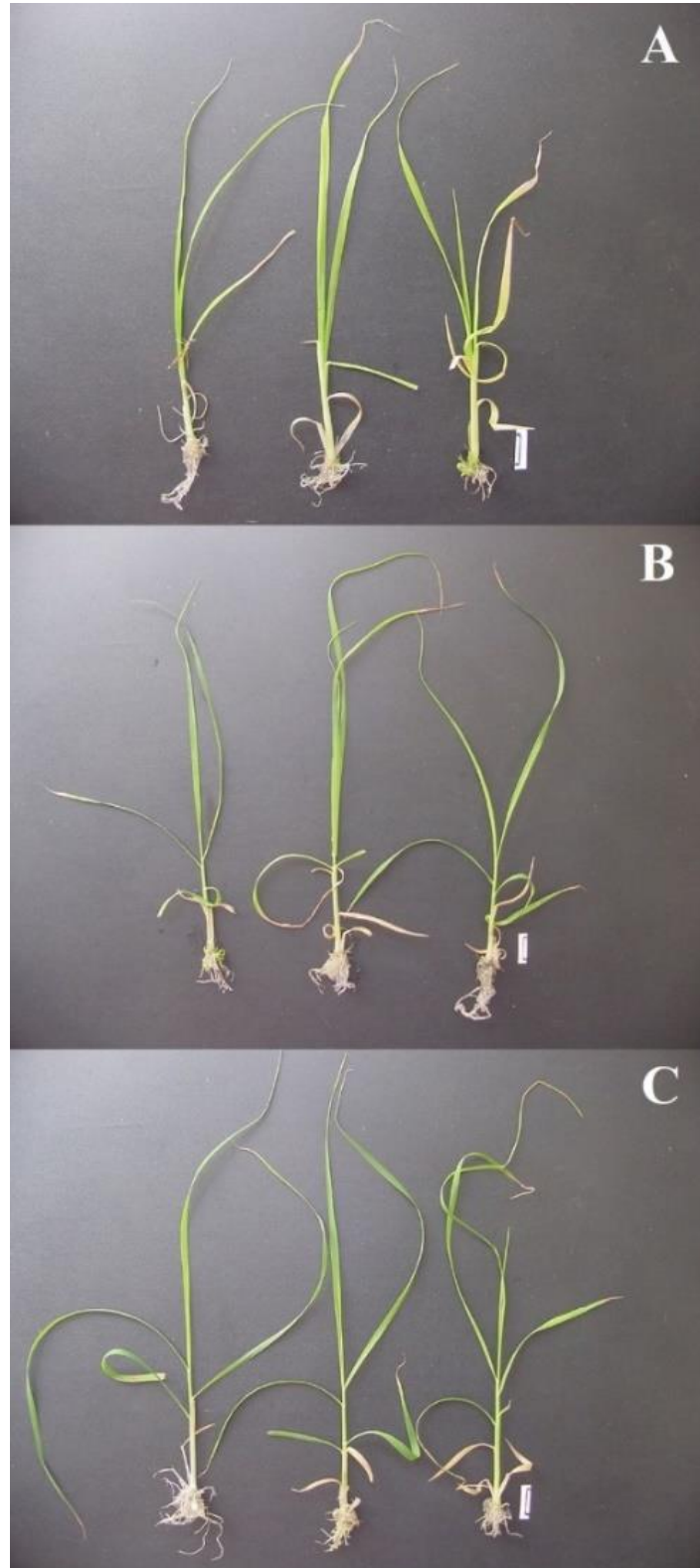
Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada sistema e letras maiúsculas dentro do número de explantes por frasco, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. SC: Sistema Convencional; SVN2: Sistema Natural com dois Filtros e SVN4: Sistema Natural com 4 Filtros.

O sistema radicular é um parâmetro importante para aclimatização das plântulas. O maior acúmulo de massa seca de raiz foi obtido no cultivo sob o sistema de ventilação com filtro. O sistema de ventilação natural com quatro filtros permitiu o acúmulo de massa seca ($6,52 \text{ mg plântula}^{-1}$) de 1,96 vezes maior do que sem a utilização do sistema de ventilação com filtros ($3,32 \text{ mg plântula}^{-1}$) e com 5 explantes por frasco (Figura 1E).

O acúmulo máximo de massa seca total das plântulas ocorreu com a utilização do sistema de ventilação natural com dois ($37,99 \text{ mg plântula}^{-1}$) e quatro filtros ($41,84 \text{ mg plântula}^{-1}$), com cinco explantes por frasco. Os sistemas de ventilação natural com 2 e 4 filtros proporcionaram incremento na massa seca total de 2,70 e 2,98 vezes, respectivamente, quando comparado as plântulas cultivadas no sistema sem filtro (Figura 1F).

Além disso, os diferentes sistemas de ventilação e o número de explantes por frasco influenciaram o crescimento da parte aérea e sistema radicular da cana-de-açúcar (*S. officinarum*), durante os 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 2).

Figura 2. Aspecto visual das plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação natural: A) Sistema Convencional - SC; B) Sistema de Ventilação Natural com dois Filtros - SVN2 e C) com 4 Filtros - SVN4 e números de explantes por frasco (5; 10 e 20). UFLA – Lavras, 2023.



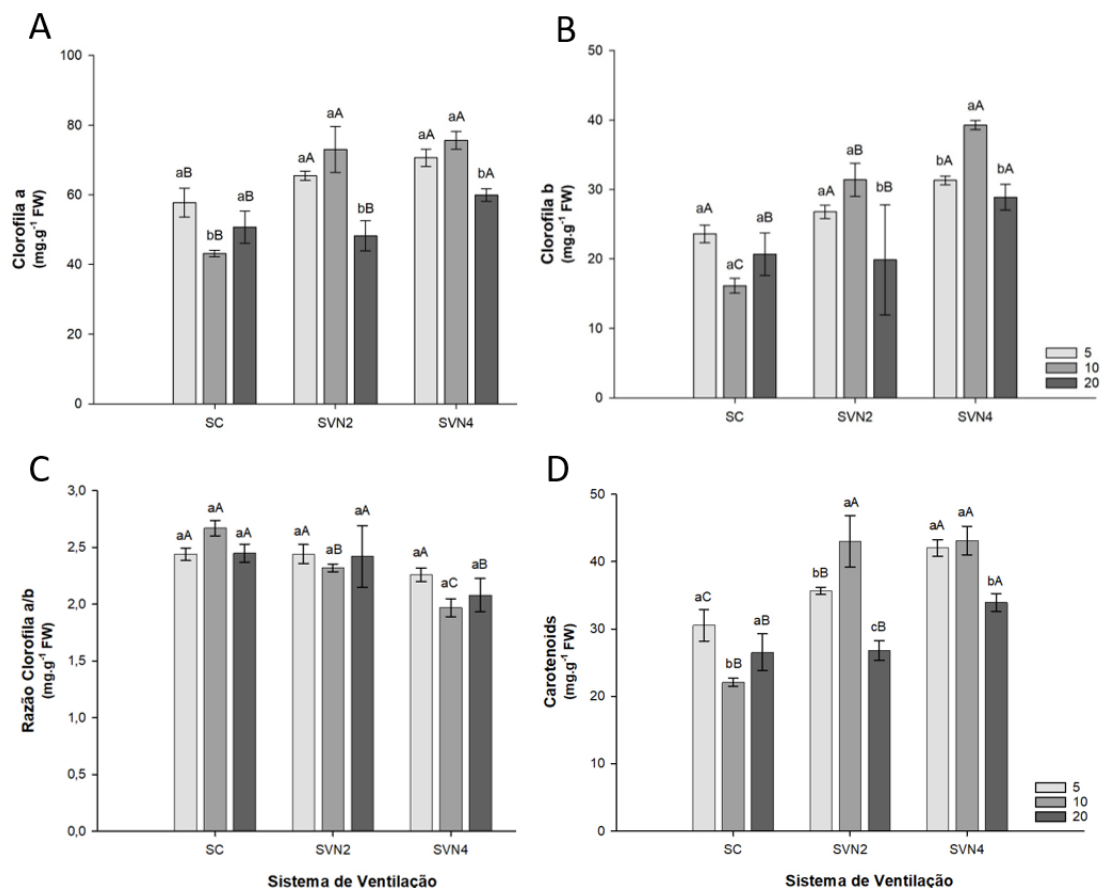
Fonte: Do autor (2023).

3.1.2. Pigmentos fotossintéticos

O aparato fotossintético das folhas de *Saccharum officinarum* apresentou sensibilidade aos sistemas de ventilação, refletindo diretamente no incremento de biossíntese dos pigmentos fotossintéticos das folhas (Figura 3).

A biossíntese de clorofila *a* e *b* mostraram-se sensibilidades positiva ao sistema de ventilação, apresentando maiores acúmulos nas folhas das plantas cultivadas com 2 e 4 filtros. Sendo observada as maiores médias nos tratamentos com 5 e 10 explantes por frascos (Figura 3A, B).

Figura 3. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias cultivadas *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação natural (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.



Legenda: As barras representam o erro padrão (±). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada sistema e letras maiúsculas dentro do número de explantes por frasco, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. SC: Sistema Convencional; SVN2: Sistema Natural com dois Filtros e SVN4: Sistema Natural com 4 Filtros.

Para a razão de clorofila a/b, os tratamentos com 10 e 20 explantes apresentaram redução na razão à medida que aumentou o número de filtros, já nos tratamentos com 5 explante não houve diferença significativa, entre os sistemas de ventilação (Figura 3C). Maior acúmulo de carotenoides foi observado com o aumento do número de filtros, sendo as maiores médias nas folhas das plântulas cultivadas com 2 e 4 filtros e com 10 explantes por frasco (Figura 3D).

3.1.3. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo *ex vitro*

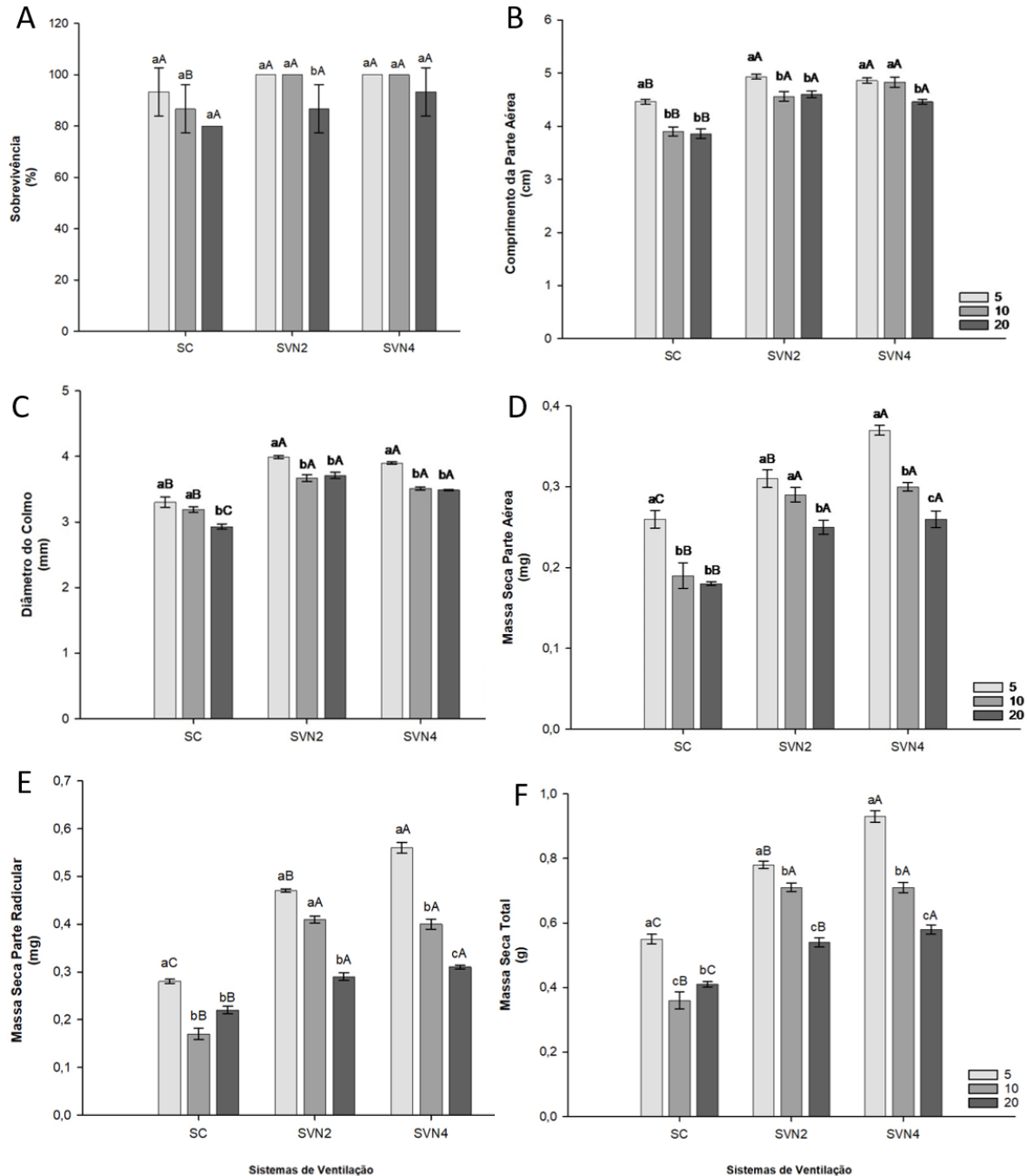
O número de explantes e o uso do sistema de ventilação natural durante o crescimento das plântulas *in vitro*, tiveram interferência significativamente nos parâmetros de crescimento agrônômico da cana-de-açúcar no ambiente *ex vitro* (Figura 4).

A sobrevivência das plântulas durante a aclimatização foi de 100% quando cultivadas *in vitro* no sistema de ventilação com dois e quatro filtros, com 5 e 10 explantes por frascos (Figura 4A). As maiores diferenças ocorrida no comprimento da parte aérea foi observada nas plântulas cultivadas no sistema de ventilação com 2 e 4 filtros, em relação ao cultivo sem uso de membranas (Figura 4B). Estas membranas proporcionaram os maiores crescimento da parte aérea, variando entre, 4,46 a 4,83 cm.

As plântulas aclimatizadas provenientes do cultivo *in vitro* com 2 e 4 membranas de filtros desenvolveram maior diâmetro do colmo (3,49 a 3,99 mm), quando comparado com o sistema convencional sem uso de filtro (Figura 4C). O aumento da competição dentro do frasco de cultivo *in vitro* resultou em menores diâmetro do colmo após 60 dias de cultivo *ex vitro*.

O sistema de ventilação natural com as membranas favoreceu o incremento de massa seca durante o período de aclimatização. O sistema de ventilação com quatro filtros apresentou maiores acúmulos de massa seca da parte aérea, sistema radicular e total (0,37, 0,56, 0,93 g), com 5 explante por frascos, respectivamente (Figura 4D, E, F), o que proporcionou incremento de 1,42 vezes na massa seca da parte aérea, 2,00 vezes de sistema radicular e 1,69 vezes no total, quando comparado as plântulas cultivadas no sistema sem filtro. O maior número de explantes por frasco interferiu diretamente na capacidade das plantas acumularem massa seca durante a aclimatização. Quanto maior o número de explante por frascos, menor o acúmulo do peso.

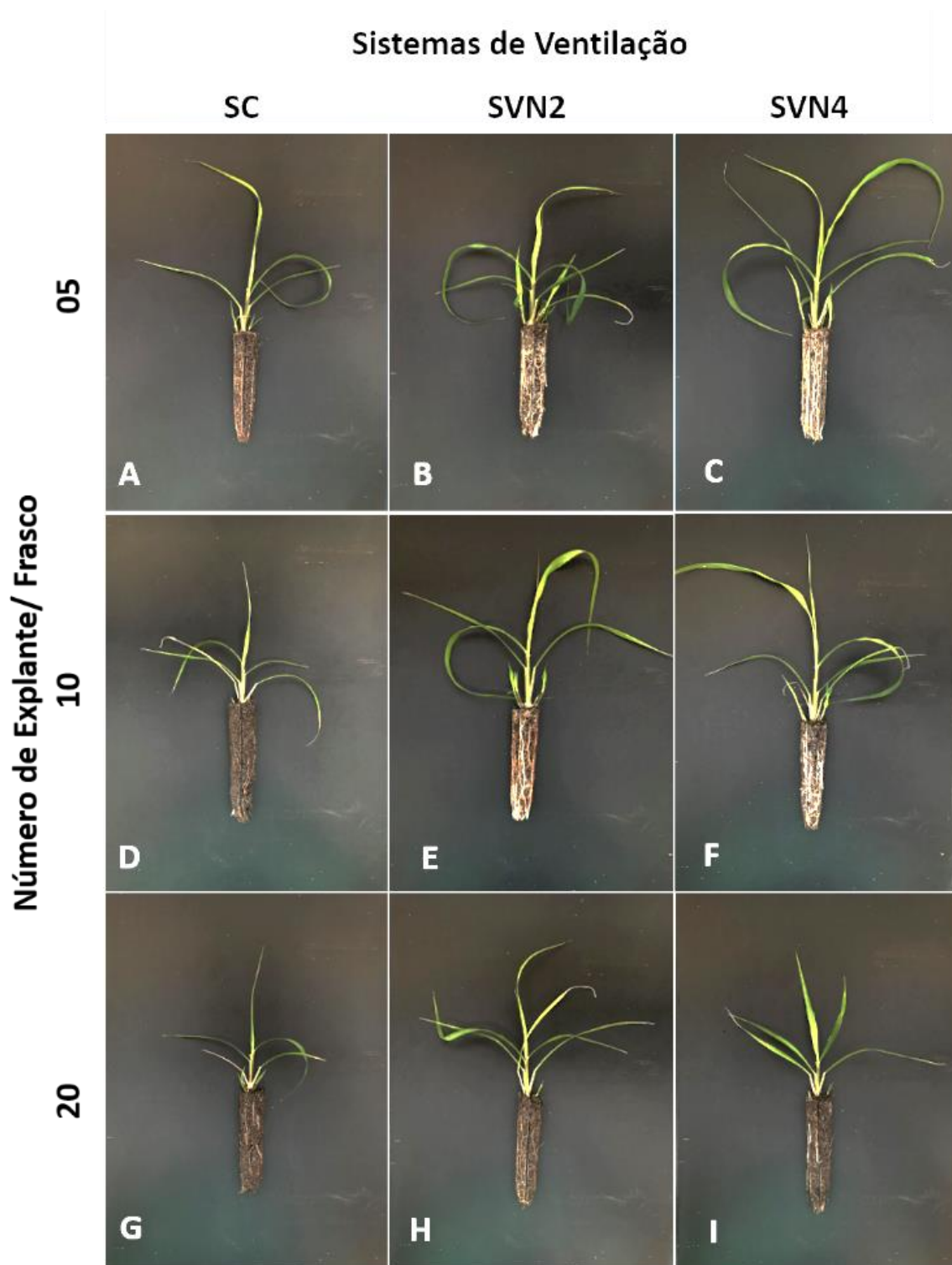
Figura 4. Parâmetros de crescimento agrônômico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ex vitro aos 60 dias de aclimatização, oriundas de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação natural (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.



Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro de cada sistema e letras maiúsculas dentro do número de explantes por frasco, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. SC: Sistema Convencional; SVN2: Sistema Natural com dois Filtros e SVN4: Sistema Natural com 4 Filtros.

Os diferentes sistemas de ventilação e número de explante durante o cultivo *in vitro*, influenciaram no crescimento da cana-de-açúcar (*S. officinarum*), durante os 60 dias de aclimatização. As plântulas submetidas aos tratamentos com sistema de ventilação natural, apresentaram características morfológicas que garantiram melhor desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, durante a mudança de ambiente (Figura 5).

Figura 5. Aspecto visual de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 60 dias de aclimatização, oriundas de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação: Sistema Convencional - SC; Sistema Natural com dois Filtros - SVN2 e com quatro filtros - SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavras, 2023.



Fonte: Do Autor (2023).

4. DISCUSSÃO

4.1. Sistema de ventilação natural e número de explante por frasco

A saturação de vapor de água no interior do frasco, causado pela vedação total, impede a liberação de gases durante o processo respiratório da planta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Já microambientes com sistema de ventilação natural favorecem as trocas gasosas e baixa umidade relativa, além de reduzir a concentração de etileno e aumentar a de CO₂ (CHEN, 2006; SCHUELTER et al., 2015).

O ganho nos parâmetros de crescimento agrônômico pelas plantas de cana-de-açúcar cultivadas em sistema de ventilação natural com filtro, pode estar relacionado ao aumento da troca gasosa e a estabilidade de CO₂ dentro do frasco. Essa mudança no ambiente de cultivo confere às plantas a capacidade de produzir energia para o seu crescimento e desenvolvimento através da fixação de CO₂ (POSPISILOVA et al. 1997).

Plantas de *Arabidopsis* cultivadas sob placas herméticas apresentaram fotorrespiração flutuante, com variação na concentração de CO₂ durante os períodos claro e escuro, já as plantas cultivadas com a fita permeável não foram submetidas à flutuação de CO₂, o que favoreceu o cultivo com melhor eficiência do fotossistema II (PSII), como: F'/F', rendimento PSII e R_{fd} (descrito como o parâmetro de vitalidade da planta (MATUSZKIEWICZ et al, 2019). O aumento da concentração de CO₂ também favoreceu as melhores respostas para o crescimento *in vitro* da espécie *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2014). E o sistema de ventilação natural acrescido de 20 g L⁻¹ de sacarose apresentou as melhores respostas para o crescimento *in vitro* de *Cattleya walkeriana* em relação ao método de cultura convencional (SILVA et al., 2014).

O ganho no acúmulo de massa seca em sistema de ventilação natural com filtro pode estar relacionado a troca de gases entre os ambientes externo e interno, admitida pela permeabilidade da fita microporosa e do filme PTFE. A ventilação favorece a absorção efetiva dos nutrientes nitrogenados (NH₄⁺ e NO₃⁻) e dos íons Mg₂⁺ e Ca₂⁺ do meio de cultivo pelas plantas, e influencia o regime autotrófico e concomitante, ao maior crescimento das mesmas (ARIGITA et al., 2010). O aumento de massa seca também foi visualizado em plantas de kiwi cultivadas *in vitro* com ventilação enriquecida com 600 µL L⁻¹ de CO₂, acumulando três vezes mais massa seca em comparação ao cultivo fotomixotrófico (ARIGITA et al., 2010). Maiores acúmulos de massa seca também foram observados em *Lippia gracilis* Schauer quando cultivada em sistema de membrana com quatro filtros. O acúmulo de massa seca das folhas e

total resultaram em incremento de 58 e 44%, respectivamente, quando comparado com o sistema sem a membrana (LAZZARINI et al., 2018). Também foram observados maiores acúmulos de massa seca total em plantas de *Lippia alba* cultivada *in vitro* sob altos níveis de CO₂ (BATISTA et al., 2017). E na espécie *Plectranthus amboinicus*, o uso de membranas porosas possibilitou o incremento na massa seca das folhas (SILVA et al., 2017).

O incremento de pigmentos fotossintéticos nos tratamentos com sistema de ventilação natural com filtro pode estar relacionado a diminuição da concentração de etileno presente no frasco. Esse hormônio vegetal é um importante fator de transcrição na via de sinalização dos genes que promove a degradação da clorofila em folhas maduras (QIU et al., 2015; CEUSTERS e VAN de POEL 2018). O etileno é produzido e liberado durante o crescimento da planta. No entanto, por ser gasoso tende a se acumular no interior do frasco. Plantas de *Arabidopsis* cultivadas em placas vedadas apresentaram produção de 1,4 ng μL^{-1} de etileno por muda, já as plantas cultivadas em placas seladas por fita porosa apresentaram quantidades muito pequenas ou indetectáveis de etileno (MATUSZKIEWICZ et al, 2019). As trocas gasosas que ocorrem através das membranas porosas podem ter permitido a liberação deste gás, para o meio externo. Diversos estudos relataram o aumento da biossíntese de pigmentos fotossintéticos nas folhas de diferentes espécies de plantas, quando cultivadas *in vitro* sob um sistema de vegetação natural, como *Oplopanax elatus* (PARK et al., 2011); *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2012); *Gevuina avel lana* (ALVAREZ et al., 2012); morango (*Fragaria x Ananassa*) (PANDEY et al., 2015) e *Eugenia dysenterica* (SILVEIRA et al., 2019).

A competição *in vitro* reduziu o crescimento da parte aérea de plântulas das espécies, *Cattleya percivaliana* (SOARES et al., 2008) e *Mentha arvensis* L (PINTO et al, 2011). Embora o menor número de explantes, em algumas variáveis apresentou melhor desenvolvimento, os autores sugeriram o uso de maior quantidade de explantes por frasco na micropropagação, para reduzir os custos de produção.

4.2. Parâmetros de crescimento agrônômico do cultivo *ex vitro*

O menor crescimento da parte aérea e desenvolvimento do colmo das plantas de cana-de-açúcar durante a aclimatização, oriundas do sistema convencional, pode estar relacionada aos distúrbios fisiológicos e morfológicos adquiridos, devido à alta umidade relativa do ar (UR $\geq 85\%$) causada pelo sistema. O que reduz consideravelmente a capacidade da plântula sobreviver no ambiente *ex vitro*. Alguns desses distúrbios incluem redução da atividade fotossintética, baixo teor de clorofila, funcionalidade estomática alterada, falta de camada de

cutícula na folha, parênquima e xilema anormal da folha. Essas plantas frequentemente expressam uma característica de murchamento rápido quando expostas a URs mais baixas ($\approx 60\%$) (HASSANKHAH et al., 2014; FANOURLAKIS et al., 2013).

As plântulas cultivadas em sistema heterotrófico têm seu crescimento reduzido durante a aclimatização devido a diminuição na densidade de vasos xilemáticos, em comparação com as plantas cultivadas com troca gasosas (TORRE et al., 2003; CARINS MURPHY et al., 2014). Esta diminuição na densidade dos vasos, pode ser bem adequada para ambiente de cultivo com umidade relativa elevada, e baixas taxas de transpiração, exigindo menos do transporte de água, resultando assim, em menor eficiência hidráulica (SELLIN et al., 2019; XIONG e NADAL, 2020). Interferindo diretamente na capacidade fotossintética da plântula.

O menor acúmulo de massa seca, tanto da parte aérea, como do sistema radicular, pode estar associado a redução desses tecidos, devido a desidratação no ambiente *ex vitro*. As plantas cultivadas em sistema com alta umidade, aumenta a densidade estomática nas folhas devido a hidratação excessiva dos tecidos (XIAO et al., 2011; FANOURLAKIS et al., 2013). Essa condição no ambiente de cultivo, apenas não deixam as plantas vulneráveis ao estresse biótico e abiótico, como também favorece a desregulação entre a absorção de CO_2 e a perda de água, causando mau funcionamento do mecanismo de fechamento estomático durante a maturação foliar (MARIN et al., 1988; FANOURLAKIS et al., 2020). A baixa regulação estomática, a ausência de produção e deposição de cera epicuticular nas folhas das plantas cultivadas no sistema heterotrófico são um dos principais fatores relacionados à falta ou reduzida capacidade das plantas em controlar a dessecação logo após o transplântio *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; YEATS & ROSE, 2013; ZEISLER-DIEHL et al., 2018).

As plântulas crescidas em sistema heterotrófico, requer determinado tempo para adaptar-se às condições impostas, e assim, desenvolver novas estruturas. Já o sistema de ventilação natural com filtro possibilita a melhoria da qualidade da planta durante a fase de aclimatização (MOHAMED e ALSADON, 2010), devido ao melhor funcionamento dos tecidos foliares e funcionalidade dos estômatos (YOON et al. 2009). Planta de *Pfaffia glomerata* também apresentaram 100% de sobrevivência durante a fase de aclimatização às condições *ex vitro*, porém as plantas derivadas do cultivo heterotrófico apresentaram uma maior desidratação no momento da transferência inicial para um substrato (SALDANHA et al., 2012).

5. CONCLUSÃO

Para as variáveis de crescimento agrônomo o sistema de ventilação natural com quatro filtros e 5 explantes por frascos proporcionou maior ganho. O sistema de ventilação natural com quatro filtros, 10 e 20 explantes por frascos resultou maior acúmulo de matéria seca das plântulas, que favoreceu o crescimento na aclimatização. O uso de membranas porosas na micropropagação de cana-de-açúcar com 10 e 20 explantes por frasco é recomendado.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 110(1):93–101, 2012.
- AMARAL-BAROLI, A. et al. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 180-185, 2016.
- ARIGITA, L.; CANA, L. J.; TAME, S. R. S.; GONZA, L. E. Z. A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 46:312–322, 2010.
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. **Annual Reviews of Plant Biology**, 59:89-113, 2008.
- BATISTA, D. S.; CASTRO, K. M.; KÖEHLER, A. D.; et al. Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates qualitative essential oil production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Cultivo de órgão de tecido celular vegetal**, 128: 357-368, 2017.
- CARINS MURPHY, G. J.; JORDAN, T. J.; BRODRI, B. B. Acclimation to humidity modifies the link between leaf size and the density of veins and stomata. **Plant Cell Environ**, 37, p. 124-131, 2014.
- CEUSTERS, J.; VAN DE POEL, B. Etileno exerce controle específico da espécie e dependente da idade da fotossíntese. **Plant Physiol**, 176: 2601–2612, 2018.
- CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A. et al. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, [s.l.], v. 106, n. 3, p. 435, 2011.
- CHEN, C. In Situ Measurement of Microclimate for the Plantlets cultured In Vitro. **Biosystems Engineering**, v. 95, n. 3, p. 413–423, 2006.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, v.6, n.4, 58p,2022.
- DE OLIVEIRA, T. et al. The effect of alternative membrane system, sucrose, and culture methods under photosynthetic photon flux on growth and volatile compounds of mint in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, [s.l.], v. 57, n. 3, p. 529-540, 2021.
- DESCHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento in vitro de microestacas e micropropagação de gemas axilares de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.). **Ciência Rural**, v. 25, p. 389-393, 1995.
- DIMITRIOS, F.; SASAN, A.; ARNE, S.; HABTAMU, G.; et al. Stomatal behavior following mid- or long-term exposure to high relative air humidity: A review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 153, 2020.

DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A. E.; SILVA, N. D. G; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar**. Embrapa Clima Temperado. Rio Grande do Sul, 2011.

FANOURLAKIS, D.; HEUVELINK, E.; CARVALHO, S. M. P. Uma análise abrangente dos componentes fisiológicos e anatômicos envolvidos em maiores taxas de perda de água após o desenvolvimento das folhas em alta umidade. **J Plant Physiol**, 170: 890–898, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

GAGO, J.; DALOSO, D.; DE, M.; FIGUEROA, C. M.; FLEXAS, J.; FERNIE, A. R.; NIKOLOSKI, Z. Relationships of Leaf Net Photosynthesis, Stomatal Conductance, and Mesophyll Conductance to Primary Metabolism: A Multispecies Meta-Analysis Approach. **Plant Physiology**, 171:265-279, 2016.

GONÇALVES, S; ROMANO, A. Cultura in vitro de alfazema (*Lavandula* spp.) E produção de metabólitos secundários. **Avanços da biotecnologia**, v. 31, n. 2, pág. 166-174, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas Brasília**: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, v.1, p.43-76, 1998.

HASSANKHAH, A.; VAHDATI, K.; LOTFI, M.; MIRMASOUMI, M. Effects of Ventilation and Sucrose Concentrations on the Growth and Plantlet Anatomy of Micropropagated Persian Walnut Plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 111–120, 2014.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105-120, 2006.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Can. J. Bot.** 57(12): 1332–1334, 1979.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2012. 16p. (Documento IAC, n. 109).

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult**,135(3):367–379, 2018.

MARIN, A. et al. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annals of Botany**, v.62, p.663-670, 1988.

MATUSZKIEWICZ, M.; KOTER, M. D.; FILIPECKI, M. Limited ventilation causes stress and changes in *Arabidopsis* morphological, physiological and molecular phenotype during in vitro growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 135, p. 554-562, 2019.

MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Sci Hortic.** 123:295–300, 2020.

- MONJA-MIO, K. M.; POOL, F. B.; HERRERA, G. H.; ESQUEDAVALLE, M.; ROBERT, M. L. Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. “Bacanora” plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. **Scientia Horticulturae**, 189:32-40, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, 15(3):473–497, 1962.
- PARK, S.; MOON, H.; MURTHY, H.; KIM, Y. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biol Plant**. 55(3):559–562, 2011.
- PINTO, J.E.B.P. et al. *In vitro* growth of Japanese mint using different salt concentration, number and explant type. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém, v.54, n.3, p.267-273, 2011.
- POSPISILOVA, J.; CATSKY, J.; SESTAK, Z. Fotossíntese em plantas *cultivadas in vitro*. In: PESSARAKLI M. (ed) **Handbook of photosynthesis**. Marcel Dekker, New York, p.525-540, 1997.
- QIU, K.; LI, Z.; YANG, Z.; CHEN, J.; WU, S.; *et al.* Accelerate greening during ethylene-mediated leaf senescence by directly activating chlorophyll catabolic genes in *Arabidopsis*. **PLoS Genet**. 2015.
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F.; NETO, A. R.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 4, p. 433-444, 2013.
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D.I. et al. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of in vitro Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. 118, 87–99 (2014).
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.
- SANTOS, R. P.; DA CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2008.
- SCHUELTER, A. R.; LUZ, C. L.; SCHERER, A. M.; SOUZA, C. S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial in vitro de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183–190, 2015.
- SELLIN, A.; TANEDA, H.; ALBER, M. Leaf structural and hydraulic adjustment with respect to air humidity and canopy position in silver birch (*Betula pendula*) **J. Plant Res.**, 132, p. 369-381, 2019.

- SILVA, A. B. D.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S. D.; MOREIRA, A. L. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Rev Ceres**, 61(6):883–890, 2014.
- SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B, et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the in vitro cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 129(3):501–510, 2017.
- SILVEIRA, A. A. C; et al. Shoot proliferation, leaf anatomy and pigment content of *Eugenia dysenterica* growing in conventional and natural ventilation systems. **Revista Ceres**, v. 66, n. 5, p. 363-371, 2019.
- SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. Crescimento in vitro de orquídeas: densidade de meio e número de explantes. **Revista Ceres**, v. 55, p. 49-53, 2008.
- SWAPNIL, P.; SINGH, J.; MAURYA, I. Effect of black polythene mulch on growth and yield of Winter Dawn strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) by improving root zone temperature. **Indian Journal of Agricultural Sciences**. 85. 1219-22, 2015.
- TORRE, S.; FJELD, T.; GISLERØD, H. R.; MOE, R. Leaf anatomy and stomatal morphology of greenhouse roses grown at moderate or high air humidity. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, 128, p. 598-602, 2003.
- WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of diferente resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- XAVIER, M. A. et al. Fatores de desuniformidade e kit de pré-brotação IAC para sistema de multiplicação de cana-de-açúcar mudas pré-brotadas (MPB). **Technical Bulletin**, Instituto Agrônômico, Campinas, SP, Brazil, 2014.
- XAVIER, M. A. et al. Produtividade de gemas de cana-de-açúcar para fins de abastecimento de núcleos de produção de mudas pré-brotadas-MPB, **STAB**, Vol. 33, STAB, Piracicaba, SP, Brazil, 2016.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Desenvolvimento e aplicação de sistema de planta de micropropagação fotoautotrófica. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 105: 149-158, 2011.
- XIONG, D.; NADAL, M. Linking water relations and hydraulics with photosynthesis. **Plant J.**, 101, p. 800-815, 2020.
- YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The formation and function of plant cuticles. **Plant Physiol**. 163, 5–20, 2013.
- YOON, Y. J.; MOBIN, M.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Impact of in vitro CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to ex vitro conditions. **Environ Exp Bot**, 65:183–188, 2009.
- ZEISLER-DIEHL, V.; MULLER, Y.; SCHREIBER, L. Epicuticular wax on leaf cuticles does

not establish the transpiration barrier, which is essentially formed by intracuticular wax. **J Plant Physiol**, 227, 66–74, 2018.

