

**AMBIENTE DE CULTIVO NA
MICROPROPAGAÇÃO DE *Annona glabra* L.**

CLEILTON VASCONCELOS MOREIRA

2008

CLEILTON VASCONCELOS MOREIRA

**AMBIENTE DE CULTIVO
NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Annona glabra* L.**

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

**Orientador
Renato Paiva, PhD**

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Moreira, Cleilton Vasconcelos.

Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.
/ Cleilton Vasconcelos Moreira. – Lavras : UFLA, 2008.
137 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Renato Paiva.
Bibliografia.

1. *Annona glabra* L. 2. Ecofisiologia. 3. Reguladores de
crescimento. 4. Anatomia vegetal. 5. Luz Natural. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.11504162

CLEILTON VASCONCELOS MOREIRA

**AMBIENTE DE CULTIVO
NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Annona glabra* L.**

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

APROVADA em 29 de agosto de 2008

Prof. Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Pesquisadora Dra. Soami Fernanda Caio Deccetti

FAPESP

Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2008

A Deus,

A minha mãe, Marlene Cardoso Vasconcelos.

Ao meu pai, Américo Santos Moreira.

DEDICO

Aos meus irmãos, Alex Marcos, Cid Vinícius,
Américo Júnior, Luís Américo,
Ocirema e Ocimara,
A minha querida avó Ambrosina (*in memoriam*).

OFEREÇO

*“Diante da complexidade e sutileza do processo de viver bem a vida
a conscientização de que nós somos os principais construtores
deste processo clama por decisões imediatas e ações conseqüentes.
O tempo não perdoa nossa inércia, passa rápido e não volta.
A decisão de agir, de se redirecionar,
de trabalhar para a qualidade de sua própria vida é
absolutamente pessoal, indelegável e inadiável”.*

Fela Moscovici

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior que rege minha vida, por guiar todos meus passos e conquistas, sempre me abençoando.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal e seus laboratórios, em especial ao Setor de Fisiologia Vegetal, pelo apoio e pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha família, meus pais e irmãos, que preenche minha vida de amor, carinho e dedicação. Às adoráveis Edileuza e D. Célia, pelo carinho e admiração.

Ao meu orientador, professor Renato Paiva, pelo apoio e ensinamentos durante estes anos. A professora Angela Maria Soares, pela co-orientação e sugestões para o aprimoramento do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção, sugestões e disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Aos professores, técnicos e funcionários do setor de Fisiologia Vegetal, pelo apoio e pela agradável convivência.

Aos colegas do mestrado, doutorado e iniciação científica do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade, pelo apoio e momentos de descontração durante todo o período do curso.

Aos amigos Bruno Dias, Euzi e Évio, pela recepção ao chegar a Lavras, pelo carinho e amizade.

Ao meu amigo Fabrício Amorim, pelo apoio nos abstracts e pela fiel amizade. A Jucilayne, Waldete, Vitória e Elma, pelo convívio familiar, pela amizade sincera, pelas inúmeras horas de alegria. Obrigado, por todos os momentos.

Aos meus tios, primos e avós. A Joselito, Cremilda, Valnice, Eloina, Tio Edvaldo, Elisabete, sempre presentes como amigos da família e exemplos de luta e perseverança, obrigado por sempre me desejarem sorte.

A todos os amigos de Salvador e da Escola de Agronomia da UFBA, em Cruz das Almas, BA. Aos agradáveis amigos do Departamento de Ciência do Solo da UFLA. Às novas amizades construídas em Lavras, Juliana, Carol, Luciano, Tina, Diogo, Marcelo, Jessé, Daiane, Fernanda, Rosana. Aos amigos da estatística Edcarlos e Altemir, registro meus agradecimentos pelos agradáveis momentos de alegria.

A todos que, de uma forma ou de outra, participaram desta etapa valiosa da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

CLEILTON VASCONCELOS MOREIRA, filho de Américo Santos Moreira e Marlene Cardoso Vasconcelos, nasceu em 29 de dezembro de 1978, na cidade de Salvador, estado da Bahia. Concluiu o ensino médio no Centro de Estudo Caxiense. Em agosto de 2000, iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica, na Universidade Federal da Bahia – Escola de Agronomia, concluindo-o em agosto de 2006. Durante este período, foi estagiário na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, atuante nas áreas Virologia Vegetal, Biotecnologia, Citogenética e Fisiologia Vegetal. Desenvolveu projetos de pesquisa em propagação *in vitro* de plantas sob orientação de Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo e pesquisas em Fisiologia Vegetal sob orientação de Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves, como bolsista de iniciação científica do CNPq. Em agosto de 2006, iniciou o mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em agosto de 2008.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| CAPÍTULO I: Introdução Geral | 01 |
| 1 Introdução..... | 02 |
| 2 Referencial Teórico..... | 05 |
| 2.1 Descrição botânica e aspectos fitoquímicos..... | 05 |
| 2.2 Propagação <i>in vitro</i> de Anonáceas..... | 08 |
| 2.3 Ambiente de cultivo..... | 11 |
| 2.4 Controle das condições de cultivo | 14 |
| 2.5 Capacidade fotossintética de plantas micropropagadas..... | 16 |
| 3 Referências Bibliográficas | 19 |
| CAPÍTULO II: Tipo de explante e efeito da cinetina na indução de brotações <i>in vitro</i> em <i>Annona glabra</i> L. | 31 |
| 1 Resumo..... | 32 |
| 2 Abstract..... | 33 |
| 3 Introdução..... | 34 |
| 4 Material e Métodos..... | 36 |
| 4.1 Material botânico..... | 36 |
| 4.2 Condições experimentais..... | 37 |
| 4.3 Delineamento estatístico..... | 37 |
| 4.4 Variáveis avaliadas..... | 38 |
| 5 Resultados e Discussão..... | 38 |
| 6 Conclusões..... | 53 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO III: Ambiente de cultivo <i>in vitro</i> e tipos de vedações na qualidade de mudas de <i>Annona glabra</i> L. | 57 |
| 1 Resumo..... | 58 |
| 2 Abstract..... | 59 |
| 3 Introdução..... | 60 |
| 4 Material e Métodos..... | 61 |
| 4.1 Local e condução do estudo..... | 61 |
| 4.2 Material botânico..... | 61 |
| 4.3 Condições experimentais..... | 62 |
| 4.4 Ambiente de cultivo..... | 63 |
| 4.5 Variáveis avaliadas..... | 64 |
| 4.5.1 Características fitotécnicas..... | 65 |
| 4.5.2 Características bioquímicas..... | 65 |
| 4.5.3 Características anatômicas..... | 66 |
| 4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 67 |
| 4.7 Delineamento experimental e análise estatística..... | 67 |
| 4.7.1 Modelos generalizados e Modelos de Poisson inflacionados de zeros..... | 67 |
| 5 Resultados e Discussão..... | 69 |
| 5.1 Características fitotécnicas..... | 69 |
| 5.2 Características bioquímicas..... | 82 |
| 5.3 Características anatômicas..... | 85 |
| 5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 95 |
| 5.5 Aclimatização das plantas de <i>Annona glabra</i> L..... | 98 |
| 6 Conclusões..... | 102 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 103 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO IV: Evolução de O₂ fotossintético, Teores de clorofila e Perda de água de plantas de <i>Annona glabra</i> L. sob diferentes ambientes de cultivo..... | 109 |
| 1 Resumo..... | 110 |
| 2 Abstract..... | 111 |
| 3 Introdução..... | 112 |
| 4 Material e Métodos..... | 114 |
| 4.1 Material botânico e condições experimentais..... | 114 |
| 4.2 Variáveis avaliadas..... | 116 |
| 4.2.1 Evolução de O ₂ fotossintético..... | 116 |
| 4.2.2 Teores de clorofila..... | 117 |
| 4.2.3 Perda de água do tecido foliar..... | 117 |
| 4.3 Delineamento experimental e análise estatística..... | 118 |
| 5 Resultados e Discussão..... | 120 |
| 5.1 Evolução de O ₂ fotossintético..... | 120 |
| 5.2 Teores de clorofila..... | 125 |
| 5.3 Perda de água do tecido foliar..... | 129 |
| 6 Conclusões..... | 133 |
| 7 Referências Bibliográficas..... | 133 |

RESUMO

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. **Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.** 2008. 137 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. *

A *Annona glabra* L. tem despertado grande interesse nos últimos anos no Brasil, por se tratar de uma espécie com capacidade adaptativa a diversos ambientes e pertencente ao rol das frutas com propriedades medicinais de substâncias isoladas de suas folhas, frutos e sementes. As iniciativas para explorar o potencial dessa espécie ainda são incipientes, sobretudo, pela dificuldade para induzir multibrotações nos explantes e pela escassez de informações sobre os sistemas de cultivo. Dentre os fatores que podem afetar as condições do ambiente de cultivo, destaca-se o tipo de vedação. Diferentes métodos *in vitro* têm sido empregados para a investigação dos efeitos diretos dos sistemas de vedações nas plantas. Esse trabalho teve por objetivo estudar: 1) os efeitos do ambiente de cultivo sobre a fisiologia e a morfologia das plantas micropropagadas de *A. glabra* L., verificando o comportamento dos explantes e/ou plantas em ambiente de cultivo *in vitro*, bem como a influência de tipos de vedações dos frascos e, 2) as características fotossintéticas de plantas micropropagadas. Foram testados dois diferentes fatores: ambiente (Sala de crescimento convencional e Casa de vegetação) e sistemas de vedação do recipiente de cultivo [tampas plásticas transparentes e selamento com parafilme, que restringem as trocas de gases entre o recipiente e a atmosfera externa (sistema convencional); e tampas plásticas modificadas, contendo um par de orifícios (10 mm de diâmetro) com um par de filtros de membranas permeáveis a gases]. A luz natural sob sistema de vedação com a tampa modificada resultou em aumento no número de brotos, alterações nos teores de clorofila, no potencial fotossintético e nas características morfofisiológicas de plantas da *A. glabra* L.. As plantas avaliadas apresentaram adaptabilidade às condições de cultivo e características fotossintéticas apropriadas para a propagação *in vitro*. A influência do ambiente de cultivo sobre a fisiologia e anatomia da espécie implicou na diminuição das necessidades de cuidados durante a transferência para condições de casa de vegetação. O processo de aclimatização possibilitou a sobrevivência das plântulas micropropagadas às condições *ex vitro*.

* Comitê de orientação: Renato Paiva, PhD – UFLA. (Orientador), Dr^a. Angela Maria Soares – UFLA. (Co-orientadora).

ABSTRACT

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. **Culture environment in the micropropagation of *Annona glabra* L.** 2008. 137 p. Dissertation (M.Sc. in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. *

The *Annona glabra* L. has aroused a great interest in Brazil in recent years, since it is a species with the capacity to adapt to several environments and it belongs to the fruit group which has medicinal properties of substances isolated from leaves, fruit and seeds. The initiatives to explore the potential of this species are incipient still, especially due to the difficulty to induce multi-shooting on explants, besides the shortage of information about the culture systems. Among the factors which can affect the conditions of the culture environment, the type of seal stands out. Different *in vitro* methods have been used to investigate the direct effects on the closure system. The objectives of this work were to study: 1) the effects of the culture environment on the physiology and morphology of micropropagated *Annonas glabra* L. plants, verifying the explants and/or plant behavior on *in vitro* culture environment, as well as the influences of different vessel seals and 2) the photosynthetic characteristics of micropropagated plants. Two different factors were tested: environment (conventional growth room and greenhouse) and closure systems of the culture container [transparent plastic caps and seal with parafilm, which restrict the exchange of gases between the container and the outside atmosphere (conventional system) and modified plastic caps, containing a pair of orifices (10 mm diameter) with a membrane filter pair permeable to gases]. The natural light, under the closure system with a modified cap, result in an increase of the amount of shoots, alterations in the chlorophyll content, photosynthetic potentials and morphological characteristics of plants from *Annona glabra* L. The evaluated plants present adaptability to the culture conditions and photosynthetic characteristics to the *in vitro* propagation. The culture environment influence on the species physiology and anatomy, implied in the reduction of the necessity of cares during the transference of these plants to greenhouse condition. The process of acclimatization allowed the survival of micropropagated plants to *ex vitro* conditions.

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Adviser), – UFLA, Dr. Angela Maria Soares (Co-Adviser). – UFLA.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A família *Annonaceae* é uma das famílias de plantas tropicais com potencial fitofarmacológico e frutífero, além de grande potencial de exploração, tanto para o mercado interno como para o externo. Na medicina popular, tem sido utilizada principalmente como vermífugo, emoliente, antiinflamatório e anti-reumático. Investigações fitoquímicas e farmacológicas sobre membros desta família vêm despertando o interesse científico.

A *Annona glabra* L. é uma espécie que se destaca devido às qualidades do fruto, a características agronômicas desejáveis e por ser usada como porta-enxerto para outras espécies do mesmo táxon de importância social e econômica, muitas vezes de multiplicação inviável economicamente, pelas vias naturais de propagação.

Sabe-se que muitas espécies de anonáceas apresentam dificuldades de multiplicação pelos métodos tradicionais e suas sementes têm baixa taxa de germinação com características de irregularidade. A propagação pode ser feita via sementes (sexuada), mas resulta em grande heterogeneidade de plantas. Os porta-enxertos da espécie são altamente heterogêneos no vigor e na resistência a doenças, o que torna a produção de mudas variáveis.

Como as informações sobre essas espécies são restritas e limitadas, tornam-se necessárias novas pesquisas a respeito destas frutíferas. No Brasil, poucas são as pesquisas realizadas com o cultivo *in vitro* da *Annona glabra* L., embora os resultados observados por Deccetti et al. (2005), Oliveira (2006) e Santana et al. (2008) confirmem a possibilidade da propagação *in vitro* dessa espécie.

Atualmente, estudos vêm sendo realizados, buscando encontrar a melhor alternativa para a propagação comercial para *Annona glabra* L. A propagação *in vitro*, ou micropropagação, é uma técnica bastante utilizada para inúmeras

espécies de plantas, para diversos fins, por possibilitar a aquisição de material vegetal livre de fitopatógenos e a obtenção de maior quantidade de mudas em curto período de tempo, comparada à propagação vegetativa tradicional.

Entre outras vantagens da micropropagação, destacam-se: o número de plantas obtidas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; a reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente com fidelidade durante a multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos.

O desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica (produção de micropropágulos sem adição de sacarose no meio de cultura e sob condições ambiente que favoreçam a fotossíntese) (Kubota & Tadokoro, 1999), com o uso de luz natural, surge com possibilidades potenciais de aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução dos custos, viabilizando-a comercialmente.

A micropropagação foto-autotrófica, associada à luz natural, em relação ao método convencional de micropropagação, inclui vantagens, como aumento do crescimento das plantas; redução do risco de contaminação microbiana, em virtude da remoção da sacarose do meio de cultura; melhoria das características fisiológicas da planta, devido ao fato de as condições ambientais de cultivo serem mais naturais; redução do estresse da planta durante a aclimatização, aumentando a percentagem de sobrevivência das mudas (Hempel, 1994; Zobayed et al., 2000; Zobayed et al., 2001; Afreen et al., 2002; Kozai et al., 2003); eliminação dos custos com iluminação e redução dos custos com reparos e manutenção e, ainda, possibilidade de utilização de instalações simplificadas, reduzindo os custos das construções (Kodym & Zapata-Arias, 1999).

Diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar os efeitos do ambiente de cultivo sobre a fisiologia e a morfologia das plantas

micropropagadas. Esses estudos ressaltam a necessidade de aprimoramento das técnicas utilizadas desde os procedimentos de vedação dos frascos até a aclimatização da planta, a fim de garantir a qualidade e a integridade das mudas (Kozai et al., 1997; Bag et al., 2000). Entretanto, poucos estudos têm acompanhado o comportamento de explantes ou plantas durante as fases do cultivo *in vitro* e após a transferência para o campo. O conhecimento existente aponta que a manipulação das condições do ambiente no cultivo *in vitro* pode maximizar o processo regenerativo, garantindo a alta eficiência desse sistema de cultivo e a integridade final da muda.

De acordo com diversos autores, entre estes Hoffmann (1999) e Kanechi et al. (1998), a modificação ainda *in vitro* de algumas condições físicas, como aumento na disponibilidade de CO₂ e na intensidade luminosa, redução na umidade relativa no recipiente de cultivo aliada à redução da concentração de sacarose no meio de cultura, pode favorecer a sobrevivência e o desenvolvimento após a transferência. Em adição, grande parte dos estudos que envolvem a fotossíntese, tem sido realizada, durante os estágios de enraizamento e aclimatização e com espécies herbáceas. Nesse contexto faltam informações sobre trocas gasosas durante o estágio de multiplicação e enraizamento, principalmente em espécies lenhosas.

Portanto, a necessidade de aumentar a eficiência das técnicas de micropropagação para viabilizar a sua utilização, em face dos diversos problemas encontrados atualmente nos sistemas de propagação *in vitro* e em virtude das dificuldades para a multiplicação e a obtenção de mudas por vias convencionais da espécie *A. glabra* L., torna necessário o estudo de aplicações mais eficientes para esses aspectos relacionados à micropropagação fotoautotrófica e à utilização da luz natural.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de caracterizar o ambiente de cultivo *in vitro* e desenvolver conhecimento em

relação aos efeitos do ambiente de cultivo sobre características morfofisiológicas de plantas micropropagadas da *A. glabra* L. para aumentar a eficiência do sistema no protocolo estabelecido; determinar o explante mais adequado na inoculação de diferentes números de gemas axilares na indução de multibrotações; otimizar a qualidade das plantas e analisar aspectos anatômicos durante o enraizamento *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição botânica e aspectos fitoquímicos

A *Annona glabra* L. (Annonaceae), conhecida no Brasil como araticum-do-brejo, araticum-bravo ou araticunzeiro, é uma árvore de pequeno porte encontrada em todo território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras. A espécie se destaca por produzir frutos apreciados, tanto para a fauna nativa como para a alimentação humana. A família Annonaceae, de distribuição pantropical, caracterizada por árvores e arbustos, tem cerca de 130 gêneros e, aproximadamente, 2.300 espécies identificadas. Segundo Santana (2003), no Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são cultivadas comercialmente, sendo as mais importantes a graviola, a fruta-do-conde, a fruta-da-condessa, a atemóia e a cherimóia, por ordem decrescente de área ocupada.