ANEXO I

Tabela 1. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação natural (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.

----- Comprimento da Parte Aérea (cm) -----			
	05	10	20
SC	1,94 ± 0,048 cA	1,78 ± 0,050 cB	1,82 ± 0,047 cB
SVN2	4,09 ± 0,091 bA	3,27 ± 0,986 bB	2,87 ± 0,134 bC
SVN4	4,44 ± 0,101 aA	3,99 ± 0,045 aB	3,56 ± 0,047 aC
CV %	2,92		
----- Comprimento da Maior Raiz (cm) -----			
SC	1,78 ± 0,386 cA	1,48 ± 0,074 bB	0,73 ± 0,012 bC
SVN2	2,33 ± 0,117 bA	1,91 ± 0,059 aB	1,03 ± 0,084 aC
SVN4	2,62 ± 0,193 aA	1,49 ± 0,020 bB	1,05 ± 0,113 aC
CV %	11,20		
----- Diâmetro do Colmo (mm) -----			
SC	1,57 ± 0,228 aA	1,42 ± 0,069 bB	1,16 ± 0,021 bC
SVN2	1,74 ± 0,021 aA	1,65 ± 0,018 aA	1,57 ± 0,033 aA
SVN4	1,65 ± 0,003 aA	1,54 ± 0,094 aB	1,49 ± 0,089 aB
CV %	6,72		
----- Massa Seca Parte Aérea (mg) -----			
SC	10,72 ± 1,062 bA	10,26 ± 4,717 cA	10,62 ± 2,821 bA
SVN2	32,04 ± 0,665 aA	20,98 ± 0,851 bB	18,06 ± 4,792 aB
SVN4	35,32 ± 0,792 aA	27,04 ± 1,026 aB	19,76 ± 2,016 aC
CV %	14,20		
----- Massa Seca Parte Radicular (mg)-----			
SC	3,32 ± 0,466 bA	2,38 ± 0,814 bB	1,82 ± 0,430 cB
SVN2	5,95 ± 0,240 aA	5,42 ± 1,016 aA	3,52 ± 0,665 bB
SVN4	6,52 ± 0,177 aA	6,04 ± 0,611 aA	4,68 ± 0,572 aB
CV %	15,44		
----- Massa Seca Total (mg)-----			
SC	14,04 ± 1,056 bA	12,64 ± 5,247 cA	12,44 ± 2,534 bA
SVN2	37,99 ± 0,682 aA	26,40 ± 1,696 bB	21,58 ± 5,264 aC
SVN4	41,84 ± 0,869 aA	33,08 ± 1,509 aB	24,43 ± 2,368 aC
CV %	12,93		

Legenda: As barras representam o erro padrão (±). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna e letras maiúsculas dentro das linhas, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. SC: Sistema Convencional; SVN2: Sistema Natural com dois Filtros e SVN4: Sistema Natural com 4 Filtros.

ANEXO II

Tabela 2. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro*, submetidas a diferentes sistemas de ventilação natural (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.

-----Carotenoides (mg.g ⁻¹ FF)-----			
	05	10	20
SC	30,56 ± 2,337 cA	22,07 ± 0,608 bB	26,53 ± 2,727 bA
SVN2	35,66 ± 0,555 bB	43,02 ± 3,820 aA	26,81 ± 1,490 bC
SVN4	42,06 ± 1,230 aA	43,14 ± 2,120 aA	33,96 ± 1,331 aB
CV %	7,47		
-----Clorofila a (mg.g ⁻¹ FF)-----			
SC	57,77 ± 4,146 bA	43,15 ± 0,903 bB	50,75 ± 4,614 bA
SVN2	65,49 ± 1,286 aA	73,02 ± 6,574 aA	48,26 ± 4,314 bB
SVN4	70,62 ± 2,513 aA	75,65 ± 2,520 aA	59,93 ± 1,742 aB
CV %	7,34		
-----Clorofila b (mg.g ⁻¹ FF)-----			
SC	23,61 ± 1,271 aA	16,14 ± 1,064 cA	20,70 ± 3,060 bA
SVN2	26,80 ± 0,967 aA	31,40 ± 2,372 bA	19,86 ± 7,921 bB
SVN4	31,32 ± 0,642 aA	39,27 ± 0,655 aA	28,90 ± 1,852 aB
CV %	14,29		
-----Razão de Clorofila a/b-----			
SC	2,44 ± 0,056 aA	2,67 ± 0,067 aA	2,45 ± 0,078 aA
SVN2	2,44 ± 0,084 aA	2,32 ± 0,034 bA	2,42 ± 0,269 aA
SVN4	2,26 ± 0,057 aA	1,97 ± 0,078 cA	2,08 ± 0,148 bA
CV %	6,19		

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna e letras maiúsculas dentro das linhas, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Kott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: SC: Sistema Convencional; SVN2: Sistema Natural com dois Filtros e SVN4: Sistema Natural com 4 Filtros.

ANEXO III

Tabela 3. Parâmetros de crescimento agrônômico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ex vitro aos 60 dias de aclimatização, oriundas de cultivo *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação natural (SC; SVN2 e SVN4) e números de explantes por frascos (5, 10 e 20). UFLA – Lavra, 2023.

----- Sobrevivência (%) -----			
	05	10	20
SC	93,33 ± 9,428 aA	86,66 ± 9,428 bA	80,00 ± 0,000 aA
SVN2	100,0 ± 0,000 aA	100,0 ± 0,000 aA	86,66 ± 9,428 aB
SVN4	100,0 ± 0,000 aA	100,0 ± 0,000 aA	93,33 ± 9,428 aA
CV %	8,25		
----- Comprimento da Parte Aérea (cm) -----			
SC	4,46 ± 0,047 bA	3,90 ± 0,082 bB	3,86 ± 0,094 bB
SVN2	4,93 ± 0,047 aA	4,56 ± 0,094 aB	4,60 ± 0,062 aB
SVN4	4,86 ± 0,047 aA	4,83 ± 0,094 aA	4,46 ± 0,047 aB
CV %	2,01		
----- Diâmetro do Colmo (mm) -----			
SC	3,30 ± 0,079 bA	3,19 ± 0,042 bA	2,93 ± 0,041 cB
SVN2	3,99 ± 0,024 aA	3,67 ± 0,048 aB	3,71 ± 0,049 bB
SVN4	3,90 ± 0,022 aA	3,51 ± 0,024 aB	3,49 ± 0,009 aB
CV %	1,47		
----- Massa Seca Parte Aérea (g) -----			
SC	0,26 ± 0,011 cA	0,19 ± 0,016 bB	0,18 ± 0,002 bB
SVN2	0,31 ± 0,011 bA	0,29 ± 0,009 aA	0,25 ± 0,009 aB
SVN4	0,37 ± 0,006 aA	0,30 ± 0,005 aB	0,26 ± 0,010 aC
CV %	4,33		
----- Massa Seca Parte Radicular (g) -----			
SC	0,28 ± 0,004 cA	0,17 ± 0,012 bB	0,22 ± 0,008 bB
SVN2	0,47 ± 0,004 bA	0,41 ± 0,008 aA	0,29 ± 0,008 aB
SVN4	0,56 ± 0,012 aA	0,40 ± 0,011 aB	0,31 ± 0,004 aC
CV %	2,93		
----- Massa Seca total (g) -----			
SC	0,55 ± 0,014 cA	0,36 ± 0,026 bC	0,41 ± 0,007 cB
SVN2	0,78 ± 0,011 bA	0,71 ± 0,013 aB	0,54 ± 0,014 bC
SVN4	0,93 ± 0,017 aA	0,71 ± 0,015 aB	0,58 ± 0,014 aC
CV %	3,10		

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna e letras maiúsculas dentro das linhas, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Kott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: SC: Sistema Convencional; SVN2: Sistema Natural com dois Filtros e SVN4: Sistema Natural com 4 Filtros.

Artigo II – INTENSIDADE DE LUZ E ESPECTROS LUMINOSOS NO DESEMPENHO AGRONÔMICO E FOTOSSINTÉTICO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA *IN VITRO*.

Resumo

As plantas cultivadas *in vitro* apresentam diferentes respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários quando expostas a diferentes condições de luz. O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho agrônômico e fisiológico da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivo *in vitro* sob variações de intensidade de luz e espectro luminoso. Plântulas de aproximadamente 2cm, cultivadas *in vitro* oriundas de embriogênese somática foram cultivadas em meio básico Murashige e Skoog (MS) e mantidas sob cinco intensidades de luz: 26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sob diferentes espectros de luz: 100% branca; 100% vermelho; 100% azul e combinações de azul e vermelho nas proporções %V:%A (30:70; 70:30; e 50:50); obtido por LEDs, por 35 dias. A intensidade de luz 113 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultou em maior produção de massa seca e de pigmentos fotossintéticos, proporcionando maior vigor da plântula. E os espectros luminosos monocromáticos branco, azul e vermelho resultaram em plântulas com maior acúmulo de massa seca (MSPA, MSR, MST). Já o espectro 50% azul:50% vermelhos possibilitaram maior biossíntese de pigmentos fotossintéticos.

Palavras-chaves: Qualidade de luz. Diodos emissores de luz; Micropropagação.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das plantas mais eficientes no emprego e na conversão de energia solar em açúcar, sendo responsável pelo abastecimento de aproximadamente 80% de açúcar (sacarose) e 35% da produção total de etanol, do mundo. A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, cultivada em áreas tropicais e subtropicais. Além disso, é cultura de muito valor agregado devido, principalmente, a sua capacidade de armazenar altas concentrações de sacarose, glicose e frutose nos entrenós do caule, além de ser facilmente extraídos (TOLERA et al. 2014; SINDHU et al., 2016; REDAE e AMBAYE, 2018).

A biotecnologia é uma ferramenta valiosa que permite usar as técnicas de micropropagação para a propagação da cana-de-açúcar e produzir mudas saudáveis, livres de doenças, em larga escala, em tempo e espaço reduzidos (CIDADE et al., 2006; PALÚ et al., 2011). Porém, o sucesso desse processo depende de diversos fatores, entre eles as condições de cultivo *in vitro*, os quais incluem a fonte de iluminação, comprimento de onda específico e a densidade do fluxo de fótons (DESCHAMPS; PINTO, 1995; LIAN et al., 2002).

As plantas percebem sinais de luz através de fotorreceptores que detectam comprimentos de onda específicos, traduzem e geram uma série de respostas fisiológicas. Dessa

forma, aprimorar o desempenho das plantas através da modificação da intensidade de luz e do espectro luminoso no microambiente do cultivo *in vitro* pode trazer diversos benefícios fisiológicos para as plantas (SHIN et al., 2013; KOZAI e ZHANG 2016).

O uso de lâmpadas de LED (diodo emissor de luz) como fonte de iluminação para sala de crescimento dos laboratórios de micropropagação é uma alternativa que apresenta diversas vantagens. Entre eles, o controle do espectro de luz emitido, baixo consumo de energia elétrica e maior durabilidade. Além do mais, devido às propriedades espectrais atingida pela luz de LED é possível regular as respostas morfogênicas *in vitro* como variações anatômicas, morfológicas e atributos fisiológicos, alongamento, rizogênese, e também habilidades fotossintéticas (FAÇANHA et al., 2018; DUTTA-GUPTA et al., 2020).

A influência da intensidade luminosa e da qualidade espectral vem sendo bastante estudada na morfogênese de plântulas nas espécies *Urtica dioica* (COELHO et al. 2021); *Mentha arvensis* (DE OLIVEIRA et al. 2021); e *Aeollanthus suaveolens* (ARAÚJO et al. 2021).

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho das variáveis de crescimento agrônômico e dos pigmentos fotossintético da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) no cultivo *in vitro* sob variações de intensidade de luz e espectro luminoso.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plântulas de aproximadamente 2cm, cultivadas *in vitro* oriundas de embriogênese somática obtidas pelo o protocolo de Dutra et al. (2011). Os explantes foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), suplementado com 6 g L⁻¹ de ágar (A7921, Sigma-Aldrich®) e pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem à 125 °C e 1,2 atm de pressão por 15 minutos. Após a inoculação, os frascos foram vedados com tampas rígidas contendo sistema de ventilação natural com 4 filtros, e em seguida transferidos para a sala de crescimento e mantidos durante trinta cinco dias em temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h.

2.2. Intensidade de luz no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) contendo cinco intensidades de luz ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fornecidas por lâmpadas de LED, as quais foram aferidas por meio do medidor PRO CHECK + PAR PHOTON FLUX SENSOR, MODELO QSO-S (DECAGON DEVICES – Pullman-Washington-USA). O experimento apresentou 5 tratamentos, constituídos por 5 frascos/tratamento, sendo 1 frasco/repetição contendo 10 explantes/frasco.

2.3. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) contendo cinco espectro de luz (100% azul; 70% azul: 30% vermelha; 50% azul: 50% vermelha; 30% azul: 70% vermelha; 100% vermelha) fornecidos por lâmpadas de LED. O experimento apresentou 5 tratamentos, constituído por 5 frascos/tratamento, sendo 1 frasco/repetição contendo 10 explantes/frasco.

2.4. Avaliações de Parâmetros de crescimento agrônômico

Após 35 dias, as plântulas foram avaliadas quanto aos comprimentos da parte aérea - CPA (cm) e da maior raiz - CMR (cm), diâmetro do colmo - DC (mm), matérias secas da parte aérea - MSPA (mg), do sistema radicular - MSR (mg) e total – MST (mg). Para a determinação da massa seca, a parte aérea e o sistema radicular foram colocados em sacos de papel e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, até peso constante, e posteriormente pesados em balança analítica de precisão (0,001g).

2.5. Análise de pigmentos fotossintéticos.

Pigmento fotossintético foi extraído e analisado de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3), em estufa a $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. As amostras foram preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) na proporção de 5 g L^{-1} de DMSO, sob agitação

constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), contra DMSO saturado em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculado pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo: Clorofila *a* 649 = (12,47 x A665) - (3,62 x A649); Clorofila *b* 665 = (25,06 x A649) - (6,5 x A665); Carotenoides 480: (1000 x A480 - 1,29 x Ca - 53,78 x Cb) / 220. A clorofila total (*a* + *b*) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo todos os resultados expressos em mg. g⁻¹ massa fresca.

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Intensidade de luz no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar.

3.1.1. Parâmetros de crescimento agrônômico

As variações de intensidade de luz tiveram influência no crescimento agrônômico de *Saccharum officinarum* variedade RB966928 cultivadas *in vitro* durante trinta cinco dias (FIGURA 1 e 2).

O comprimento da parte aérea da cana-de-açúcar aumentou com as maiores intensidades de luz. Maior comprimento da parte aérea (5,29 cm) de plântulas foi observado sob intensidade de 113 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, isto é 5 vezes a mais em relação ao controle (1,05 cm). Já o comprimento da maior raiz foi obtido na intensidade de 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4,76 cm) (Figura 2).

O diâmetro do colmo das plântulas foram melhores desenvolvidos, à medida que foi aumentada a intensidade de luz no ambiente de cultivo, atingindo diâmetros de 1,73 e 1,71 mm, nas intensidades de 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (Figura 2C).

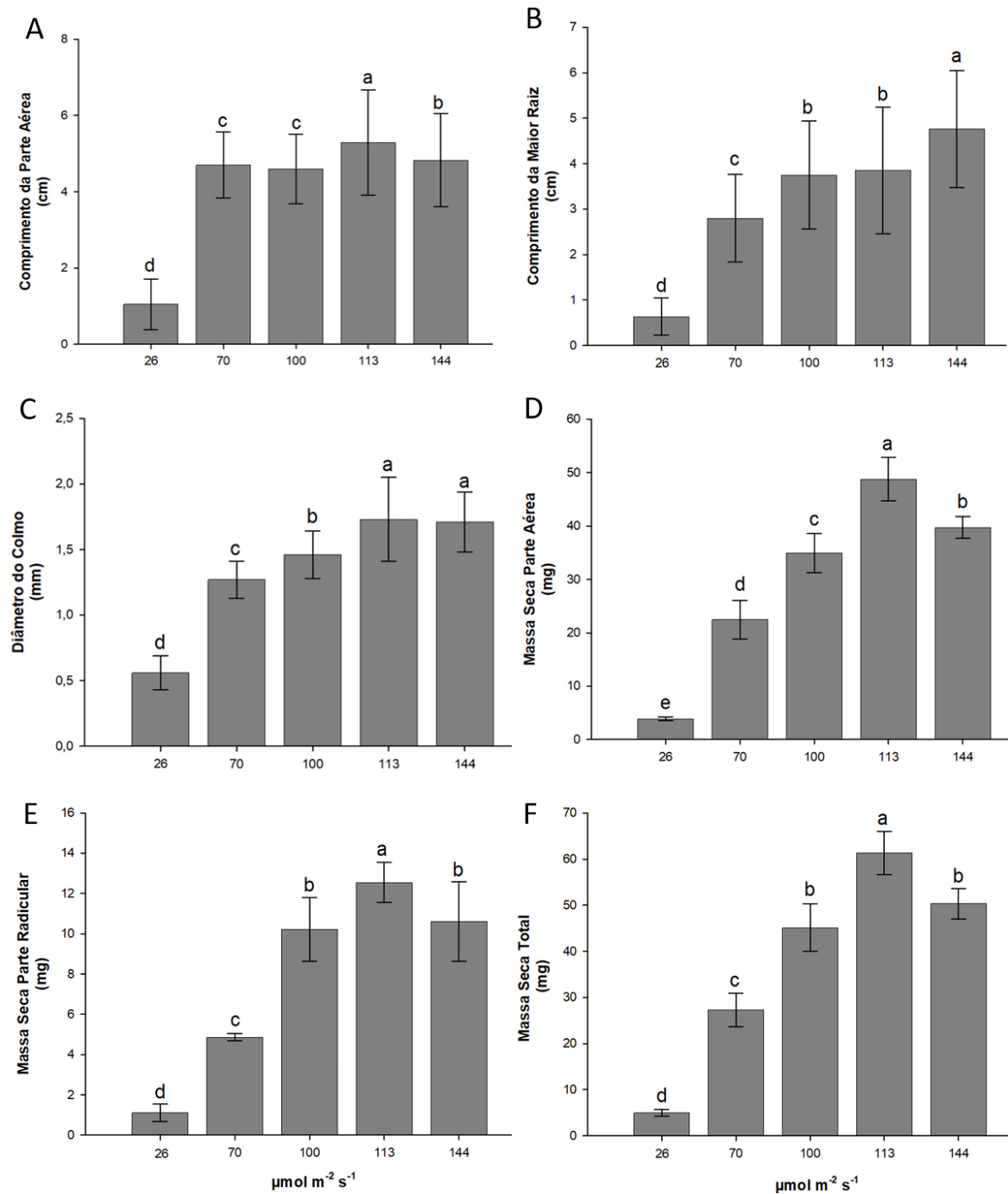
Os parâmetros de massa seca da plântula são os melhores indicativos para determinar o crescimento *in vitro*. O cultivo de cana-de-açúcar acumulou maior massa seca quando aumentou as intensidades de radiação, ocorrendo queda na maior intensidade (144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O maior ganho de massa seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST) foi obtida na intensidade de 113 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2D, E, F). Este acúmulo de massa seca alcançou 12,6 vezes (MSPA), 11,3 vezes (MSR) e 12,3 vezes (MST) em relação ao controle (Figura 2D, E, F).