O araticunzeiro-do-brejo é uma espécie nativa da América Tropical, com ampla distribuição geográfica. No Brasil, ocorre, espontaneamente, desde a Amazônia até o estado de Santa Catarina (Braga, 1976). Esta espécie cresce naturalmente em todo continente americano, além do oeste africano, em regiões alagadas, ao longo de rios, margens de lagos e em regiões salobras próximas ao litoral, seu crescimento ocorre em habitats que estão periódica ou permanentemente inundados (Croat, 1978).

No Brasil, os frutos caem entre os meses de março e abril, permanecendo viáveis por alguns meses em água doce ou salobra. Seus frutos flutuam e podem

sobreviver por períodos prolongados quando imersos em água, salobra ou não. Para que ocorra a germinação, a semente necessita de ambiente alagadiço ou úmido. Uma vez estabelecida a germinação, a planta pode sobreviver em altos níveis de salinidade, possuindo, na fase adulta, considerável tolerância a ambientes salinos (Protection, 2004).

Oliveira (2006) descreve a *A. glabra* L. como uma planta de porte mediano, alcançando entre 3 e 8 m de altura e caule com 10 a 30 cm, com casca grossa e aspecto avermelhado. Apresenta copa em forma de “umbrela”, com folhas lustrosas, simples e alternas, com folhas lustrosas, com 7 a 17 cm de comprimento e 3 a 8 cm de largura.

As folhas possuem pecíolo cilíndrico, lâmina oblonga, cartácea, base obtusa, ápice acuminado, margem plana, com 9 a 13 pares de nervuras secundárias (Figura 1). A maturidade reprodutiva é atingida após, aproximadamente, dois anos, quando se iniciam a floração e a produção de frutos.

Apresenta flores muito atrativas, geralmente com 2 a 3 cm de diâmetro, variando de amarelo pálido a creme-amarelado, com três pétalas maiores externas encouraçadas e três pétalas pequenas internas (Protection, 2004).

O fruto é sincarpo carnososo, ovóide globoso, de coloração naturalmente verde-brilhante, com cerca de 5 a 15 cm de diâmetro, o qual, após a queda, torna-se amarelado, escurecendo em seguida. Contém pouco mais de 100 sementes, de aspecto marrom-escuro, com aproximadamente um centímetro de comprimento, envoltas em uma polpa creme de forte odor e bastante saborosa.

De acordo com Siebra (2007), vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada, nas mais variadas partes da planta. Os principais grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (Chen et al., 2000), folhas e frutos (Chang et al.,

1998) são os alcalóides, as acetogeninas e os diterpenos (Chen et al., 2004; Oliveira et al., 2002).

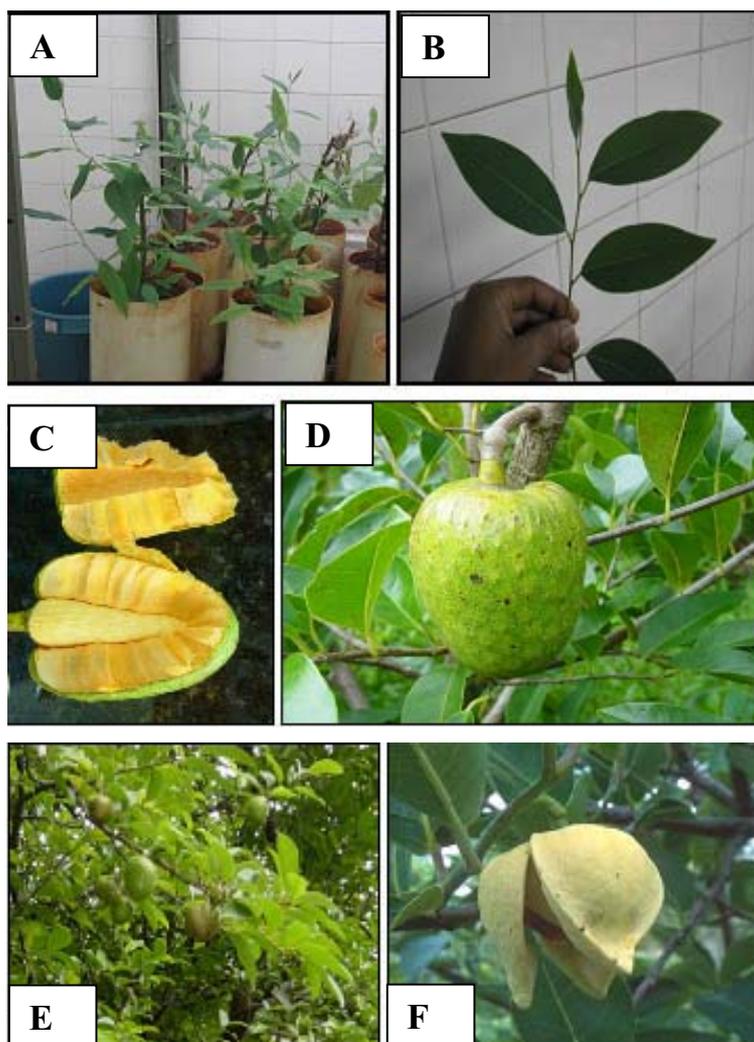


FIGURA 1 Aspecto visual da *Annona glabra* L. (A) Planta em sala de crescimento; (B) detalhe das folhas alternadas; (C) e (D) fruto; (E) planta adulta e distribuição dos frutos na planta; (F) flor. UFLA, Lavas, MG, 2008 (C, D, E, F). Fonte: Atlas of Florida Vascular Plant, 1983, - USF/EUA.

Dentre os compostos isolados da espécie, o ácido caurenóico, ou ácido caur-ent-16-en-19-oico, é um dos diterpenos mais estudados, para o qual já foram descritas diversas atividades biológicas que vão desde inibidor da replicação do vírus HIV em linfócitos (Chang et al., 1998), agente citotóxico (Chavez et al., 1997; Costa-Lotufo et al., 2002; Zhang et al., 2004), trypanosomicida (Alves et al., 1995; Vieira et al., 2002), larvicida (Slimestrad et al., 1995), antimicrobiano (Padmaja et al., 1995; Velikova et al., 2000), vermífugo, esporicida (Padmaja et al., 1995), analgésico (Block et al., 1998), contraceptivo (Page et al., 1992), relaxante da musculatura lisa vascular aórtica de ratos (Tirapelli et al., 2004) até como agente antiinflamatório (Paiva et al., 2002).

Segundo Chih-Chuang et al. (2005), as acetogeninas representam o grupo de substâncias mais investigadas até o momento, tendo destaque numa classe original de metabólitos secundários de plantas da família *Annonaceae*. Na China, por exemplo, a *A. glabra* é amplamente cultivada e utilizada como inseticida e parasiticida (Chen et al., 2004), as annoglacinas A e B (Xiao-Xi et al., 1999), ambos com elevado potencial citotóxico contra células tumorais e o annonacion que atua como potente inibidor da cadeia respiratória mitocondrial (Gallardo et al., 1998).

2.2 Propagação *in vitro* de Anonáceas

A micropropagação é uma alternativa de reprodução *in vitro* que vem contribuindo significativamente para a produção em cultivos comerciais de anonáceas. Para Oliveira (2006), o cultivo *in vitro* representa uma alternativa viável para a produção em larga escala de mudas de anonáceas, superando as dificuldades naturais para a sua propagação. A propagação *in vitro* tem sido utilizada para diversas espécies *Annonaceae*, resultando em uma população numerosa de plantas homogêneas com características desejáveis. Entretanto, a

multiplicação *in vitro* e em larga escala de anonáceas ainda tem se confrontado com algumas limitações. A contaminação endógena dos explantes (Santana et al., 2003), a alta concentração de compostos fenólicos em seus tecidos e, principalmente, a abscisão foliar precoce (Lemos, 2000), ocasionada pelo acúmulo de etileno nos tecidos confinados ao ambiente *in vitro*, prejudicando o vigor e o crescimento das brotações, são os principais exemplos.

Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos visando à micropropagação de anonáceas, a exemplo dos que foram conduzidos com *A. muricata* (Lemos & Blake, 1996a; Lemos & Baker, 1998), *A. squamosa* (Lemos & Blake, 1996b; Nagori & Purohit, 2004; Zobayed et al., 2002), *A. cherimola* (Encina et al., 1994), atemoia (Bettioli Neto et al., 2006), *A. glabra* (Deccetti et al., 2005; Santana et al., 2008; Oliveira, 2006), *A. cauliflora* Mart. (Santana, 2003), *A. coriaceae* Mart. (Santana, 2003) *A. bahiensis* St. Hill. (Santana, 2003) e *Rollinia silvatica* St. Hill. (Santana, 2003).

Têm-se empregado a micropropagação como técnica opcional para a multiplicação de anonáceas, havendo, na literatura, um considerável número de informações acerca dos fatores que afetam sua morfogênese *in vitro* (Rasai et al., 1995). Para tanto, tem-se utilizado basicamente adicionar uma fonte de citocinina ao meio de cultivo. O benzilaminopurina (BAP) e a cinetina, isoladamente ou em combinação com outros reguladores de crescimento, têm sido empregados em concentrações entre 0,2 a 2,0 mg L⁻¹, na maioria dos sistemas de micropropagação, a exemplo dos trabalhos realizados com atemoia e *A. cherimola* Mill. (Encina et al., 1994), *A. muricata* L. (Lemos & Blake, 1996b) e *A. squamosa* L. (Nagori & Purohit, 2004).

Normalmente, na micropropagação, os reguladores de crescimento constituem a primeira etapa a ser abordada, na qual o modo de interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado no meio de cultura (Coenen & Lomax, 1997). A adição de

reguladores de crescimento em meios de cultura tem o objetivo de suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz.

Lemos & Blake (1996b) estudaram a ação do etileno sobre a abscisão foliar precoce em *A. squamosa* L. cultivados *in vitro*, mediante a utilização de compostos absorventes, inibidores da síntese e da ação do etileno. Embora os resultados obtidos tenham mostrado redução significativa da abscisão foliar, principalmente quando foram usados inibidores da ação do etileno, os efeitos produzidos não foram duráveis. Contudo, tem-se inferido que a senescência é um processo regulado pelo balanço entre etileno e citocinina nos tecidos.

A concentração de citocinina diminui abruptamente em órgãos maduros, induzindo o início da senescência. Quando se utilizam citocininas em folhas isoladas de muitas espécies, essas promovem o retardo da senescência, como observado em *Alstroemeria* (Ferrante et al., 2002) e *Brassica oleracea* L. (Downs et al., 1997). Segundo Oliveira (2006), a adição de citocinina ao meio de cultura tem reflexos positivos sobre a retenção da área foliar nas brotações, durante as fases de multiplicação e enraizamento, em virtude da menor taxa de abscisão foliar. Entretanto, Genkov et al. (1997) afirmam que a competência para retardar a senescência foliar varia amplamente entre os diversos tipos de citocininas.

De acordo com Zabayed et al. (2002), o cultivo fotoautotrófico da *Annona squamosa* L. e da *Annona muricata* L., sob alta densidade do fluxo de fótons (DFFFA) e aumento no intercâmbio de gases entre o recipiente de cultivo e a atmosfera externa, principalmente sob ventilação forçada (atmosfera externa enriquecida com CO₂), aumenta a regeneração e o crescimento das brotações, como resultado do aumento do número de folhas, da área foliar total e da capacidade fotossintética, e reduz a abscisão foliar, desordem fisiológica freqüentemente observada nessas espécies, em função do menor acúmulo de

etileno no recipiente, tornando as brotações mais adequadas para a fase posterior de enraizamento.

Poucos estudos foram conduzidos com as espécies de *Annonas* e o conhecimento da influência que o ambiente de cultivo, principalmente durante o enraizamento, exerce sobre as características morfofisiológicas das plantas de *A. glabra* L. micropropagadas pode otimizar o crescimento *in vitro* da espécie e favorecer o seu desenvolvimento após a transferência para o ambiente natural. Isso contribuiria efetivamente para viabilizar a utilização dessas técnicas para propagação em grande escala da *A. glabra* L. e de outras espécies do gênero.

2.3 Ambiente de cultivo

As vedações convencionais utilizadas nos recipientes, sob as quais as plantas crescem, para prevenir a contaminação por microrganismos, retardar a dessecação dos tecidos e a evaporação da água do meio de cultura, podem restringir a troca gasosa entre o recipiente e a atmosfera externa. A consequência desse confinamento são condições ambientais peculiares, caracterizadas por alta umidade relativa, baixa disponibilidade de CO₂ e grande flutuação diurna na sua concentração, além de acúmulo de etileno e de outras substâncias tóxicas (Zobayed et al., 1999).

As adaptações induzidas às plântulas cultivadas *in vitro*, quando levadas ao ambiente *ex vitro*, são denominadas comumente de aclimatização. Esse processo consiste de modificações morfoanatômico-fisiológicas necessárias às plantas, para que possam sobreviver em um novo ambiente (Carvalho et al., 1999).

O aumento, a eliminação e ou a redução da concentração de carboidratos no meio de cultivo podem ser determinantes no sucesso da aclimatização (Lim et al., 1992; Leifert et al., 1995; Calvete, 1998; Leite et al., 2000).

Explantos cultivados sob regime heterotrófico originam plantas com elevado conteúdo de água, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (Kubota & Kozai, 1992) ou com desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente (Arigita et al., 2002), resultando na perda de mudas e de mão-de-obra.

Sabe-se que o sucesso no pegamento de mudas de várias espécies é dependente da razão entre a biomassa de raízes e da parte aérea. Portanto, o tempo de cultivo *in vitro* deve influenciar o pegamento *ex vitro* das mudas (Nicoloso et al., 2001).

Espaço limitado, baixa irradiação, alta umidade relativa do ar no interior dos frascos e trocas gasosas ineficientes são alguns fatores que caracterizam o ambiente de cultivo *in vitro*. Este meio propicia alta taxa de multiplicação, mas as plantas produzidas diferem anatômica, morfológica e fisiologicamente daquelas desenvolvidas em casa de vegetação e em campo.

Waldenmaier (1994) relata que a aclimatização com baixa umidade relativa do ar resulta em aumento tanto na densidade estomática como na diferenciação da parede celular de células do parênquima paliçádico e lacunoso em folhas de azaléia.

Segundo Pierik (1990), plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam células paliçádicas menores e em menor quantidade. Durante o crescimento *in vitro*, plantas desenvolvem-se sob condições controladas, possuindo baixa ou nenhuma atividade fotossintética, e, quando sofrem o processo da aclimatização, ficam sujeitas a um forte estresse ambiental, podendo morrer. Dessa forma, o processo compreendido entre a transferência das plântulas produzidas *in vitro* e o total estabelecimento em casa de vegetação é complexo e um fator limitante para a micropropagação de algumas espécies (Huylenbroeck & Debergh, 1996; Ross-Karstens et al., 1998).

A maioria das espécies de plantas cultivadas *in vitro* tem, geralmente, a cutícula pouco desenvolvida, devido à alta umidade relativa (90% a 100%) que ocorre *in vitro*. As folhas das plantas *in vitro* são, geralmente, finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas e, por isso, mal adaptadas às condições que irão encontrar na aclimatização (Pierik, 1990). Conhecendo as alterações morfológicas de plantas desenvolvidas *in vitro*, pode-se manipular o ambiente durante a aclimatização *ex vitro*.

A iluminação é responsável por, aproximadamente, 65% do total de energia elétrica utilizada no laboratório de micropropagação, enquanto que 25% são gastos com refrigeração e o restante (10%), com esterilização, aquecimento, filtragem, entre outros (Kozai et al., 2003). Do ponto de vista econômico, a otimização de um sistema comercial de micropropagação requer diminuição do gasto com energia elétrica, que é um dos principais componentes do custo de uma planta micropropagada (Grattapaglia & Machado, 1998).

A utilização de luz natural apresenta várias vantagens, como eliminação dos gastos com luz artificial, redução dos custos de manutenção, as instalações são simplificadas diminuindo os custos com construção e, durante a aclimatização, o estresse sofrido pela planta é menos intenso. No entanto, a disponibilidade de luz varia com a intensidade do sol, que depende das condições climáticas, da hora do dia e da época do ano. Em regiões tropicais e subtropicais, os efeitos das mudanças climáticas são pequenos, entretanto, em regiões de clima temperado, eles podem ser aumentados.

As maiores taxas de multiplicação de bananeiras micropropagadas sob luz natural foram obtidas durante o verão. Neste mesmo trabalho, no inverno, com a luminosidade menos favorável, a taxa de micropropagação decresceu. A decisão pela utilização ou não da luz natural depende da espécie a ser micropropagada, da técnica *in vitro* utilizada (heterotrófica, fotomixotrófica ou

fotoautotrófica) e das condições climáticas do local (Kodym & Zapata-Arias, 1999, 2001).

2.4 Controle das condições de cultivo

Tradicionalmente, tem sido considerado que os explantes e plantas *in vitro* não possuem habilidade fotossintética para promover um balanço positivo de carbono e requerem a suplementação do meio de cultura com uma fonte artificial de carbono, como sacarose, para crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico, durante os estágios de multiplicação e enraizamento (Niu et al., 1998). Entretanto, inúmeros estudos têm provado que as plantas *in vitro* possuem alta capacidade fotossintética e fotossintetizam de maneira satisfatória, reduzindo ou eliminando o requerimento de sacarose ou de qualquer outro açúcar no meio de cultura para o seu crescimento, se o ambiente de cultivo for controlado para que as condições sejam mais semelhantes à de casa de vegetação ou do campo, como em *Rehmannia glutinosa* (Cui et al., 2000); *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Alexandre, 2002; Couceiro, 2002); *Vitis vinifera* cv. *Nebbiolo* (Gribaudo et al., 2003) e *Samanea saman* (Mosaleeyanon et al., 2004).

A atividade fotossintética durante a aclimatização também pode ser limitada pela disponibilidade de CO₂, visto que as técnicas utilizadas para a manutenção de alta umidade relativa após a transferência, impedindo a excessiva perda de água das plantas, constituem outro sistema fechado e, possivelmente, repetem a condição sub-ótima quanto à concentração de CO₂. Embora seja certo que a alteração do ambiente de cultivo possa favorecer a capacidade fotoautotrófica, a dificuldade tem sido em determinar o grau de fotoautotrofia atingido pela planta em uma determinada condição de cultivo, principalmente em função das metodologias disponíveis para esses tipos de estudo (Serret et al., 1997). Além disso, uma única característica da planta ou um único fator

ambiental não podem expressar um processo tão complexo como a aquisição da fotoautotrofia.