Figura 1. Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023.



Fonte: Do Autor (2023).

Figura 2. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023



Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

3.1.2. Pigmentos fotossintéticos

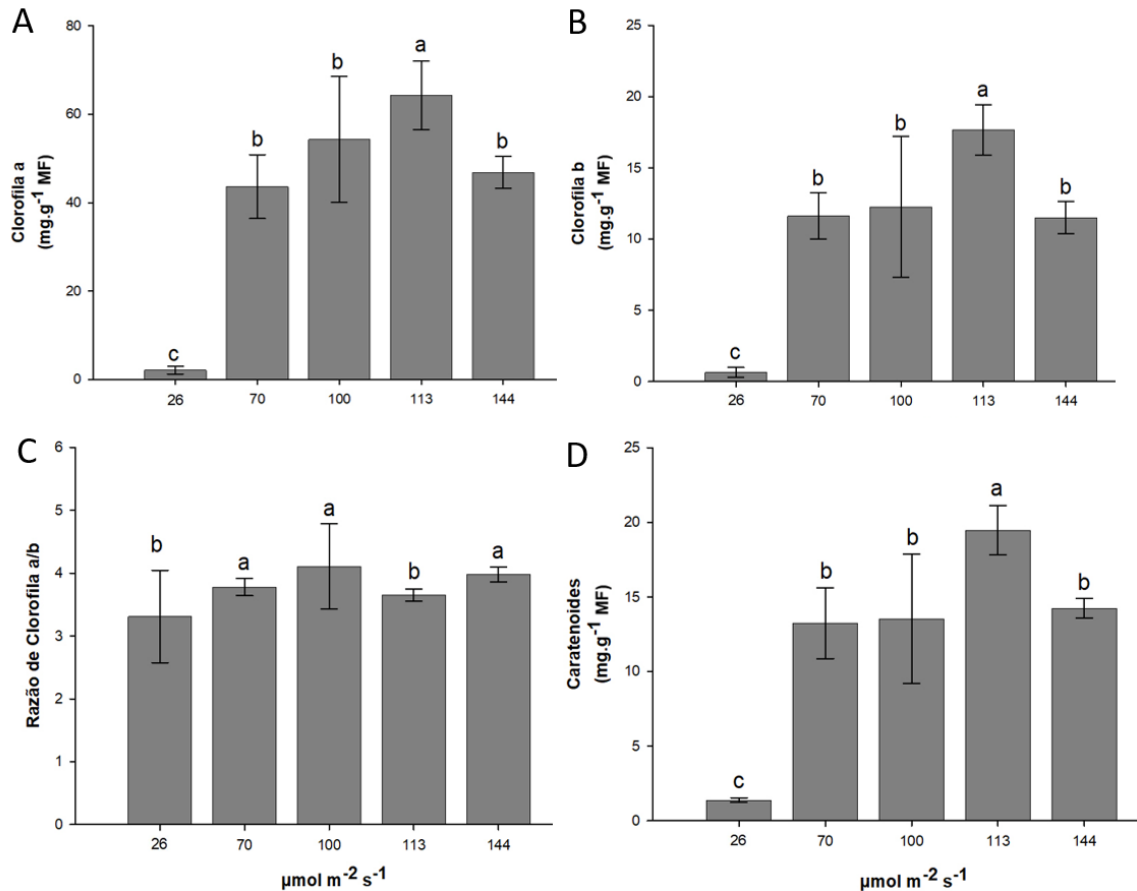
Os pigmentos fotossintéticos das folhas de *Saccharum officinarum* variedade RB966928 cultivadas sob diferentes intensidades de luz responderam aos estímulos luminosos (Figura 3).

A biossíntese dos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, *b* e carotenoides aumentou com a intensidade de luz até $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocorrendo queda na maior intensidade de luz ($144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 3A, B, D). A síntese de clorofila *a*, *b* e carotenoides foi de 30, 27 e 14 vezes em relação ao controle, em consequência disso, o acúmulo de massa seca das plântulas foi afetado.

Vale ressaltar que as intensidades de luz influenciaram a síntese de carotenoides. As plântulas sob a radiação de $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tiveram a síntese de carotenoides aumentada com a incidência de luz, predominando a carotenogênese. Entretanto, a intensidade de luz de $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionaram o excesso de luz, fato que resultou em predominância da fotodegradação nas plântulas. O efeito protetor natural das antocianinas como filtro solar pode ter influenciado em menor fotodegradação dos carotenoides sob a irradiância de $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As maiores médias da razão entre as clorofilas *a* e *b* foram obtidas quando as plântulas foram submetidas as intensidades de luz 70, 100 e $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alcançando a razão entre as clorofilas de 3,78, 4,77 e 3,98, respectivamente (Figura 3C).

Figura 3. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023.



Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. MF: matéria fresca de folha.

3.2. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

3.2.1. Parâmetros de crescimento agrônômico

Os diferentes espectros de luz tiveram influência no crescimento agrônômico de *Saccharum officinarum* variedade RB966928 cultivadas *in vitro* durante trinta e cinco dias (Figura 4 e 5).

O crescimento das plântulas pode ser afetado tanto pela intensidade de luz como pelo comprimento de onda. As plântulas cultivadas sob a luz monocromática vermelha alcançaram o comprimento da parte aérea de 6,35 cm, seguida da luz branca 4,88 cm que possuem todos os espectros de cores visível. Também observou-se que quando o crescimento da parte aérea das

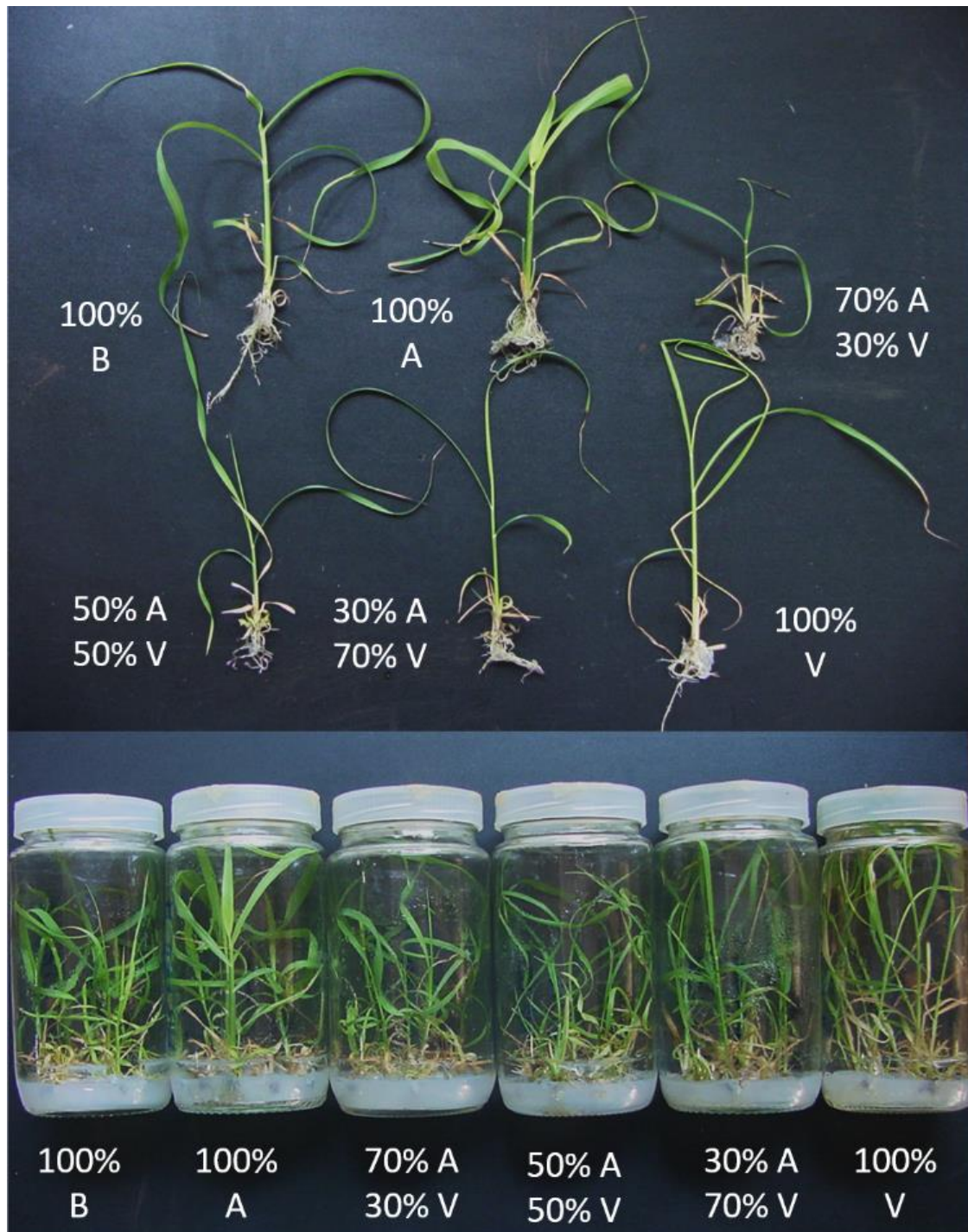
plântulas reduziu conforme diminuiu a proporção da luz vermelha, sendo: 30%A:70%V (4,30 cm); 50%A:50%V (3,56 cm) e 70%A:30%V (2,86 cm) (Figura 5A).

O maior comprimento de raiz (4,84 cm) ocorreu quando as plântulas foram submetidas ao condicionamento de espectro de luz na proporção de 30% azul: 70% vermelha. Já o menor comprimento foi observado na proporção 70%A:30%V (3,35 mm), juntamente com a luz branca (3,36 mm) (Figura 5B).

Os maiores diâmetros do colmo foram obtidos nas plantas submetidas ao condicionamento de luz 100% branca (1,28 mm), seguida da luz 100% azul (1,18 mm), já o vermelho monocromático possibilitou menor diâmetro do colmo (0,95 mm) (Figura 5C).

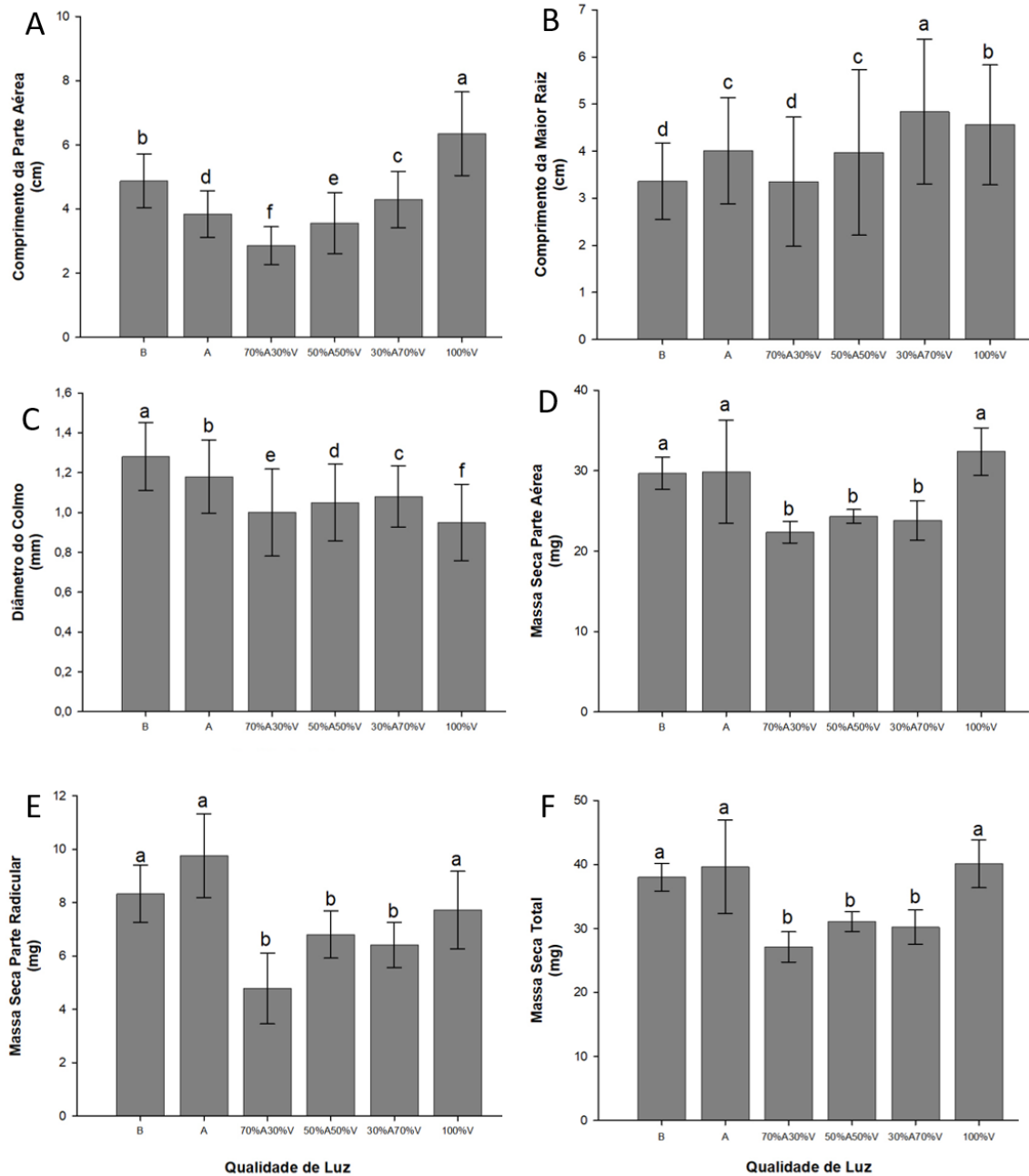
Os parâmetros de massa seca podem indicar um maior vigor das plântulas. As plântulas cultivadas sob as luzes branca e monocromática azul e vermelha acumularam maiores massas secas da parte aérea, raiz e total (Figura 2D, E, F).

Figura 4. Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz: B – branca; A – azul; V – vermelha. UFLA – Lavras, 2023.



Fonte: Do Autor (2023).

Figura 5. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz. UFLA – Lavras, 2023.



Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Branca (B): 100%; Azul (A): 100%; 70%A: 30%V; 50%A:50%V; 30%A:70%V; Vermelha (V): 100%.