Dessa maneira, uma modificação nesse ambiente de cultivo, que condicione as plantas a apresentarem maior competência fotoautotrófica, seja por meio da utilização da luz natural em condições satisfatórias, da redução ou da eliminação de fontes exógenas de carbono, do uso de frascos de cultivo que permitam uma acentuada troca gasosa sem facilitar a contaminação microbiológica e da adição de agentes osmóticos no meio nutriente para que a planta desenvolva um eficiente sistema de ajuste osmótico, pode proporcionar valiosas vantagens no cultivo *in vitro*.

O aumento da intensidade luminosa tem sido conseguido substituindo a luz artificial pela luz natural, com a manutenção das plantas em casa de vegetação, ou por pelo uso de janelas externas na sala de crescimento (Kodym & Zapata-Arias, 1999) ou de clarabóias no telhado (Kodym et al., 2001). Na micropropagação de bananeiras, a maior taxa de multiplicação foi obtida em casa de vegetação e em sala de crescimento com luz natural e, por último, em sala de crescimento convencional (Kodym & Zapata-Arias, 1999; Kodym & Zapata-Arias, 2001).

Com o aumento das trocas gasosas no recipiente de cultivo, a concentração de etileno também é reduzida. O acúmulo de etileno tem um efeito adverso no desenvolvimento das plantas, afetando a diferenciação, o desenvolvimento, a morfologia e o crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar, o comprimento dos brotos (Jackson et al., 1991), inibindo a regeneração de novos brotos (Biddington, 1992) e causando necrose apical nas plantas.

2.5 Capacidade fotossintética de plantas micropropagadas

Muitos explantes ou plantas *in vitro* possuem a habilidade de crescer de forma fotoautotrófica (Kozai, 1991). Quando plantas são cultivadas *in vitro*, em meio de cultura sem açúcar, surge a necessidade de se aumentar a intensidade luminosa e a difusão de CO₂ e de reduzir da umidade (vapor da água) em volta da planta (Kozai & Nguyen, 2003), para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (Aitken-christie et al., 1995; Kitaya et al., 1997).

Plantas que crescem sob condições especiais de redução das trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de açúcar como fonte de energia podem sofrer com inibição da fotossíntese, presença de estômatos anormais, maior acúmulo de reservas ou biomassa, dificultando a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (Sciutti & Morini, 1993; Desjardins, 1995; Pospísilova et al., 1999).

Sob condições heterotróficas, o acúmulo de reservas pode favorecer a aclimatização, considerando que as plantas formadas *in vitro* não possuem habilidade fotossintética para promover um balanço positivo de carbono durante a aclimatização. Mais recentemente, estudos têm revelado que a baixa taxa fotossintética em plântulas micropropagadas deve-se a baixas concentrações de CO₂ presentes sob o fotoperíodo comumente utilizado (16h.).

Kozai et al. (1990) verificaram que plântulas micropropagadas de *Cymbidium* sp. apresentam maiores taxas fotossintéticas líquidas e, conseqüentemente, maiores crescimentos quando os frascos são enriquecidos com CO₂ e cultivados sob intensidade luminosa alta. Esses mesmos autores concluíram que o fornecimento de condições favoráveis à fotossíntese resulta em um crescimento autotrófico para o cultivo *in vitro*.

A micropropagação fotoautotrófica de plantas, além de aumentar o crescimento dos explantes *in vitro*, também minimiza os riscos de contaminação

microbiana, reduz os custos de produção, melhora as características fisiológicas da planta e facilita sua aclimatização às condições *ex vitro* (Afreen et al., 2002).

Diferentes procedimentos têm sido testados para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção. Entre eles, destacam-se a eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultura (Kozai & Kubota, 2001; Arigita et al., 2002); o aumento da concentração de CO₂ e a redução da umidade relativa e da concentração de etileno do frasco de cultivo (Kanechi et al., 1998; Kozai & Kubota, 2001; Arigita et al., 2002); a substituição do ágar por materiais de suporte fibrosos ou porosos, que mostram ser benéficos ao enraizamento sob condições de alta concentração de CO₂ e alta luminosidade (Kozai & Kubota, 2001) e o aumento da intensidade luminosa (Kanechi et al., 1998; Kodym & Zapata-Arias, 1999; Kozai & Kubota, 2001; Kodym & Zapata-Arias, 2001; Kodym et al., 2001).

Em virtude das condições ambientais em que se desenvolvem, plântulas ou brotações cultivadas *in vitro* são, anatômica e fisiologicamente, diferentes de mudas produzidas sob condições de casa de vegetação ou no campo, inclusive quanto a taxas e aparato fotossintético (Cassels, 1989; Mohammed & Vidaver, 1990; Roberts & Smith, 1990).

No caso da videira, as técnicas de cultura *in vitro* têm demonstrado grande potencial para a propagação de plantas (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitec, 1991; Torregrosa & Bouquet, 1995; Silva et al., 1997; Biasi et al., 1998). Além da propagação, é possível avaliar e caracterizar genótipos tomando por base parâmetros morfofisiológicos do crescimento, como utilização do CO₂ e produção de biomassa (Galzy & Compan, 1992; Silva et al., 1996; Fila et al., 1998; Moreira, 2000), teor de clorofila (Restagno et al., 1995; Amâncio et al., 1999; Carvalho et al., 2001), características estomáticas (Silva & Doazan, 1995; Silva et al., 1996; Moreira, 2000), transpiração e potencial hídrico das folhas

(Fila et al., 1998; Iacono & Martinelli, 1998), que são parâmetros fundamentais para a micropropagação e aclimatização de plantas.

O aumento da concentração de CO₂ e, simultaneamente, a redução da umidade relativa e da concentração de etileno no interior do frasco de cultivo, têm sido conseguidos, utilizando-se tampas de fechamento mais permeáveis (filtros permeáveis a gases ou chumaços de algodão, por exemplo) (Kozai & Nguyen, 2003; Santana et al., 2008), com ou sem o enriquecimento com CO₂ (Kozai & Nguyen, 2003). O acréscimo da concentração de CO₂ promove o aumento da fotossíntese, em função de seu efeito direto sobre a enzima rubisco (ribulose 1,5 difosfato carboxilase) (Bowes, 1993; Arigita et al., 2002), promove a regulação estomática, prepara as plantas para as condições autotróficas (Arigita et al., 2002) e possibilita reduzir ou eliminar o período de aclimatização *ex vitro* (Kozai, 1991; Arigita et al., 2002).

Pouco se conhece sobre as respostas fisiológicas do crescimento inicial em *Annona glabra* L. sob diferentes condições ambientais. Informações a respeito do desempenho fotossintético dessas espécies em resposta às variações da intensidade luminosa são escassas, principalmente no que tange às características fotossintéticas.

Segundo Silva et al. (2007), o ambiente de luz onde a planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação das plantas a este ambiente depende do ajuste do seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível.

Nesse sentido, a análise do potencial fotossintético de uma planta e suas relações com o ambiente em que estão crescendo e se desenvolvendo permite a ampliação dos conhecimentos sobre sua adaptabilidade às condições de cultivo e à maximização do seu potencial produtivo. Podem possibilitar otimização de protocolos de micropropagação, tornar o ambiente *in vitro* semelhante ao ambiente natural e favorecer a obtenção de plantas de *A. glabra* L. *in vitro*,

preservando suas características fisiológicas após serem aclimatizadas *ex vitro* e, por conseguinte, atender às demandas de plantas matrizes e de mudas de qualidade genética e fitossanitária comprovadas.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 7, p. 11-19, 2002.

AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; TAKAYAMA, S. Automation in plant tissue culture - general introduction and overview. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 1-18.

ALEXANDRE, R.S. **Germinação *in vitro* e organogênese em explante do maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa* DEG.) influenciada pela irradiância e sacarose**. 2002. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ALVES, T.M.; CHAVES, P.P.; SANTOS, L.M.; NAGEM, T.J.; MURTA, S.M.; CERAVOLO, I.P.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 61, n. 1, p. 85-87, 1995.

AMÂNCIO, S.; REBRODÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 31-37, 1999.

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

BAG, N.; CHANDRA, S.; PALNI, L.M.; NANDI, S.K. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 156, p. 125-135, 2000.

BETTIOL NETO, J.E.; PIO, R.; BUENO, S.C.S.; BASTOS, D.C.; SCARPARE FILHO, J.A. Enraizamento de estacas dos porta-enxertos: araticum-de-terra-fria (*Rollinia sp.*) e araticum-mirim (*Rollinia emarginata*) para anonáceas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1077-1082, 2006.

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 10, p. 1587-1594, 1998.

BIDDINGTON, N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 11, n. 2, p. 173-187, 1992.

BLOCK, L.C.; SANTOS, A.R.S.; SOUZA, M.M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R.A.; SANTOS, M.A.; MONACHE, F.; CECHINEL, V. Chemical and pharmacological examination of anti-conceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 61, p. 85-89, 1998.

BOWES, G. Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric carbon dioxide. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 309-332, 1993.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3.ed. Mossoró: ESAM, 1976. 540 p.

CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

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

CARVALHO, L.C.; OSÓRIO, M.L.; CHAVES, M.M.; AMÂNCIO, S. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 67, n. 3, p. 271-280, 2001.

CASSELS, A.C. Pitfalls in micropropagation and how to avoid them. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 38, p. 240-246, 1989.