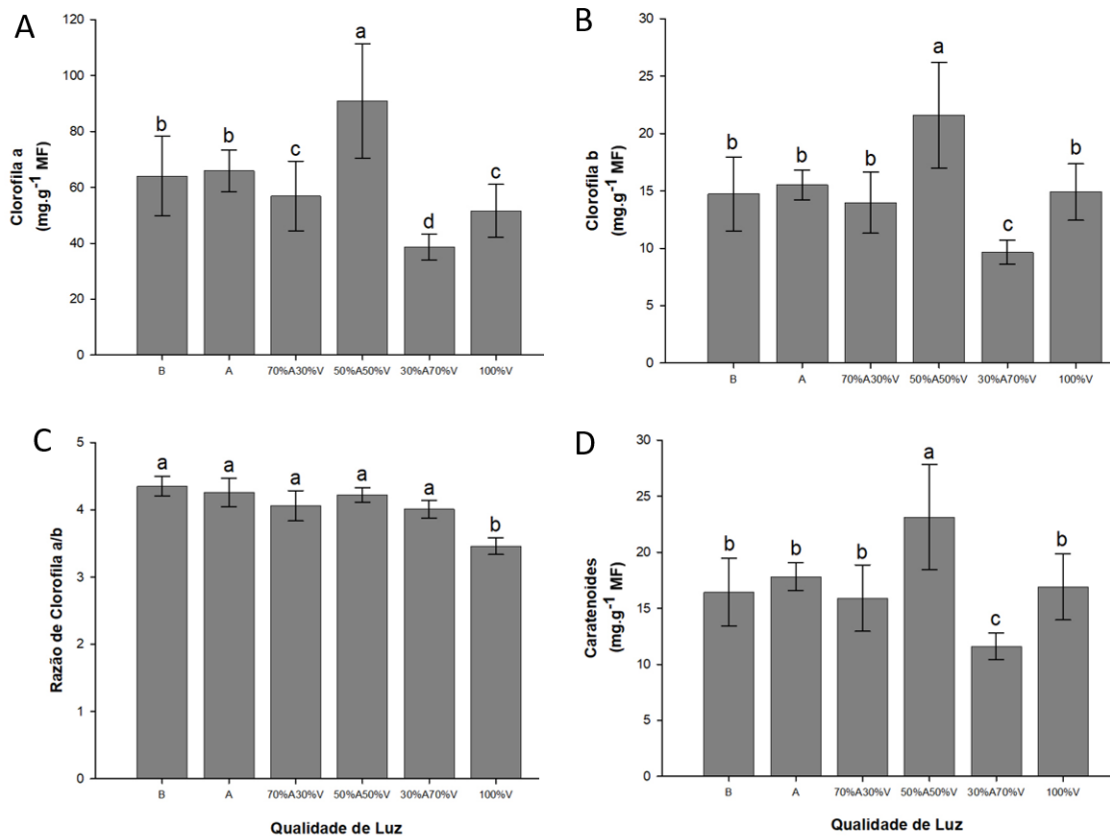
3.2.2. Pigmentos fotossintéticos

A biossíntese dos pigmentos fotossintéticos das folhas de *Saccharum officinarum* variedade RB966928 sofreram alterações na produção mediante aos estímulos dos espectros de luzes, durante o condicionamento da cultura na sala de crescimento (Figura 6).

A biossíntese de clorofila *a* mostrou-se maior acúmulo do pigmento sob os espectros de luz azul e vermelho (50%A:50%V) com conteúdo de 90,90 mg.g⁻¹ MF, seguida das luzes branca LED (64,06 mg.g⁻¹ MF) e azul monocromática (65,96 mg.g⁻¹ MF) (Figura 6A). A clorofila *b* também apresentou o mesmo comportamento que a clorofila *a*, sendo maior síntese (21,59 mg.g⁻¹ MF) nas folhas das plântulas sob a combinação de espectro de 50%A:50%V (Figura 6B).

Em relação a variável razão de clorofilas *a* e *b*, não houve diferença significativa entre os espectros de luzes branca LED, azul, e as combinações de azul e vermelho. A menor razão (3,46) foi observada nas folhas das plântulas submetidas ao espectro de luz vermelho monocromático (Figura 6C). As plântulas quando cultivadas sob a combinação do espectro de luz 50%A:50%V obtiveram maior biossíntese de carotenoides (23,12 mg.g⁻¹ MF) nas folhas (Figura 6D).

Figura 6. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz. UFLA – Lavras, 2023.



Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Branca (B): 100%; Azul (A): 100%; 70%A: 30%V; 50%A:50%V; 30%A:70%V; Vermelha (V): 100%. MF: matéria fresca.

4. DISCUSSÃO

4.1. Intensidade de luz no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

Em algumas espécies, o crescimento da planta é modulado pela interação entre a luz e os processos morfológicos e fisiológicos. O fornecimento de luz adequada e níveis de CO₂ inorgânico no ambiente *in vitro* exige que o potencial e a eficiência de fixação de carbono aumentem (SAGE et al., 2013; SIMLAT et al., 2016). A cana-de-açúcar, por ser uma planta do tipo C₄, apresentou maior crescimento e acúmulo de massa seca na parte aérea e no sistema radicular, em alta intensidade luminosa. Plantas que pertencem a esse grupo apresentam maior eficiência no uso da radiação luminosa, metaboliza melhor a fixação de CO₂ pela fotossíntese

e, converte mais rapidamente em açúcares. Acelerando o crescimento e desenvolvimento da mesma (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014).

A luz também estar diretamente relacionada à produção e distribuição de auxinas nas plantas. Esse hormônio vegetal desempenha papel vital no crescimento e desenvolvimento do vegetal, e estimula a divisão, diferenciação e alongamento celular. As plântulas submetidas a alta intensidade luminosa promoveram melhor proporção dos tecidos, tanto da parte aérea, como do sistema radicular (HALLIDAY et al., 2009; SANQUETTA et al., 2014; WANG et al., 2015). Yang et al (2018) observaram que a concentração endógena desse fitohormônio é regulada pela intensidade e qualidade da luz em plantas de *Glicine max*. O maior crescimento e acúmulo de massa seca na parte aérea e no sistema radicular, em todas as variáveis analisadas, também foram observados em espécies como *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) micropropagadas em intensidades de luz de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (OLIVEIRA et al., 2021), *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng cultivadas sob intensidade de $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ARAÚJO et al., 2021) e *Lippia gracilis* na intensidade luminosa de $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LAZZARINI et al., 2018).

A redução do crescimento e massa seca da parte aérea das plantas submetidas a intensidade de luz de $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pode estar relacionada a danificação dos fotossistemas (PSI e PSII). Cada espécie possui um limite mínimo e máximo de densidade de fluxo de fótons para o crescimento. As plântulas quando submetidas a alta radiação ativa pode produzir espécies reativas de oxigênio e danificar proteínas e lipídios, entre outros. Dessa forma, pode prejudicar o ganho de biomassa e crescimento da mesma (GILL e TUTEJA 2010).

As plântulas de cana-de-açúcar cultivadas a $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram menores medias em todas as características dos parâmetros de crescimento agrônômico. A baixa intensidade de luz no ambiente de cultivo reduz a capacidade fotossintética da planta de produzir fotoassimilado, interferindo negativamente no crescimento do vegetal (TAIZ e ZEIGER 2017). A redução dos parâmetros de crescimento agrônômico de plântulas cultivadas em baixa intensidade de luz também foram visualizados nas espécies *Plectranthus amboinicus* (SILVA et al., 2017) e *Urtica dioica* L (COELHO et al., 2021).

O incremento dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, *b* e carotenoides nas plântulas submetidas a alta intensidade de luz estar relacionado a regulação dos genes responsáveis pela biossíntese de clorofila e carotenoides (ZHANG et al., 2015). A concentração desses pigmentos nas folhas influencia diretamente na capacidade fotossintética da planta, pois, são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia química (SILVA et al., 2017).

Porém, intensidades luminosas alta podem reduzir a concentração desses pigmentos devido à fotodegradação das moléculas. Existindo assim, uma correlação entre intensidade de luz e concentração de pigmentos fotossintéticos (BRAZAITYTE et al., 2015; SILVA et al., 2017). Acredita-se que a fotodegradação ocorre quando há um nível excessivo de luz que ultrapassa a capacidade fotossintética da planta (MALUTA et al., 2013).

Plantas submetidas a altas intensidades de luz tendem a aumentar a concentração dos carotenoides, pois atuam como fotoprotetores do aparato fotoquímico, evitando danos oxidativos às moléculas de clorofila (RAVEN et al., 2014 ; TAIZ e ZEIGER 2017). Enquanto em baixas intensidades de luz, os carotenoides atuam como um complexo de pigmentos acessórios (LIMA et al., 2010).

4.2. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

As plântulas de cana-de-açúcar submetidas ao condicionamento com 100% de luz vermelha apresentaram maior crescimento da parte aérea. O espectro de luz vermelha emite radiação de 660 nm, muito próximo da absorbância máxima pela clorofila e fitocromos. Sendo os fitocromos responsáveis pela tradução da luz, que gera uma série de respostas fisiológicas (fotomorfogênese) específicas, dentre elas, a produção do hormônio vegetal giberelina, responsável ao crescimento. Os genes ligados à produção da giberelina respondem ao estímulo da luz vermelha (KAMIYA e GARCIA-MARTINEZ 1999; MANIVANNAN et al., 2015; TAIZ e ZEIGER 2017). O crescimento da parte aérea de plântulas cultivadas em espectro de luz vermelha, também foram visualizados nas espécies *Plectranthus amboinicus* (SILVA et al., 2017), *Lippia rotundifolia* (HSIE et al., 2019) e *Urtica dioica L* (COELHO et al., 2021).

Os espectros de luz vermelha e azul influenciaram nos parâmetros de crescimento agrônomo da cana-de-açúcar, no espectro monocromático como na proporção de 50%V:50%A. Essa resposta pode estar relacionada ao envolvimento dos espectros nos processos fisiológicos da planta. O espectro de luz azul influencia no fototropismo, morfogênese, abertura de estômatos, funcionamento fotossintético, espessura das folhas e, número de cloroplastos por célula (WHITELAM; HALLIDAY, 2007). Já o do espectro de luz vermelha na otimização da fotossíntese, altura da parte aérea, comprimentos dos entrenós, enraizamento, crescimento das folhas e o acúmulo de carboidratos (LOTFI et al., 2019).

O diâmetro do colmo das plântulas de cana-de-açúcar nada mais é que, entrenós imaturos envolto de folhas jovens. O melhor desenvolvimento do colmo ocorreu no cultivo de luz branca, mesmo sendo um espectro de combinação de baixas intensidades de luz verde e

azul, e outros comprimentos de onda de luz de baixa eficiência para plantas (INMAN-BAMBER et al., 2009; FRASZCZAK et al., 2014; LOTFI et al., 2019). Esse espectro nos cultivos pode aumentar o crescimento das plantas, pois permite que a luz penetre melhor nas folhas, para ser utilizada na fotossíntese, do que as luzes monocromáticas azul e vermelha, como observado para *Lactuca sativa hidropônica* (LIN et al., 2013).

O incremento dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, *b* e carotenoides nas plântulas submetidas a espectro de luz na proporção 50%V: 50%A, são condizentes com as referências encontradas na literatura. Os espectros de luz vermelho e azul são primordialmente os principais indutores de acúmulo de clorofila (LÓPEZ-FIGUEROA et al., 1990).

A combinação de ambos os espectros em proporção adequada é o ideal. Já que, a luz vermelha é mais eficiente do que a luz azul, porque a luz azul é absorvida também por flavonoides e carotenoides, diminuindo a eficiência quântica desta faixa espectral. E a luz azul é responsável por promover a síntese de proteínas, que participam do aparato fotossintéticos e o desenvolvimento dos plastídios do cloroplasto (DUTTA-GUPTA e JATOTHU 2013).

5. CONCLUSÃO

A intensidade de luz $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultou na maior produção de massa seca e de pigmentos fotossintéticos, proporcionando maior vigor da plântula. Já os espectros luminosos monocromáticos branco, azul e vermelho resultaram em plântulas com maior acúmulo de massa seca (MSPA, MSR, MST), e o espectro 50% azul:50% vermelhos na biossíntese dos pigmentos fotossintéticos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. X.; ROCHA, T. T.; DE CARVALHO, A. A.; et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under *in vitro* conditions. **Ind Crops Prod**, 168:113597, 2021.
- BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 32(2), 85–100, 1992.
- BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. O milho e o clima. Porto Alegre: Emater/RS; **Ascar**, 2014. 85p.
- BRAZAITYTE, A. et al. The effects of LED illumination spectra and intensity on carotenoid content in Brassicaceae microgreens. **Food Chemistry**, v. 173, p. 600–606, 2015.
- CIDADE, A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, p.385-391, 2006.
- COELHO, A. D. et al. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 1, p. 59-74, 2021.
- DE OLIVEIRA, T. et al. The effect of alternative membrane system, sucrose, and culture methods under photosynthetic photon flux on growth and volatile compounds of mint in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, n. 3, p. 529-540, 2021.
- DESCHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento in vitro de microestacas e micropropagação de gemas axilares de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.). *Ciência Rural*, v. 25, p. 389-393, 1995. [http:// dx.doi.org/10.1590/S0103-84781995000300010](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781995000300010)
- DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A. E.; SILVA, N. D. G; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar**. Embrapa Clima Temperado. Rio Grande do Sul, 2011.
- DUTTA-GUPTA, S.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep**. 7:211–220, 2013.
- DUTTA-GUPTA, S.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep**, 7:211–220, 2013.
- FAÇANHA, D. C.; SILVA, E. J.; SANTOS, C. A.; PEREIRA, M. C. N.; LOPES, R., QUISEN, R. C. Efeitos de diferentes tipos de luz na micropropagação de brotações de bananeira cultivar Pacovan. **Anais da XV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**, 2018.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- FRĄSZCZAK, B. et al. Growth rate of sweet basil and lemon balm plants grown under fluorescent lamps and led modules. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v.13, n.2, p.3-13, 2014.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem**, 48(12):909–930, 2010.
- HALLIDAY, K. J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F.; JOSSE, E. M. Integration of light and auxin signaling. **CSH Perspect Biol**, 2009.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Can. J. Bot.** 57(12): 1332–1334, 1979.
- HSIE, B. S. D.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Growth regulators induce shoot regeneration and volatile compound production in *Lippia rotundifolia* Cham., an endangered medicinal plant. **Ind Crop Prod**, 137:401–409, 2019.
- INMAN-BAMBER, N. G.; BONNETT, G. D.; SPILLMAN, M. F.; HEWITT, M. L.; JINGSHENG X. Source-sink differences in genotypes and water regimes influencing sucrose accumulation in sugarcane stalks. **Crop & Pasture Science**, v.60, n.4, p.316- 327, 2009.
- KAMIYA, Y.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Regulação da biossíntese de giberelina pela luz. **Curr Opin Plant Biol**, 2(5):398–403, 1999.
- KOZAI, T.; ZHANG, G. Some Aspects of the Light Environment. In: In: Kozai T., Fujiwara K., Runkle E. (eds) LED Lighting for Urban Agriculture. **Springer**, p. 49-55, 2016
- LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V. et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 135(3):367–379, 2018.
- LIAN, M. L. et al. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.94, p.365-370, 2002.
- LIMA, A. L. S.; ZANELLA, F.; DE CASTRO, L. D. M. Crescimento de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Leguminosae) sob diferentes níveis de sombreamento. **Acta Amaz**, v, 40(1):43-48, 2010.
- LIN, Y.; LI, J.; LI, B.; HE, T., CHUN, Z. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 105:329–335, 2011.
- LÓPEZ-FIGUEROA, F.; NIELL, F. X. Efeitos da qualidade da luz no acúmulo de clorofila e biliproteína em algas marinhas. **Mar. Biol.** v. 104, 321-327, 1990.

- LOTFI, M.; MARS, M.; WERBROUCK, S. Optimizing pear micropropagation and rooting with light emitting diodes and trans-cinnamic acid. **Plant Growth Regulation**, 88(2), 173-180, 2019.
- MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, P. H. V.; Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesq Agrop Bras**, 48: 1303-1307, 2013.
- MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH, N.; KO, C. H.; JEONG, B. R. Blue LED light enhances growth, phytochemical content and antioxidant enzyme activities of in vitro grown *Rehmannia glutinosa*. **Hortic Environ Biotechnol**, 56(1):105–113, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PALÚ, E. G.; CORRÊA, C. L. S.; SUZUKI, A.; BOLIANE, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.587-592, 2011.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (2014) **Biologia vegetal**, 8 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- REDAE, M. H.; AMBAYE, T. G. Propagação in vitro da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) variedade C86-165 através do meristema apical. **Biocat Agri Bio**. 14: 228–234, 2018.
- SAGE, R. F.; PEIXOTO, M. M.; SAGE, T. L. Photosynthesis in sugarcane. In: Moore PH, Botha FC (eds) Sugarcane: physiology, biochemistry and functional biology. **John Wiley & Sons Inc.**, Chichester, pp 121–154, 2013
- SANQUETTA, C. R.; BEHLING, A.; CORTE, A. D.; CADORI, G. C.; COSTA, S. J. R.; MACEDO, J. P. Conversion efficiency of intercepted photosynthetic radiation into phytomass of *Eucalyptus dunnii* Maiden seedlings as a function of plant density and cultivation environment. **Sci For**, 42(104):573–580, 2014.
- SANTOS, R. P.; DA CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2008.
- SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cell Dev Bio-Plant**. 49: 445–454, 2013.
- SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the in vitro cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 129(3):501–510, 2017.
- SIMLAT, M.; ŚLĘZAK, P.; MOŚ, M.; WARCHOŁ, M.; SKRZYPEK, E.; PTAK, A. The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sci Hort**, 211: 295–304, 2016.

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products—An overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203-215, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2017) **Plant physiology and development**, 6th edn. Artmed Editora, Porto Alegre.

TOLERA, B.; DIRO, M.; BELEW, D. Effects of 6-benzyl aminopurine and kinetin on in vitro shoot multiplication of sugar cana (*Saccharum officinarum* L.) variedades. **Adv Crop Sci Tech**. 2: 1-5, 2014.

WANG, X. Y.; XU, X. M.; CUI, J. The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light. **Photosynthetica**, v. 53, n. 2, p. 213-222, 2015.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of diferente resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

WHITELAM, G.; HALLIDAY, K. **Light and plant development**. Blackwell: Oxford, UK, 2007.

YANG, F.; FAN, Y.; WU, X.; CHENG, Y.; LIU, Q. et al. Auxin-to-Gibberellin ratio as a signal for light intensity and quality in regulating soybean growth and matter partitioning. **Front Plant Sci**, 9:56–56, 2018.

ZHANG, L.; MA, G.; YAMAWAKI, K.; IKOMA, Y. et al. Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice bags. **J Plant Physiol**, 188:58–63, 2015.

ANEXO I

Tabela 1. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023.