CHANG, F.R.; YANG, P.Y.; LIN, J.Y.; LEE, K.H.; WU, Y.C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 61, n. 4, p. 437-439, 1998.

CHAVEZ, P.I.; SÁNCHEZ, L.A.; GONZÁLES, F.A.; RODRÍGUEZ, J.L.; AXELROD, E.F. Cytotoxicity correlations of Puerto Rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. **International Journal Pharmacognosy**, Netherlands, v. 35, n. 4, p. 222-226, 1997.

CHEN, C.H.; HSIEH, T.J.; LIU, T.Z.; CHERN, C.L.; HSIEH, P.Y.; CHEN, C.Y. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 67, n. 11, p. 1942-1946, 2004.

CHEN, C.Y.; CHANG, F.R.; CHO, C.P.; WU, Y.C. Ent-Kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, Columbus, n. 63, n. 7, p. 1000-1003, 2000.

CHIH-CHUANG, L.; FANG-RONG, C.; SHU-LI, C.; CHIN-CHUNG, W.; KUO-HSIUNG, L.; YANG-CHANG, W. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, San Diego, v. 13, n. 15, p. 4767-4776, 2005.

COENEN, C.; LOMAX, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, London, v. 2, n. 9, p. 351-356, 1997.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.; FARIAS, P.A.; VIANA, G.S.; CUNHA, K.M.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSIA, N.V.; RAO, V.S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol**, Glasgow, v. 40, n. 4, p. 1231-1234, 2002.

COUCEIRO, M.A. **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* DEG.)**. 2002. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CROAT, T. **Flora of Barro Colorado Island**. Stanford: Stanford University, 1978. 943 p.

CUI, Y.Y.; HAHN, E.J.; KOZAI, T.; PAEK, K.Y. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, n. 3 p. 219-226, 2000.

DECSETTI, S.F.C.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; ALOUFA, M.A.I. La micropropagation d'*Annona glabra* L. à partir de segments nodaux. **Fruits**, Paris, v. 60, p. 319-325, 2005.

DESJARDINS, Y. Photosynthesis *in vitro* - on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 393, p. 45-61, 1995.

DOWNS, C.G.; SOMERFIELD, S.D.; DAVERY, M.C. Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 93-100, 1997.

ENCINA, C.L.; BARCELÓ-MUNHOZ, A.; HERRERO-CASTAÑO, A.; PLIEGO-ALFARO, F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, 1994.

FERRANTE, A.; HUNTER, D.A.; HACKETT, W.P.; REID, M.S. Thidiazuron - a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 333-338, July 2002.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 102, n. 3 p. 411-418, 1998.

GALLARDO, T.; ARAGON, R.; TORMO, J.R.; BLAZQUEZ, M.A.; ZABRA-POLO, C.; CORTES, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 811-816, 1998.

GALZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 239-244, 1992.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Journal Plant Growth Regulatory**, New York, v. 16, n. 3, p. 169-172, 1997.

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: SPI / Embrapa - CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRIBAUDO, I.; RESTAGNO, M.; NOVELLO, V. Vented vessels affect growth rate of *in vitro* *Vitis vinifera* cv. *Nebbiolo*. **Acta Horticulture**, v. 616, p. 129-133, 2003.

HEMPEL, M. From micropropagation to microponics (part II). **Practical Hydroponics & Greenhouses**, Australia, v. 2, p. 17-20, 1994. Disponível em: <<http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic2.htm>>. Acesso em: 07 fev. 2008.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas de porta-enxertos de macieira “Marubakaido” e “M- 26”**. 1999. 240 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

HUYLENBROECK, J.M. van; DEBERGH, P.C. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 2, n. 3, p. 136-141, 1996.

IACONO, F.; MARTINELLI, L. CO₂ assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated *in vivo* and *in vitro*: estimation of stomatal and cuticular transpiration *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 32, n. 2, p. 91-97, 1998.

JACKSON, M.B.; ABBOTT, A.J.; BELCHER, A.R.; HALL, K.C.; BUTLER, R.; CAMERON, J. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. **Annals of Botany**, London, v. 67, n. 3 p. 229-237, 1991.

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

KITAYA, Y.; OHMURA, Y.; KOZAI, T.; KUBOTA, C. Visualization and analysis of air currents on plant tissue culture vessels. **Environment Control in Biology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 139-141, 1997.

KODYM, A.; HOLLENTHONER, S.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Cost reduction in the micropropagation of banana by using tubular skylights as source for natural lighting. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v. 37, n. 2, p. 237-242, 2001.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 66, n. 1, p. 67-71, 2001.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1999.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, p. 525-537, 2001.

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

KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. v. 75, p. 757-781.

KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 22, n. 3, p. 205-211, 1990.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 27, n. 1, p. 47-51, 1991.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 12, p. 1312-1314, 1992.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v. 35, n. 4, p. 296-298, 1999.

LEIFERT, C.; MURPHY, K.P.; LUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 83-109, 1995.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira oh x f97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-357, 2000.

LEMOS, E.E.P.; BAKER, D.A. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explant of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 105-112, 1998.

LEMOS, E.E.P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 3, p. 395-403, 1996a.

LEMOS, E.E.P.; BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 77-79, 1996b.

LEMOS, E.E.P. Organogênese e micropropagação em anonáceas. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 3., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.

LIM, L.; HEW, Y.C.; WONG, S.C.; HEW, C.S. Effects of light intensity, sugar and CO₂ concentrations on growth and mineral uptake of *Dendrobium* plantlets. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v. 67, n. 5, p. 601-611, 1992.

MOHAMMED, G.H.; VIDAVER, W.E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 111-117, 1990.

MOREIRA, F.M. **Avaliação morfofisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira 'Paulsen 1103' in vitro**. 2000. 91 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, PR.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂ enriched condition with decreased sucrose concentrations in the médium. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 51-63, 2004.

NAGORI, R.; PUROHIT, S.D. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, 2004.

NICOLOSO, F.T.; CASSOL, L.F.; FORTUNATO, R.P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 57-60, 2001.

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

OLIVEIRA, B.H.; SANT'ANA, A.E.; BASTOS, D.Z. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, Inglaterra, v. 13, n. 6, p. 368-371, 2002.

OLIVEIRA, L.M. de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo in vitro e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, 1995.

PAGE, J.E.; BALZA, F.; NISHIDA, T.; NEIL TOWERS, G.H. Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. **Phytochemistry**, Estados Unidos, v. 31, n. 10, p. 3437-3439, 1992.

PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOME, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffi* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, Estados Unidos, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

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

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

PROTECTION, L. Pond apple *Annona glabra* declared class 2. In: **Facts sheets**. Queensland, 2004. v.1, 58 p.

RASAI, S.; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-14, 1995.

RESTAGNO, M.; SCHUBERT, A.; GRIBAUDO, I. Rubisco activity in micropropagated plantlets. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures**. Saint-Paul-lez-Durance: Centre d'études de Cadarache, 1995. p. 205-206.

ROBERTS, A.V.; SMITH, E.F. The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for transplantation to soil: 1. protection of roots by cellulose plugs. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 129-132, 1990.

ROSS-KARSTENS, G.S.; EBERT, G.; LUDDERS, P. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Israel, v. 4, n. 1, p. 21-27, 1998.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, S.B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 12, p. 1551-1553, 1991.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTANA, J.R.F. de; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; LEMOS, E.E.P. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured *in vitro*. **Fruits**, Paris, v. 58, n. 4, p. 357-361, 2003.

SANTANA, J.R.F. de; PAIVA, R.; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M de. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L.: I. desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 7, p. 153-156, 1993.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I.; MATAS, J.; ARAUS, J.L. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 3, p. 217-230, 1997.

SIEBRA, C.A. **Atividades biológicas de *Annona glabra* linn., Annonaceae**. 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SILVA, A.L. da; DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des portegreffes de vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Bordeaux, v. 29, n. 1, p. 1-9, 1995.

SILVA, A.L. da; HARISCAIN, P.; OLLAT, N.; DOAZAN, J.P. Estimations de la capacité photoautotrophique de vitroplants de porte-greffe de vigne 'Gravesac': mise au point d'un système de mesure de la photosynthèse nette de vitroplants. **Vitis**, Geneva, v. 35, n. 2, p. 73-78, 1996.

SILVA, A.L. da; SCHUCK, E.; HARISCAIN-LAFITTE, P.; PARIZZOTTO, A. Cultura *in vitro* do porta-enxerto de videira var. 043-43 resistente a fusariose. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1997, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Unesp, 1997. p. 51-53.

SILVA, R.R. da; FREITAS, G.A. de; SIEBENEICHLER, S.C.; MATA, J.F. da; CHAGAS, J.R. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. sob influência de sombreamento. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 37, n. 3, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672007000300007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 fev. 2008.

SLIMESTRAD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 61, n. 6, p. 562-563, 1995.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; COSTA, F.B.; COUTINHO, S.T.; OLIVEIRA, D.C.; OLIVEIRA, A.M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 492, n. 25, p. 233-241, 2004.

TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. *In vitro* propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, Geneva, v. 34, n. 4, p. 237-238, 1995.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, Netherlands, v. 71, n. 6, p. 693-696, 2000.

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16 β H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 50, n. 13, p. 3704-3707, 2002.

WALDENMAIER, S. Histological analyses of *Rhododendron* leaves during acclimatization of *in vitro* plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 364, p. 53-60, 1994.