Intensidade de Luz	CPA (cm)	CMR (cm)	DC (mm)
26	1,05 ± 0,665 d	0,64 ± 0,408 d	0,56 ± 0,130 d
70	4,70 ± 0,866 c	2,80 ± 0,966 c	1,27 ± 0,141 c
100	4,60 ± 0,908 c	3,75 ± 1,187 b	1,46 ± 0,180 b
113	5,29 ± 1,384 a	3,85 ± 1,389 b	1,73 ± 0,319 a
144	4,83 ± 1,218 b	4,76 ± 1,289 a	1,71 ± 0,228 a
CV %	2,68	8,84	1,16
	MSPA (mg)	MSR (mg)	MST
26	3,87 ± 0,359 e	1,118 ± 0,429 d	4,98 ± 0,736 d
70	22,44 ± 3,619 d	4,860 ± 0,178 c	27,30 ± 3,586 c
100	34,91 ± 3,693 c	10,22 ± 1,581 b	45,13 ± 5,157 b
113	48,77 ± 4,082 a	12,54 ± 0,996 a	61,31 ± 4,664 a
144	39,74 ± 2,045 b	10,6 ± 1,972 b	50,34 ± 3,295 b
CV %	11,91	17,86	11,68

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: CPA: comprimento da parte aérea; CMR: comprimento da maior raiz; DC: diâmetro do colmo; MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca da raiz; MST: matéria seca total.

ANEXO II

Tabela 2. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). UFLA – Lavras, 2023.

Intensidade de Luz	Clorofila a (mg.g⁻¹ MF)	Clorofila b (mg.g⁻¹ MF)
26	2,13 ± 0,892 c	0,65 ± 0,351 c
70	43,63 ± 7,197 b	11,62 ± 1,623 b
100	50,43 ± 14,26 b	12,27 ± 4,950 b
113	64,30 ± 7,807 a	17,66 ± 1,765 a
144	45,85 ± 3,649 b	11,51 ± 1,126 b
CV %	8,28	12,56
	Razão Clor a/b	Carotenoides (mg.g⁻¹ MF)
26	3,31 ± 0,734 b	1,39 ± 0,148 c
70	3,78 ± 0,140 a	13,24 ± 2,368 b
100	4,11 ± 0,677 a	13,54 ± 4,325 b
113	3,65 ± 0,094 b	19,47 ± 1,654 a
144	3,98 ± 0,1200 a	14,25 ± 0,657 b
CV %	5,41	14,48

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). MF: matéria fresca. As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO III

Tabela 3. Parâmetros de crescimento agronômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz. UFLA – Lavras, 2023.

Espectro de luz	CPA (cm)	CMR (cm)	DC (mm)
100%B	4,88 ± 0,833 b	3,36 ± 0,812 d	1,28 ± 0,170 a
100%A	3,84 ± 0,722 e	4,01 ± 1,131 c	1,18 ± 0,184 b
70%A 30%V	2,86 ± 0,591 f	3,35 ± 1,371 d	1,00 ± 0,217 e
50%A 50%V	3,56 ± 0,958 d	3,97 ± 1,755 c	1,05 ± 0,192 d
30%A 70%V	4,30 ± 0,876 c	4,84 ± 1,539 a	1,08 ± 0,153 c
100%V	6,35 ± 1,301 a	4,56 ± 1,271 b	0,95 ± 0,191 e
CV %	2,91	3,65	1,10
	MSPA (mg)	MSR (mg)	MST
100%B	29,69 ± 1,978 a	8,33 ± 1,069 a	38,02 ± 2,164 a
100%A	29,87 ± 6,417 a	9,76 ± 1,576 a	39,63 ± 7,320 a
70%A 30%V	22,36 ± 1,343 b	4,78 ± 1,325 b	27,14 ± 2,378 b
50%A 50%V	24,31 ± 0,865 b	6,80 ± 0,884 b	31,11 ± 1,563 b
30%A 70%V	23,82 ± 2,445 b	6,42 ± 0,850 b	30,24 ± 2,689 b
100%V	32,39 ± 2,946 a	7,72 ± 1,452 a	40,11 ± 3,741 a
CV %	12,83	19,82	12,36

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: CPA: comprimento da parte aérea; CMR: comprimento da maior raiz; DC: diâmetro do colmo; MSPA: massa seca da parte aérea; MSR: massa seca da raiz; MST: matéria seca total.

ANEXO IV

Tabela 4. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes qualidades de luz. UFLA – Lavras, 2023.

Espectro de luz	Clorofila <i>a</i> (mg.g ⁻¹ MF)	Clorofila <i>b</i> (mg.g ⁻¹ MF)
100%B	64,06 ± 14,211 b	14,74 ± 3,215 b
100%A	65,96 ± 7,4847 b	15,53 ± 1,298 b
70%A 30%V	56,87 ± 12,497 c	13,98 ± 2,663 b
50%A 50%V	90,90 ± 20,388 a	21,59 ± 4,585 a
30%A 70%V	38,65 ± 4,6168 e	9,66 ± 1,034 c
100%V	51,59 ± 9,4638 d	14,90 ± 2,459 b
CV %	5,5	6,17
	Razão Clor <i>a/b</i>	Carotenoides (mg.g ⁻¹ MF)
100%B	4,35 ± 0,145 a	16,44 ± 3,002 b
100%A	4,26 ± 0,212 a	17,81 ± 1,240 b
70%A 30%V	4,06 ± 0,224 a	15,90 ± 2,958 b
50%A 50%V	4,22 ± 0,109 a	23,12 ± 4,694 a
30%A 70%V	4,01 ± 0,133 a	11,60 ± 1,208 c
100%V	3,46 ± 0,123 b	16,92 ± 2,942 b
CV %	4,24	5,53

Legenda: MF: matéria fresca. As barras representam o erro padrão (±). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Artigo III - CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO, Ca e Mg INTENSIDADES DE LUZ, VARIAÇÕES DO pH NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN VITRO*

Resumo

O emprego da biotecnologia vegetal na produção de mudas de cana-de-açúcar aumenta o rendimento da cultura de 10 para 30% e longevidade da cana em 30%. O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho agrônômico e fisiológico da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) submetidas as diferentes intensidades de luz, concentrações de nitrogênio Ca e Mg e o pH do meio de cultura. Plântulas de aproximadamente 2cm, cultivadas *in vitro* oriundas de embriogênese somática foram utilizadas nos experimentos (1 e 2). 1) concentração das fontes de NH_4NO_3 e KNO_3 e intensidade de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). 2) concentração de CaCl_2 e MgSO_4 (100, 200 e 400%) e variações do pH (5,50; 5,75 e 6,00). Após 35 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados comprimentos da parte aérea e da maior raiz, massas secas da parte aérea, sistema radicular e total e clorofila *a*, clorofila *b*, razão entre clorofila *a* e *b* e carotenoides. O sistema radicular atingiu maiores comprimentos do sistema radicular foram observados nas maiores intensidades de luz e menores concentrações de nitrogênio. O aumento da intensidade de luz, independente da concentração de sais, possibilitou o melhor desenvolvimento do colmo. Redução da massa seca de raiz foi verificada com o aumento da concentração de NH_4NO_3 e KNO_3 . Maiores teores de pigmentos fotossintéticos foram obtidos quando as plantas foram submetidas a maior intensidade de luz, independente da concentração de nitrogênio. Maior produção de massa seca foram observadas nas intensidades de 100 a 113 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Já a intensidade de 144 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ reduziu o acúmulo de matéria seca. A concentração 200% de Ca e Mg do meio MS e o pH 5,5 favoreceram a maior produção de massa seca da cana-de-açúcar cultivada *in vitro*.

Palavras-chaves: Crescimento agrônômico. Pigmento fotossintético. Plântulas micropropagadas.

1. INTRODUÇÃO

A crescente busca por fontes de energias renováveis leva o Brasil a investir cada vez mais no aumento de áreas para cultivo de cana-de-açúcar. Na safra atual estima-se uma colheita de 8,12 milhões de hectares (CONAB, 2022).

O emprego da biotecnologia vegetal na produção de mudas garante vantagens como, facilidade de produção em larga escala em pouco espaço de tempo, com produção ao longo do ano sem influência de fatores ambientais, e em condições controladas (AMARAL-BAROLI et al., 2016; GONÇALVES e ROMANO, 2013). Além de possibilitar melhorias nas características fisiológicas das plantas derivadas *in vitro*, como um aumento no rendimento da cultura de 10 para 30% e longevidade da cana em 30% (LEE et al. 2007).

Estudos tem investigado os efeitos dos constituintes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de cana-de-açúcar, não para desenvolver novos meios e sim, melhorias significativas no crescimento da cana-de-açúcar na micropropagação. O sucesso da regeneração vegetal depende do tipo de meio nutricional empregado, bem como de sua composição, pH, suprimento de carbono e as condições de cultivo onde as plantas serão acondicionadas (AMARAL-BAROLI et al., 2016; GONÇALVES e ROMANO, 2013).

Dentre os nutrientes essenciais, o nitrogênio, é um dos principais impulsionadores do crescimento da planta e a sua concentração pode ser crítica para um bom crescimento e desenvolvimento no cultivo *in vitro* (QUEIROGA et al., 2007). O cálcio desempenha um papel importante na morfogênese, devido à sua interação com o hormônio de crescimento citocinina, e o magnésio na ativação de enzimas, e na molécula de clorofila (SHAUL, 2002; MARSCHNER, 2011; PAULA et al., 2015). A intensidade de luz pode alterar respostas fisiológica, aprimorando o desempenho das plantas no microambiente do cultivo *in vitro*. Essas modificação pode trazer diversos benefícios fisiológicos para as plantas (SHIN et al., 2013; KOZAI e ZHANG 2016).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho das variáveis de crescimento agrônomo e dos pigmentos fotossintético da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), submetidas as variações de intensidade de luz, concentrações das fontes de nitrogênio, concentrações Ca e Mg e pH do meio de cultura.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Material vegetal e condições de cultura

Foram utilizadas plântulas de aproximadamente 2cm, cultivadas *in vitro* oriundas de embriogênese somática obtidas pelo o protocolo de Dutra et al. (2011). Os explantes foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), suplementado com 6 g L⁻¹ de ágar (A7921, Sigma-Aldrich®) e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem à 125 °C e 1,2 atm de pressão por 15 minutos. Após a inoculação, os frascos foram vedados com tampas rígidas contendo sistema de ventilação natural com 4 filtros, e em seguida transferidos para a sala de crescimento e mantidos durante trinta cinco dias em temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h.

2.2. Diferentes concentrações de nitrogênio sob diferentes intensidades de luz

O meio de cultura foi suplementado com três concentrações (25, 50 e 100%) das fontes de nitrogênio (NH_4NO_3 e KNO_3) do meio de cultura MS e cinco intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial duplo 3x5, totalizando 15 tratamentos, constituído por 5 frascos/tratamento sendo 1 frascos/repetição com 5 explante/frasco.

2.3. Diferentes concentrações Ca e Mg sob variações do pH do meio de cultura

O meio de cultura foi suplementado com três concentrações (100, 200 e 400%) das fontes (CaCl_2 e MgSO_4) do meio de cultura MS e três variações do pH (5,50; 5,75 e 6,00). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial duplo 3x3, totalizando 15 tratamentos, constituído por 5 frascos/tratamento sendo 1 frascos/repetição com 5 explante/frasco.

2.4. Análise dos parâmetros de crescimento agrônômico

Após 35 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas foram avaliadas quanto aos comprimentos da parte aérea - CPA (cm) e da maior raiz - CMR (cm), diâmetro do colmo - DC (mm), matérias secas da parte aérea - MSPA (mg), do sistema radicular - MSR (mg) e total - MST (mg). A determinação da massa seca, a parte aérea e sistema radicular foram colocados em sacos de papel e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a 35 °C, até peso constante, e posteriormente pesados em balança analítica (0,001g).

2.5. Análise de pigmentos fotossintéticos.

Pigmento fotossintético foi extraído e analisado de acordo com o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por Barnes et al. (1992). Folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio e incubadas com 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3), em estufa a 65 °C por 48 h. As amostras foram preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de Santos et al. (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) na proporção de 5 g L^{-1} de DMSO, sob agitação

constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control® (versão 3.37), contra DMSO saturado em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculado pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo: Clorofila *a* 649 = (12,47 x A665) - (3,62 x A649); Clorofila *b* 665 = (25,06 x A649) - (6,5 x A665); Carotenoides 480: (1000 x A480 - 1,29 x Ca - 53,78 x Cb) / 220. A clorofila total (*a* + *b*) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo todos os resultados expressos em mg. g⁻¹ massa fresca.

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Diferentes concentrações de nitrogênio sob diferentes intensidades de luz

3.1.1. Parâmetros de crescimento agrônômico

A variação dos sais NH₄NO₃ e KNO₃ no meio de cultura MS e as diferentes intensidades luminosas no ambiente de cultivo, interferiram no crescimento da cana-de-açúcar (Figura 1 e 2).

As plantas submetidas ao meio de cultura com apenas 25% dos sais NH₄NO₃ e KNO₃ e intensidade de luz de 70 μmol m⁻² s⁻¹ apresentaram os maiores comprimento da parte área (6,08 cm), reduzindo o tamanho à medida que aumentou a intensidade de luz (Figura 2A). As plantas cultivadas com 50% da concentração de nitrogênio e a intensidade de 100 μmol m⁻² s⁻¹ atingiram uma altura de 5,45 cm. Já o MS contendo 100% da concentração dos sais e nas intensidades de luz 100 e 113 μmol m⁻² s⁻¹ atingiram o maior comprimento da parte área (5,87 cm) (Figura 2A).

O sistema radicular atingiu maiores comprimentos com maiores intensidades e menores concentrações de nitrogênio. A maior média (5,81 cm) foi alcançada na intensidade de luz de $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na concentração 25% de nitrogênio (Figura 2B).

O diâmetro do colmo das plântulas também foram melhores desenvolvidos à medida que aumentou a intensidade de luz no ambiente de cultivo, atingindo diâmetros de 2,23 e 1,94 mm no meio suplementado com 25 e 50% da concentração de nitrogênio, respectivamente. O meio de cultura com a concentração original do MS (100%) e intensidade de $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ alcançou um diâmetro de 2,26 mm (Figura 2C).

Em relação a produção de massa seca, as plântulas apresentaram maiores medias quando submetidas ao aumento da intensidade de luz, tanto da parte aérea como do sistema radicular (Figura 2D, E). As plântulas cultivadas com 25% da concentração de nitrogênio do meio MS acumularam maior massa seca com as maiores intensidades de luz $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (76,20 mg) e $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (73,84 mg). Entretanto, o maior acúmulo de massa seca de raiz foi sob $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com 62,43 mg. O aumento da concentração dos sais de NH_4NO_3 e KNO_3 reduziu o acúmulo da massa seca da raiz (Figura 2E).

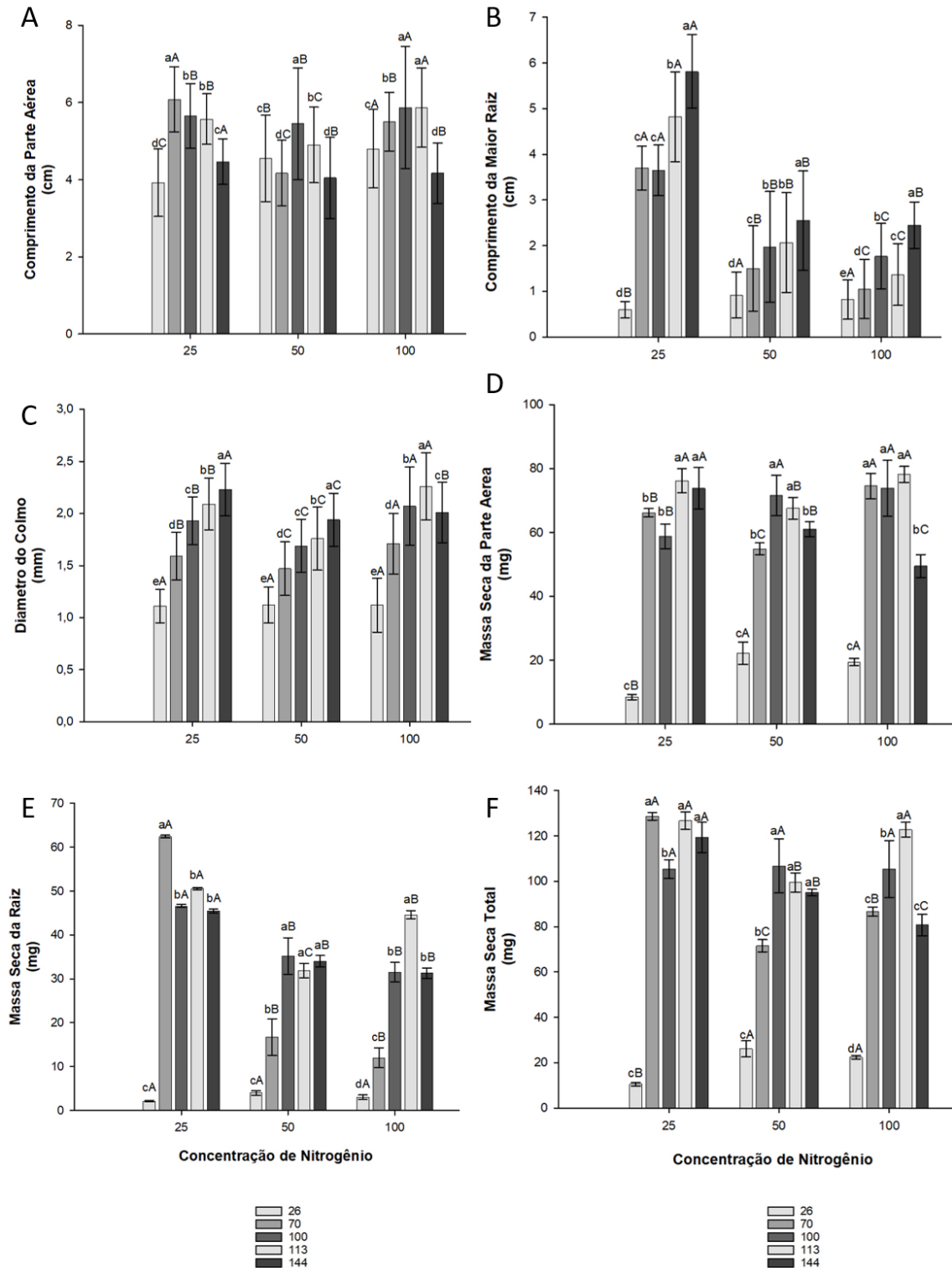
No geral, as intensidades 70 , 113 e $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com 25% da força de nitrogênio apresentaram maior acúmulo produção de massa seca total (128,6, 126,7 e 119,3 mg), respectivamente (Figura 2F).

Figura 1. Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, sob diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentrações de nitrogênio do meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 2. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio do meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023.



Legenda: Barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da concentração de nitrogênio e letras maiúsculas dentro da intensidade de luz, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade

3.1.2. Análise de pigmentos fotossintéticos

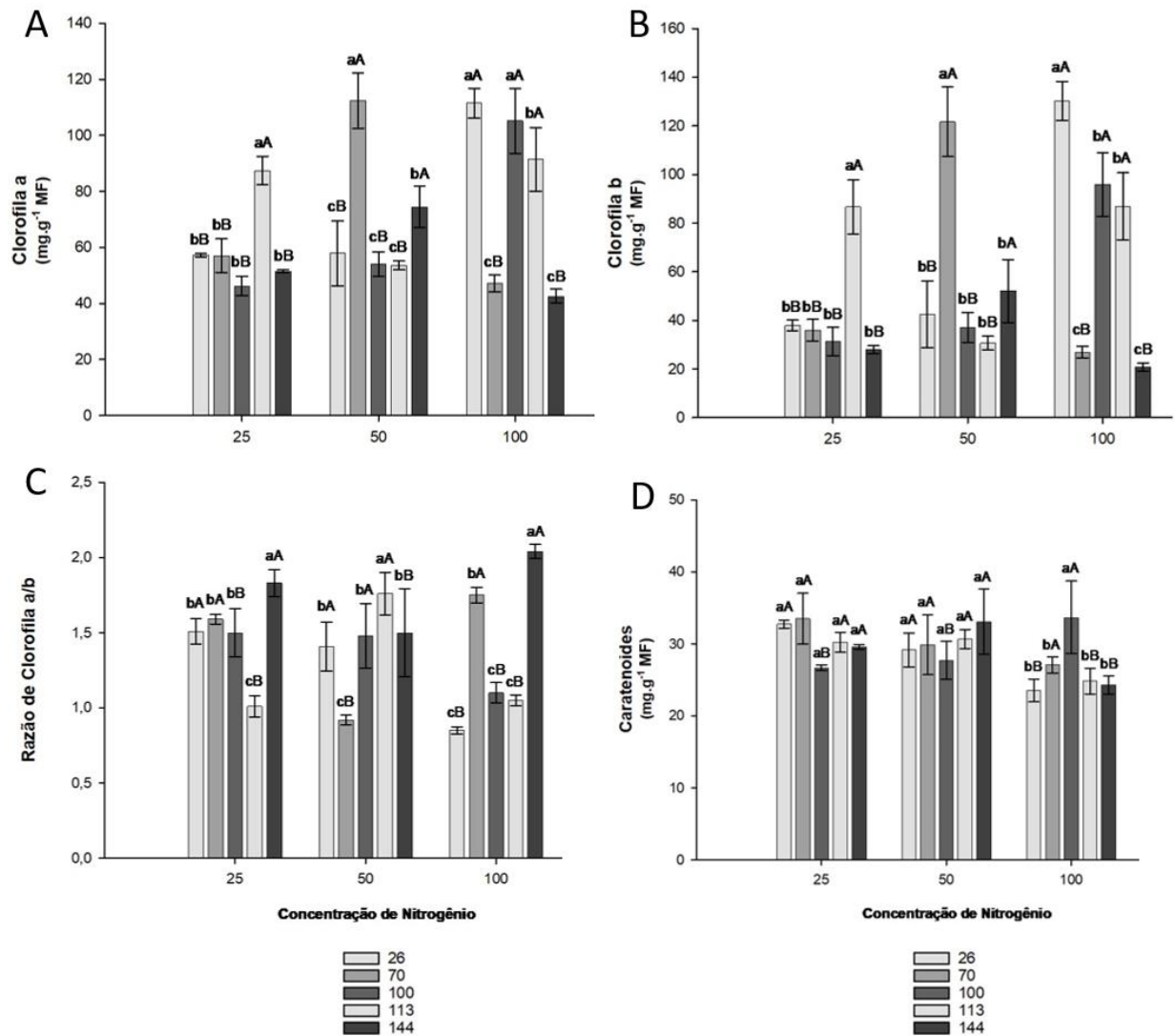
Os pigmentos fotossintéticos das folhas de *Saccharum officinarum* variedade RB966928 respondeu as diferentes intensidades de luz e concentrações de nitrogênio no meio de cultura.

As maiores concentrações da clorofila *a* ocorreram com as plântulas cultivadas nas maiores concentrações dos sais de nitrogênio com as menores intensidades de luz $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (111,4 mg.g⁻¹ MF) e $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (112,3 mg.g⁻¹ MF) (Figura 4A).

O teor de clorofila *b* apresentou o mesmo padrão de síntese da clorofila *a*. Onde, as menores intensidades de luz e maiores concentrações de sais de 50 a 100% acumularam maior síntese de clorofila *b*, $26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (130,2 mg.g⁻¹ MF) e $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (121,6 mg.g⁻¹ MF) (Figura 4B).

As maiores medias da variável razão entre as clorofilas *a* e *b*, foram obtidas quando submetidas a intensidade de luz mais alta, em todas as concentrações de nitrogênio. (Figura 4C). O teor de carotenoides variou com a intensidade e concentração da fonte de nitrogênio do meio MS. No geral, acumulou teor de carotenoides sob as maiores intensidades de luz (Figura 4D).

Figura 3. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023.



Legenda: Barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da concentração de nitrogênio e letras maiúsculas dentro da intensidade de luz, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. MF: matéria fresca de folha.

3.2. Diferentes concentrações Ca e Mg sob variações do pH do meio de cultura

3.2.1. Parâmetros de crescimento agrônômico

As concentrações de Ca e Mg e as variações no pH do meio de cultura, interferiram no crescimento da cana-de-açúcar *in vitro* (Figura 4 e 5). Os parâmetros de crescimento agrônômico da cana-de-açúcar, apresentaram significativos quanto as variações nas concentrações de cálcio e magnésio, dentro de cada aferição do pH do meio de cultura MS (Figura 5).

As plântulas quando cultivadas no meio suplemento com 200% da concentração de Ca e Mg do meio MS e pH de 5,50 alcançaram maior comprimento da parte aérea (7,66 cm). Nas demais concentrações de Ca e Mg, as plantas apresentaram redução do comprimento, à medida que, o pH do meio de cultivo aumentou (Figura 5A).

O crescimento do sistema radicular foi inibido com a maior concentração de Ca e Mg em todas as variações do pH. As concentrações de 100 e 200% obtiveram os maiores crescimento do sistema (Figura 5B).

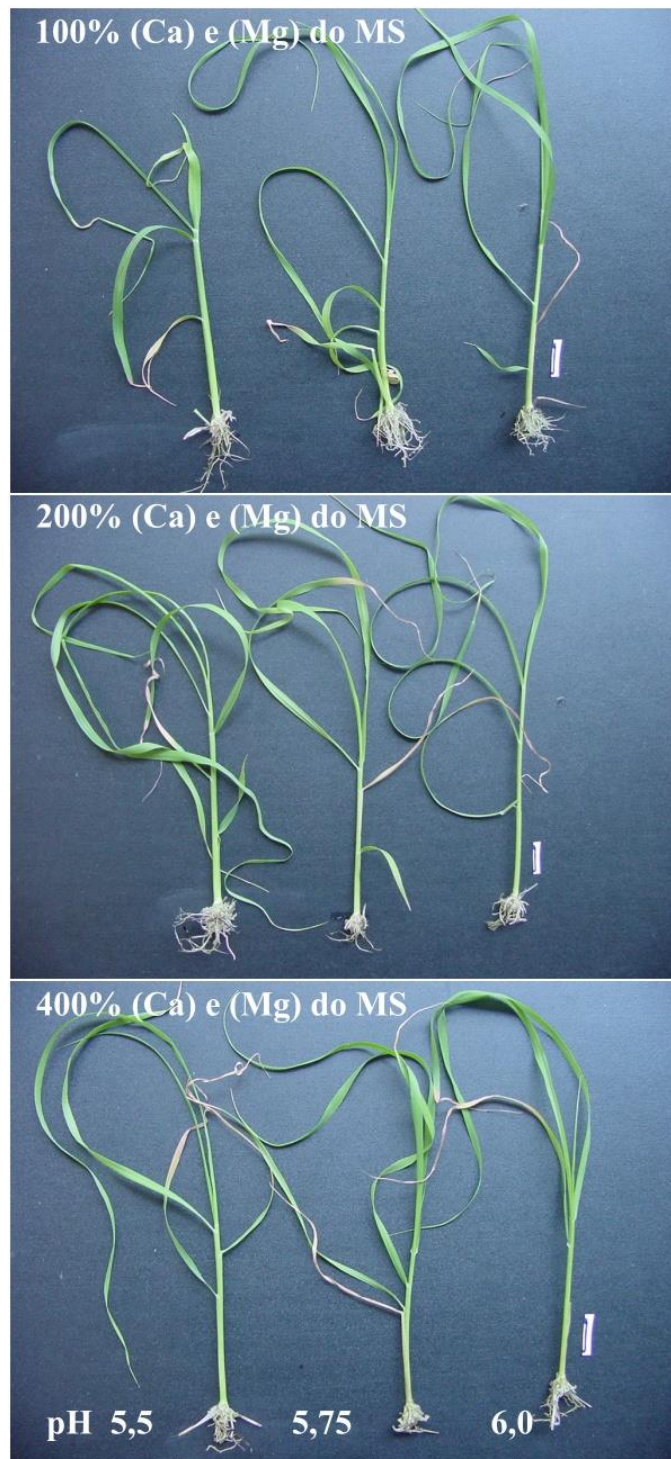
O diâmetro do colmo foi reduzido com o aumento do pH e com o aumento da concentração de Ca e Mg no meio de cultura MS. A maior média (1,89 mm) foi alcançada com 200% das concentrações de Ca e Mg, com o pH de 5,50 (Figura 5C).

A massa seca da parte aérea reduziu com o aumento do pH no meio de cultura MS. As plântulas cultivadas no meio MS com 200% da concentração de Ca e Mg e pH 5,50 obtiveram o maior acúmulo de massa seca (88,92 mg) (Figura 5D).

As plântulas cultivadas com 200% das concentrações de Ca e Mg e pH 5,5 atingiram o maior acúmulo de massa seca de raiz (35,66 mg) (Figura 5E).

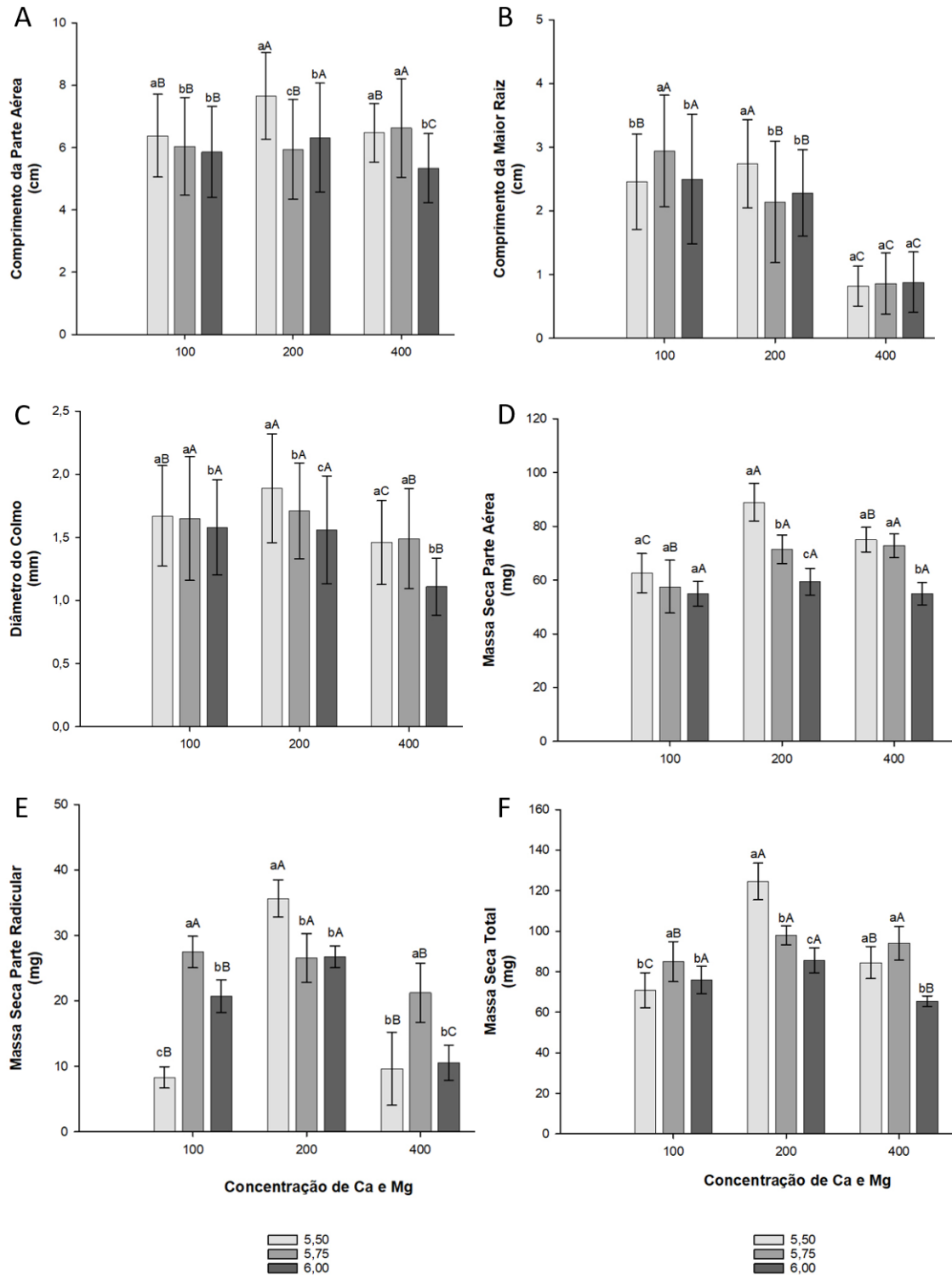
A produção de massa seca total (124,58 mg) no meio suplementado com 200% de Ca e Mg do meio MS foi de 1,75 vezes comparado com a concentração normal do MS (70,88 mg).

Figura 4. Aspecto visual das plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* em sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes pH (5,5, 5,75 e 6,0) e concentrações de cálcio e magnésio (100, 200 e 400%) no meio de cultura MS. UFLA – Lavras, 2023.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 5. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de Cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* em sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes pH (5,5, 5,75 e 6,0) e diferentes concentrações de cálcio e magnésio no meio de cultura MS (100%, 200% e 400%). UFLA – Lavras, 2023.



Legenda: Barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula dentro da concentração de Ca e Mg e letras maiúsculas dentro da variação de pH, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

4.1. Diferentes concentrações de nitrogênio sob diferentes intensidades de luz

A redução da concentração dos sais NH_4NO_3 e KNO_3 no meio de cultura MS, não causou crescimento retardado e nem mobilização no nitrogênio das folhas mais velhas para as áreas de novo crescimento, o que afetaria na produção de fotoassimilado e diretamente o crescimento (ALVARENGA, 2004).

Plântulas de cana-de-açúcar apresentaram melhor eficiência da radiação luminosa à medida que aumentou a concentração de nitrogênio no meio. Isso pode estar relacionado ao aumento de produção de biomoléculas importante dependente de nitrogênio, tais como ATP, NADH, NADPH, DNA, RNA, clorofila e proteínas (MIFLIN; LEA, 1976; HARPER, 1994). Para metabolizar melhor a fixação de CO_2 pela fotossíntese e, converte mais rapidamente em açúcares. Acelerando o crescimento e desenvolvimento da mesma (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014).

O sistema radicular mais abundante foi visualizado nas plantas submetidas a redução da fonte de nitrogênio. Este resultado já era esperado pois, plantas sob estresse nutricional investem na proliferação em massa de raízes para aumentar a área de superfície para absorção máxima de nutrientes (PELLNY et al., 2008).

A relação entre o teor de clorofila e carotenoides nas folhas, variam de acordo com a quantidade de nitrogênio, irradiância e da temperatura, indicando que a biossíntese desses pigmentos é um fator dinâmico e que responde à variação de alguns componentes do ambiente (MAE, 1997). As plantas de cana-de-açúcar apresentaram maiores conteúdos fotossintéticos nos tratamentos submetidos 100% da concentração de nitrogênio, esse resultado já era esperado, já que o nitrogênio é constituinte da molécula de clorofila. O teor desse pigmento na folha também é utilizado para predizer o nível nutricional de nitrogênio em plantas (SILVEIRA, BRAZ & DIDONET, 2003).

4.2. Diferentes concentrações Ca e Mg sob variações do pH do meio de cultura

O cálcio e magnésio são minerais que fazem parte dos componentes mesos do meio de cultura, usados principalmente para melhorar o crescimento de plantas com baixo crescimento *in vitro* (REED et al., 2013; POOTHONG & REED 2014; DE CARVALHO et al., 2018). O cálcio desempenha um papel importante na morfogênese, devido à sua interação com o

hormônio de crescimento citocinina, principalmente na área onde ocorre a diferenciação, já o magnésio é considerado o melhor ativador de enzimas, é um cátion livre bivalente mais abundante no citosol das plantas e, átomo central na molécula de clorofila que contribui para o aumento do teor (SHAUL, 2002; MARSCHNER, 2011; PAULA et al., 2015). Além disso, os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} influenciam no regime autotrófico no cultivo *in vitro*, favorecendo ao maior crescimento das plântulas (ARIGITA et al., 2010).