XIAO-XI, L.; FERAS, Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J.L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 815-821, 1999.

ZHANG, Y.H.; PENG, H.Y.; XIA, G.H.; WANG, M.Y.; HAN, Y. Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. **Acta Pharmacologica Sinica**, China, v. 25, n. 7, p. 937-942, 2004.

ZOBAYED, S.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, New York, v. 37, p. 807-813, 2001.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 530, p. 377-386, 2000.

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

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

CAPÍTULO II

TIPO DE EXPLANTE E EFEITO DA CINETINA NA INDUÇÃO DE BROTAÇÕES *IN VITRO* EM *Annona glabra* L

1 RESUMO

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. Tipo de explante e efeito de cinetina na indução de brotações *in vitro* em *Annona glabra* L. In: _____. **Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.** 2008. cap. 2, p. 31-56. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. *

A *Annona glabra* L. é uma espécie de difícil indução de brotações nos explantes, devido à pequena capacidade de multiplicação e desenvolvimento de gemas. Entre os fatores que controlam a morfogênese *in vitro* nessa espécie, têm-se as citocininas, que afetam diversas respostas morfofisiológicas. Dessa forma, objetivou-se determinar o explante mais adequado na inoculação de diferentes números de gemas axilares do explante e a efetividade da cinetina na indução de brotações de *Annona glabra* L.. Para a obtenção de brotações, segmentos caulinares contendo 1, 2, ou 3 gemas laterais foram inoculados em meio WPM. Diferentes concentrações de cinetina foram empregadas: ausência da citocinina (controle), 0,25 mg L⁻¹, 0,50 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹. Após 30 dias, avaliaram-se número de brotos, folhas e raízes por plântula, comprimento da parte aérea e comprimento médio das raízes. Os explantes que se sobressaíram foram aqueles estabelecidos e multiplicados em meio de cultura suplementado com 0,50 mg L⁻¹ de cinetina quando continham duas ou três gemas e proporcionaram maior crescimento em altura. O número de folhas e raízes, os comprimentos de brotos e raízes foram influenciados pelos níveis de cinetina e número de gemas utilizados nos explantes. As médias do número de raízes (2,66) e comprimento de raízes (2,71cm) ocorreram em destaque no tratamento com a combinação de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina com explantes de duas gemas laterais. O maior comprimento das brotações (1,46 cm) e (1,61cm) foi verificado quando utilizaram explantes que continham duas e três gemas, respectivamente. O efeito de retenção da área foliar nas brotações, foi evidenciado em virtude da menor taxa de abscisão foliar, naqueles tratamentos com adição de 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ de cinetina. A presença de 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹ da citocinina, não foi eficiente na multiplicação *in vitro* de brotações de *Annona glabra* L., independente do número de gemas.

* Comitê orientador: Renato Paiva, PhD – UFLA. (Orientador), Dr^a. Angela Maria Soares – UFLA. (Co-orientador).

2 ABSTRACT

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. Explant type and kinetin effect on *Annona glabra* L *in vitro* shoot induction. In: _____. **Culture environment in the micropropagation of *Annona glabra* L.** 2008. chap. 2, p. 31-56. Dissertation (M.Sc. in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.*

Shoot induction in *Annona glabra* L. explants is difficult due to its short capacity to multiply and to develop buds. The cytokinin is one of the factors which control the *in vitro* morphogenesis in this species and it affects several morphophysiological responses. Therefore, the objective of this research was to determine the most adequate explant for the inoculation of different numbers of axillary buds and the kinetin (KIN) effectiveness on the induction of *Annona glabra* L shoots. To obtain the shoots, nodal segments were inoculated with 1, 2 or 3 lateral buds in WPM medium, defined by Lloyd & Mccown (1980). Different concentrations of KIN: absence (control), 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ were used. After 30 days, the amount of shoots, leaves and roots per plant, shoot part and root length average were evaluated. The explants which distinguished themselves were those established and multiplied in culture supplemented with 0.50 mg L⁻¹ KIN containing two or three buds promoting the higher growth in height. The number of leaves and roots, shoot and root length were influenced by kinetin's levels and by the number of buds used in the explants. The average of root number (2.66) and root length (2.71cm) occurred notably in the treatment using 0.50 mg L⁻¹ KIN and explant with two lateral buds. The higher shoot lengths (1.46 cm and 1.61cm) were observed when explants containing two or three germs, respectively, were used. The retention's effect of the leaf area in the shoots has become evident due to the minor rate of leaf abscission, in those treatments containing 0.25 and 0.50 mg L⁻¹ KIN. The presence of 1.0 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹ cytokinin was not efficient to the *Annona glabra* L. shoot multiplication, independent on the number of buds.

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Adviser), – UFLA, Dr. Angela Maria Soares (Co-Adviser). – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Das espécies com potencial de utilização agrícola nas regiões do cerrado, destaca-se o araticum (*Annona glabra* L.), também conhecido popularmente como araticum-do-brejo ou araticum-bravo. É uma espécie frutífera da família Annonaceae, assim como a cherimóia (*A. cherimoia*), a condessa (*A. reticulata*), a pinha (*A. squamosa*) e a graviola (*A. muricata*) (Ribeiro et al., 2000). A *Annona glabra* tem propriedades antibactericidas, antifúngicas, inseticidas e citotóxicas (Padmaja et al., 1995). Vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas partes da planta, além de investigadas algumas atividades biológicas *in vitro* do extrato dessa espécie (Siebra, 2007).

O araticum, por sua importância como frutífera, é uma das plantas do cerrado também utilizadas, segundo Manica et al. (2003), como porta-enxerto para a atemoleira, graviroleira e cherimoleira, frutíferas mais consumidas do gênero *Annona*. Assim, como diversas espécies nativas, a *Annona glabra* L. é de difícil indução de multibrotações nos explantes, devido à pequena capacidade de multiplicação e desenvolvimento de gemas.

Para garantir a sobrevivência e a perpetuação de espécies nativas, uma alternativa é o estabelecimento de plantios comerciais. Porém, pouco se conhece a respeito das técnicas de cultivo e de produção de mudas dessas frutíferas ou pelo fato de ainda serem plantas em estado silvestre e/ou por gerar populações heterogêneas e de frutificação tardia (Oliveira, 2006). Por sua vez, a alta uniformidade no tamanho e na qualidade das árvores oriundas de propágulos vegetativos é uma importante vantagem para o manejo e a colheita de plantações comerciais.

A multibrotação é caracterizada pela fase em que, sob a influência do meio de cultura, há quebra da dominância apical e concomitante estímulo à brotação lateral. Com isso, as gemas laterais vão se desenvolver, havendo inibição do crescimento em comprimento e estímulo ao aumento em diâmetro do explante, resultando, basicamente, no aumento do número de brotos laterais. Tanto para a formação dos agregados de gemas como de multibrotos, a adição de citocinina é o principal requerimento, muitas vezes combinada com a adição de uma pequena quantidade de auxina (Teixeira, 2006).

Para a produção de mudas em larga escala, a fase de multibrotação é uma das mais importantes. A adição de citocininas ao meio de cultivo afeta o desenvolvimento dos tecidos, induzindo a maior formação de brotos por explantes, maior altura das brotações e maior área foliar (Oliveira, 2006). Geralmente, altas concentrações de citocininas promovem a formação de grande número de brotações (Tanuwidjaja et al., 1998), entretanto, em trabalhos realizados com *Annona glabra* L. (Decchetti, 2000; Oliveira, 2006) e *Annona squamosa* L. (Nagori & Purohit, 2004), utilizando concentrações reduzidas de citocininas, obtiveram-se resultados positivos no estabelecimento e na multiplicação das plantas.

A posição da gema na haste em plântulas cultivadas *in vitro* ou no caule de plantas mantidas sob condição *ex vitro* pode interferir no desenvolvimento *in vitro*, quando estas gemas são utilizadas como fonte de explante (Pereira et al., 2005).

Os níveis e os tipos de reguladores de crescimento são de grande importância nas etapas de estabelecimento e multiplicação dos explantes em meios de cultura. Em alguns trabalhos (Schmidt et al., 2007; Emrich et al., 2007; Oliveira, 2006; Nicioli, 2006; Rios, 2004), obtiveram-se resultados promissores na proliferação de gemas axilares, na regeneração de plantas e no enraizamento *in vitro*, pela adição de cinetina no meio de cultura.

São poucos os relatos que mencionam a influência das características iniciais dos explantes sobre o desenvolvimento e a multiplicação *in vitro*. O sistema de multiplicação por meio da proliferação de brotos com uso de explantes contendo o número adequado de gemas laterais pode constituir uma forma alternativa para o sucesso no estabelecimento e na multiplicação *in vitro* de brotos, com adição de citocinina ao meio de cultura.

Neste sentido, este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o explante mais adequado na inoculação de diferentes números de gemas axilares do explante e a efetividade da cinetina na indução de brotações de *Annona glabra* L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

4.1 Material botânico

O material botânico utilizado constituiu-se de segmentos nodais de *A. glabra* L., que foram seccionados para a obtenção de explantes com uma, duas ou três gemas laterais, com tamanho aproximado de 1,5 a 2,5 cm, derivados de plantas matrizes com três anos de idade, oriundos da germinação *in vitro* de sementes coletadas no jardim clonal do CPATU/Embrapa, Belém, PA. Para servirem como fonte de material botânico, as matrizes foram mantidas em sala de crescimento, sob condições ambientais controladas.