As plântulas de cana de açúcar apresentaram maior comprimento da parte aérea, diâmetro do colmo, peso seco da parte aérea e sistema radicular quando cultivadas em meio de cultura MS com 200% da concentração original dos minerais cálcio e magnésio. Na literatura há vários relatos sobre a influência desses minerais no crescimento de plantas *in vitro* como por exemplo; *Pyrus* (pêra) (REED et al., 2013), cultivares de avelã (HAND et al., 2014), *Dysphania ambrosioides* L. (DE CARVALHO et al., 2018); *Solanum tuberosum* L. (Batata) (LEKAMGE et al., 2021).

Altos níveis de Mg na célula das plantas pode inibir fotossíntese e o crescimento da planta, devido sua interação com outros nutrientes. A absorção de K é inibido quando a concentração de Mg é alta, afetando diretamente a condutância estomática. Zn e Mn também tem a absorção prejudicada, elementos importantes para a rota do ácido chiquimico e síntese do triptofano, que é um precursor da auxina (ácido indol acético) (MOREIRA et al., 2003; VILLA et al., 2009; PAULA et al., 2015).

A redução do sistema radicular das plantas submetidas a 400% da força de cálcio e magnésio pode estar relacionada a alta concentração dos íons no meio de cultura. Os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} são absorvidos pelas raízes por meio do contato íon-raiz, ou seja, interceptação radicular (ZELAZNY e VERT, 2014). Sendo assim, quanto maior a concentração desses íons no meio, menor a emissão do sistema radicular. O aumento da concentração de $MgSO_4$ e $CaCl_2$ também reduziu o número de raízes em bananeira cv. Prata-Anã (RODRIGUES et al., 2017)

As plântulas submetidas aos tratamentos com pH 6,0 apresentaram menores medias nas variáveis de crescimento agrônômico devido a baixada disponibilidade de nutrientes causada pelo pH básico, influenciando diretamente no metabolismo da planta (Li et al., 2021). Plântulas de *Vaccinium arboreum* também apresentaram menor crescimento quando submetidas ao pH básico do meio de cultura (LI et al., 2021).

5. CONCLUSÃO

O sistema radicular atingiu maiores comprimentos com maiores intensidades e menores concentrações de nitrogênio. O diâmetro do colmo das plântulas também foram melhores desenvolvidos à medida que aumentou a intensidade de luz independente da concentração de sais. O aumento da concentração dos sais de NH_4NO_3 e KNO_3 reduziu o acúmulo da massa seca da raiz. As maiores medias dos pigmentos fotossintético, foram obtidas quando submetidas a intensidade de luz mais alta, em todas as concentrações de nitrogênio. Nas intensidades 70, 113 e $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve a maior produção de massa seca total. A 200% de Ca e Mg do meio MS e o pH 5,5 favoreceram a maior produção de massa seca da cana-de-açúcar cultivada *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. **Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia.** Lavras: UFLA, 2004.
- AMARAL-BAROLI, A. et al. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (*in vitro*), acclimated (*ex vitro*) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 180-185, 2016.
- ARIGITA, L.; CANA, L. J.; TAME´S, R. S.; GONZA´LEZ, A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cell Dev Biol Plant** 46:312–322, 2010.
- BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, 32(2), 1992.
- BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima.** Porto Alegre: Emater/RS; Ascar, 2014. 85p.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** Brasília, v.6, n.4, 58p,2022.
- DE CARVALHO, A. A.; VILELA BERTOLUCCI, S. K.; DA SILVA, G. M. et al. Mesos componnets (CaCl, MgSO , KH PO) induced changes in growth and ascaridole content of *Dysphania ambrosioides* L. in vitro. **Ind Crops Prod**, 122: 28–36, 2018.
- DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A. E.; SILVA, N. D. G; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar.** Embrapa Clima Temperado. Rio Grande do Sul, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. Cultura *in vitro* de alfazema (*Lavandula* spp.) E produção de metabólitos secundários. **Avanços da biotecnologia**, v. 31, n. 2, pág. 166-174, 2013.
- HAND, C.; REED, B. M. Minor nutrients are critical for the improved growth of *Corylus avellana* shoot cultures. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 119: 427–439, 2014.
- HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Can. J. Bot.** 57(12), 1979.
- KOZAI, T.; ZHANG, G. Some Aspects of the Light Environment. In: In: Kozai T., Fujiwara K., Runkle E. (eds) LED Lighting for Urban Agriculture. **Springer**, p. 49-55, 2016
- LEE, T. S. G.; BRESSAN, E. A.; CORRÊA DA SILVA, A. D.; LEE, L. L. **Implantação de biofábrica de cana-de-açúcar: riscos e sucessos.** 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais / 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas / 1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas. 2007.

- LEKAMGE, D.; SASAHARA, T.; YAMAMOTO, S. I.; HATAMOTO, M. et al. Effect of enhanced CaCl₂, MgSO₄, and KH₂PO₄ on improved in vitro growth of potato. **Plant Biotechnology**, v. 38 (4), 401-408, 2021.
- LI, Q.; YU, P.; LAI, J.; GU, M. "Micropropagation of the potential blueberry rootstock - *Vaccinium arboreum* through axillary shoot proliferation" **Scientia horticulturae**, v. 280, p.109908, 2021.
- MAE, T. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis and yield potential. **Plant and Soil**, v. 196, p. 201-210, 1997.
- MARSCHNER, H (2011) **Mineral Nutrition of Higher Plants**, Second Edi. Academic Press, London.
- MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v.15, p.873-885, 1976.
- MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; HEINRICHS, R.; TANAKA, R. T. Influência do magnésio na absorção de manganês e zinco por raízes destacadas de soja. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v. 38, p. 95-101, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PAULA, Y. C. M.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; PINHO, P. J.; SANTOS, D. N. Micropropagação de bananeira sob diferentes concentrações de potássio e magnésio. **Tecnologia e Ciências Agropecuária**, João Pessoa, v.9, n.3, p.43-47, 2015.
- PELLNY, T. K.; VAN AKEN, O.; DUTILLEUL, C.; WOLFF, T. Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. **The Plant Journal**, 54: 976-992, 2008.
- POOTHONG, S.; REED, B. M. Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. *Sci Hortic* 165: 132–14, 2014.
- QUEIROGA, R. C. F. et al. Influência de doses de nitrogênio na produtividade e qualidade do melão *Cantalou pensis* sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 25 n. 4, 2007.
- REED, B. M.; WADA, S.; DENOMA, J.; NIEDZ, R. P. Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. **In Vitro Cell Dev Biol – Plant**, 49: 343–355, 2013.
- RODRIGUES, F.; ALVES, L. S. R.; & SOARES, J.; BRANT, L.; SETOTAW, T.; PASQUAL, M.; LUZ, J. Effect of modifying concentrations of calcium and magnesium on in vitro development of banana CV. Prata-Anã (Genomic group AAB). **Bioscience Journal**. V. 33, p. 1113-1118, 2017.
- SANTOS, R. P.; DA CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2008.
- SHAUL, O. **Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg** Biometals, v. 15, p. 307-321, 2002.

SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Metabolismo do açúcar, fotossíntese e crescimento de plântulas in vitro de *Doritaenopsis* sob condições microambientais controladas. **In Vitro Cell Dev Bio-Plant**, 49: 445–454, 2013.

SILVEIRA, P. M.; BRAZ, A. J. B. P.; DIDONET, A. D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, 1083-1087, 2003.

VILLA, F.; PASQUAL, M; ASSIS, F. A. D.; ASSIS, G. A. D.; ZÁRRAGA, D. Z. A. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Cienc. Agrotecnol.**, v. 33, p. 468-472, 2009.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of diferente resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

ZELAZNY, E.; GRÉGOR, V. Plant nutrition: root transporters on the move. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 500-508, 2014.

ANEXO I

Tabela 1. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio do meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023.

Conc. de N	----- Comprimento da Parte Aérea (cm) -----				
	26	70	100	113	144
25%	3,92 ± 0,876 cD	6,08 ± 0,843 aA	5,65 ± 0,840 bB	5,57 ± 0,653 bB	4,47 ± 0,592 aC
50%	4,55 ± 1,124 bC	4,17 ± 0,852 cD	5,45 ± 1,446 bA	4,90 ± 0,977 cB	4,05 ± 1,055 bD
100%	4,80 ± 1,017 aC	5,50 ± 0,763 bB	5,87 ± 1,583 aA	5,87 ± 1,028 aA	4,17 ± 0,781 bD
CV%	3,72				
Conc. de N	----- Comprimento da Maior Raiz (cm) -----				
	26	70	100	113	144
25%	0,60 ± 0,180 bD	3,70 ± 0,478 aC	3,65 ± 0,552 aC	4,82 ± 0,983 aB	5,81 ± 0,805 aA
50%	0,92 ± 0,504 aD	1,50 ± 0,933 bC	1,97 ± 1,212 bB	2,07 ± 1,092 bB	2,55 ± 1,082 bA
100%	0,82 ± 0,431 aE	1,05 ± 0,647 cD	1,77 ± 0,715 cB	1,37 ± 0,678 cC	2,45 ± 0,508 bA
CV%	6,25				
Conc. de N	----- Diâmetro do Colmo (mm) -----				
	26	70	100	113	144
25%	1,11 ± 0,162 aE	1,59 ± 0,230 bD	1,93 ± 0,228 bC	2,09 ± 0,248 bB	2,23 ± 0,251 aA
50%	1,12 ± 0,173 aE	1,47 ± 0,0257 cD	1,69 ± 0,252 cC	1,76 ± 0,304 cB	1,94 ± 0,255 cA
100%	1,12 ± 0,259 aE	1,71 ± 0,290 aD	2,07 ± 0,375 aB	2,26 ± 0,320 aA	2,01 ± 0,290 bC
CV%	2,48				
Conc. de N	----- Massa Seca Parte Aérea (mg) -----				
	26	70	100	113	144
25%	8,48 ± 0,799 bC	66,2 ± 1,265 bB	58,84 ± 3,893 bB	76,2 ± 3,765 aA	73,84 ± 6,528 aA
50%	22,16 ± 3,467 aC	54,92 ± 1,916 cB	71,6 ± 6,376 aA	67,6 ± 3,411 bA	61,08 ± 1,908 bB
100%	19,44 ± 1,169 aC	74,52 ± 3,967 aA	73,88 ± 8,782 aA	78,1 ± 2,483 aA	49,48 ± 8,129 cB
CV%	8,94				
Conc. de N	----- Massa Seca Parte Radicular (mg) -----				
	26	70	100	113	144
25%	2,14 ± 0,155 aC	62,43 ± 0,34 aA	46,60 ± 0,30 aB	50,56 ± 0,25 aB	45,50 ± 0,45 aB
50%	4,00 ± 0,506 aC	16,72 ± 4,16 bB	35,20 ± 5,72 bA	31,88 ± 1,70 cA	34,00 ± 1,32 bA
100%	3,04 ± 0,512 aD	12,00 ± 2,25 bC	31,52 ± 3,90 bB	44,60 ± 0,97 bA	31,28 ± 1,17 bB
CV%	14,65				
Conc. de N	----- Massa Seca Total (mg) -----				
	26	70	100	113	144
25%	10,62 ± 0,838 bC	128,6 ± 1,604 aA	105,4 ± 4,147 aB	126,7 ± 3,861 aA	119,3 ± 6,761 aA
50%	26,16 ± 3,580 aC	71,62 ± 2,655 cB	106,8 ± 11,95 aA	99,48 ± 4,165 bA	95,08 ± 1,436 bA
100%	22,48 ± 0,805 aD	86,62 ± 1,978 bC	105,4 ± 12,53 aB	122,7 ± 3,257 aA	80,76 ± 4,696 cC
CV%	9,06				

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas dentro das concentrações e letras maiúsculas entre as concentrações, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO II

Tabela 2. Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* no sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes intensidades de luz (26, 70, 100, 113 e 144 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura MS (25%, 50% e 100%). UFLA – Lavras, 2023.

Conc. de N	-----Clorofila <i>a</i> (mg.g ⁻¹ MF)-----				
	26	70	100	113	144
25%	57,14 ± 0,662 bB	57,07 ± 5,963 bB	46,21 ± 3,509 bB	87,44 ± 5,082 aA	51,44 ± 0,575 bB
50%	57,9 ± 11,56 bC	112,3 ± 9,811 aA	53,94 ± 4,386 bC	53,62 ± 1,568 bC	74,52 ± 7,392 aB
100%	111,4 ± 5,343 aA	47,13 ± 2,961 bC	105,1 ± 11,58 aA	91,44 ± 11,37 aB	42,57 ± 2,477 bC
CV%	11,86				
	-----Clorofila <i>b</i> (mg.g ⁻¹ MF)-----				
25%	37,84 ± 2,232 bB	35,93 ± 4,480 bB	31,27 ± 5,894 bB	86,71 ± 11,20 aA	27,92 ± 1,587 bB
50%	42,44 ± 13,62 bB	121,6 ± 14,37 aA	37,17 ± 6,161 bB	30,64 ± 2,883 bB	52,09 ± 12,94 aB
100%	130,2 ± 7,984 aA	26,89 ± 2,401 bC	95,94 ± 13,06 aB	86,94 ± 13,76 aB	20,82 ± 1,654 bC
CV%	19,21				
	-----Razão de Clorofila <i>a/b</i> -----				
25%	1,51 ± 0,084 aB	1,59 ± 0,032 aB	1,50 ± 0,158 aB	1,01 ± 0,070 bC	1,83 ± 0,089 aA
50%	1,41 ± 0,162 aB	0,92 ± 0,033 bC	1,48 ± 0,215 aB	1,76 ± 0,141 aA	1,50 ± 0,293 bB
100%	0,85 ± 0,025 bC	1,75 ± 0,052 aB	1,10 ± 0,068 bC	1,05 ± 0,037 bC	2,04 ± 0,047 aA
CV%	10,80				
	-----Carotenoides (mg.g ⁻¹ MF)-----				
25%	32,76 ± 0,564 aA	33,51 ± 3,537 aA	26,68 ± 0,398 bA	30,24 ± 1,401 aA	29,62 ± 0,334 aA
50%	29,19 ± 2,356 aA	29,88 ± 4,161 aA	27,74 ± 2,609 bA	30,69 ± 1,325 aA	33,11 ± 4,515 aA
100%	23,54 ± 1,608 bB	27,12 ± 1,132 aB	33,68 ± 5,041 aA	24,86 ± 1,796 bB	24,32 ± 1,249 bB
CV%	10,90				

Legenda: As barras representam o erro padrão (\pm). As médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas dentro das concentrações e letras maiúsculas entre as concentrações, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO III

Tabela 3. Parâmetros de crescimento agrônômicos de plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) aos 35 dias de cultivo *in vitro* em sistema de ventilação natural com 4 filtros, submetidas a diferentes pH (5,5, 5,75 e 6,0) e diferentes concentrações de cálcio e magnésio no meio de cultura MS (100%, 200% e 400%). UFLA – Lavras, 2023.

Conc. de Ca e Mg	----- Comprimento da Parte Aérea (cm) -----		
	5,50	5,75	6,0
100%	6,38 ± 1,328 bA	6,04 ± 1,574 bB	5,86 ± 1,459 bB
200%	7,66 ± 1,390 aA	5,94 ± 1,601 bC	6,32 ± 1,748 aB
400%	6,48 ± 0,943 aA	6,63 ± 1,584 aA	5,34 ± 1,111 cB
CV%	2,60		
	----- Comprimento da Maior Raiz (cm) -----		
	5,50	5,75	6,0
100%	2,46 ± 0,747 bB	2,94 ± 0,875 aA	2,50 ± 1,014 aB
200%	2,74 ± 0,694 aA	2,14 ± 0,954 bB	2,28 ± 0,679 bB
400%	0,82 ± 0,312 cA	0,86 ± 0,480 cA	0,88 ± 0,474 cA
CV%	5,67		
	----- Diâmetro do Colmo (mm) -----		
	5,50	5,75	6,0
100%	1,67 ± 0,397 bA	1,65 ± 0,490 aA	1,58 ± 0,376 aB
200%	1,89 ± 0,430 aA	1,71 ± 0,380 aB	1,56 ± 0,427 aC
400%	1,46 ± 0,332 cA	1,49 ± 0,396 bA	1,11 ± 0,226 bB
CV%	3,36		
	----- Massa Seca Parte Aérea (mg) -----		
	5,50	5,75	6,0
100%	62,56 ± 7,307 cA	57,52 ± 9,847 bA	54,92 ± 4,551 aA
200%	88,92 ± 7,027 aA	71,44 ± 5,260 aB	59,44 ± 4,947 aC
400%	75,04 ± 4,551 bA	72,84 ± 4,383 aA	54,92 ± 4,131 aB
CV%	9,92		
	----- Massa Seca Parte Radicular (mg)-----		
	5,50	5,75	6,0
100%	8,32 ± 1,642 bC	27,48 ± 2,395 aA	20,72 ± 2,471 bB
200%	35,66 ± 2,83 aA	26,56 ± 3,738 aB	26,72 ± 1,662 aB
400%	9,65 ± 5,577 bB	21,24 ± 3,161 bA	10,56 ± 2,673 cB
CV%	16,81		
	----- Massa Seca Total (mg)-----		
	5,50	5,75	6,0
100%	70,88 ± 8,617 cB	85,00 ± 9,904 bA	76,00 ± 6,745 aB
200%	124,5 ± 9,050 aA	98,00 ± 4,572 aB	85,56 ± 6,159 aC
400%	84,56 ± 7,856 bA	94,08 ± 8,310 aA	65,48 ± 2,584 bB
CV%	9,00		

Legenda: As barras representam o erro padrão (±). As médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas dentro das concentrações e letras maiúsculas entre as concentrações, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.