Na desinfestação, os explantes foram mantidos em água corrente por 40 minutos e lavados com detergente. A seguir, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70% (v/v), por um minuto, em associação com a imersão em

hipoclorito de sódio 50% (v/v), por 15 minutos e lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. A esterilização dos meios de cultura foi feita em autoclave, à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

4.2 Condições experimentais

Segmentos nodais em condições *in vitro* desenvolveram-se em sala de crescimento na temperatura de 25°C (± 2 °C) e fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os explantes foram inoculados em meio WPM definido por Lloyd & Mccown (1980), com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar, o pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar com adição de 1 g L⁻¹ de carvão ativado. O meio foi distribuído em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo, aproximadamente, 15 mL cada e vedado com tampa plástica convencional e selamento com filme de polivinilcloro. Posteriormente, os explantes foram inoculados aos meios nos tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar sob condições estéreis, que foram transferidos e mantidos em sala de crescimento.

4.3 Delineamento estatístico

Os tratamentos consistiram da adição de diferentes concentrações de cinetina: ausência da cinetina (controle), 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹. Para a obtenção de multibrotações, segmentos caulinares contendo 1, 2, ou 3 gemas axilares foram testados.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio contendo um explante, com diferentes concentrações do regulador de

crescimento e diferentes números de gemas axilares da *Annona glabra* L. Para análise estatística foi utilizado o programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 2003).

4.4 Variáveis avaliadas

Após 30 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes características fitotécnicas: número médio de brotos, folhas e raízes por plântula, percentual de folhas caídas, comprimento da parte aérea e comprimento médio das raízes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, os resultados evidenciaram que as concentrações de cinetina utilizadas promoveram a multiplicação dos explantes de *Annona glabra* L. com o uso de explantes contendo variado número de gemas. A análise de variância indicou que houve interação significativa das concentrações de cinetina entre os diferentes números de gemas contidas no explante, o que comprovou a existência de resposta diferenciada na multiplicação e no desenvolvimento de brotos.

No que diz respeito ao número médio de brotações emitidas aos 30 dias de cultivo (Tabela 1), não foram observadas interações significativas entre as concentrações de cinetina aplicadas ao meio de cultivo e os diferentes números de gemas axilares do explante, porém, a variação do número de gemas do explante causou efeito direto no número de brotações, especialmente aqueles explantes que continham duas e três gemas axilares, o qual induziu uma média de 1,83 e 1,91 brotos, respectivamente.

TABELA 1 Número de brotações oriundas dos segmentos nodais de *Annona glabra* L. inoculados ao meio WPM suplementado com diferentes concentrações de cinetina e contendo diferentes números de gemas axilares no explante, após 30 dias de cultivo. UFPA, Lavras, MG, 2008.

| Cinetina (mg L ⁻¹) | Número médio de brotações/explantes | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------|---------|
| | 1 gema | 2 gemas | 3 gemas |
| 0,0 | 1,06 | 0,86 | 1,45 |
| 0,25 | 0,86 | 1,56 | 1,91 |
| 0,50 | 0,93 | 1,83 | 1,66 |
| 1,0 | 0,86 | 1,68 | 1,61 |
| 2,0 | 0,73 | 1,21 | 1,53 |

Deccetti (2000) obteve, em média, 1,5 broto por explante, na ploriferação de brotações em segmentos nodais dessa mesma espécie em estudo. Também foram verificados, por Abreu (2003), maiores médias no número de gemas, melhor desenvolvimento e crescimento das plântulas nos tratamentos com cinetina na propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*.

Emrich et al. (2007) estudaram diferentes concentrações de cinetina na indução de brotações *in vitro* de mangabeira. Fráguas et al. (2004) verificaram maior produção de brotos em explantes caulinares de *Ficus carica*, quando adicionaram ao meio de cultura 2,45 mg L⁻¹ de cinetina.

Diferentes posições da gema na haste foram avaliadas por Malosso (2007) na micropropagação de *Acmella oleracea* L., quanto à capacidade de regenerar novas brotações. Esses estudos são importantes porque nem todas as gemas da haste são potencialmente úteis e não devem ser usadas indistintamente no processo de repicagem, pois não fornecerão explantes uniformes quanto ao desenvolvimento *in vitro*.

Os dados aqui apresentados assemelham-se aos apresentados por Rios (2004), que não observou diferenças significativas no número de brotos por explante nas concentrações de cinetina testadas na micropropagação de *Gypsophila paniculata* pela cultura de segmentos nodais.

Pereira et al. (2005), estudando a influência do número de gemas do explante na multiplicação *in vitro* da batata, utilizando diferentes tipos de segmentos nodais (basais e apicais, com e sem folhas, contendo uma, duas e três gemas axilares), observaram que aqueles explantes inicialmente inoculados com três gemas proporcionaram brotações significativamente maiores. No entanto, independentemente do número de gemas iniciais no explante, os de origem basal sempre apresentaram brotações significativamente maiores, quando comparados aos de origem apical. Esta característica, possivelmente, está relacionada a fatores nutricionais do explante. O mesmo autor relata que as porções basais são mais engrossadas e podem apresentar maior acúmulo de reservas em seus tecidos.

Outro fato observado foi a concentração de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina, a qual proporcionou maior formação de gemas laterais em alguns explantes. Também foi verificada 100% de sobrevivência das brotações.

Nicoli (2006), estudando a cinetina em interação com auxinas, verificou que esta era essencial à proliferação de brotações. A melhor concentração foi a de 5,0 mg L⁻¹ de cinetina, obtendo, em média, 3 brotos por explante. Aumento na produção de brotos de *Salix humboldtiana* foi observado com o emprego de 0,5 mg L⁻¹ de cinetina (Pereira et al., 2000). A utilização de 0,4 mg L⁻¹ de cinetina estimulou a formação de brotos e o número de folhas por explante de *Emblica officinalis* (Mishra et al., 1999).

Para a interação do número de gemas axilares do explante e as concentrações de cinetina aplicadas ao meio de cultivo, constatou-se efeito significativo para o comprimento de brotos de *Annona glabra* cultivada *in vitro*.

O tratamentos que induziram significativamente maiores comprimentos de brotos foram aqueles em que se utilizaram explantes com duas (1,46cm) e três gemas (1,61 cm), com adição de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina e ausência da citocinina, respectivamente (Figura 1). Estes resultados podem estar associados ao fato de que explantes com duas ou três gemas são maiores e contêm mais reservas para promover a ploriferação de brotações e ao fato de que a utilização de baixas concentrações de citocininas diminui o efeito inibitório destas sobre o crescimento das brotações.

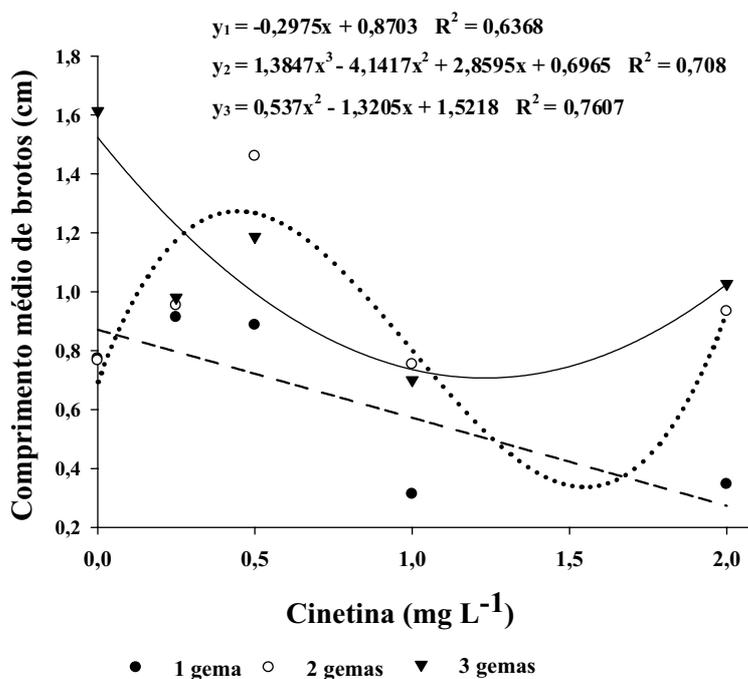


FIGURA 1 Comprimento médio de brotações dos segmentos nodais de *Annona glabra* L. inoculados ao meio WPM suplementado com diferentes concentrações de cinetina e contendo diferentes números de gemas axilares do explante, após 30 dias. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Para Fráguas et al. (2004), a utilização de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina em meio WPM mostrou-se eficiente e também produziu brotos maiores e bem formados.

Observa-se que a ausência da citocinina, inicialmente, proporcionou um alongamento dos explantes inoculados com três gemas, sendo, então, reduzidos à medida que aumentou a concentração da cinetina.

Entretanto, a taxa de proliferação dos brotos não foi superior àqueles explantes inoculados com duas gemas, fato observado anteriormente. Sugere-se que a cinetina promove o crescimento das brotações, ainda assim, a concentração adicionada ao meio de cultura pode representar um fator determinante do crescimento e do padrão de desenvolvimento das plantas.

De acordo com Hu & Wang (1983), a cinetina permite o desenvolvimento normal dos propágulos, podendo não apresentar brotações múltiplas. Borges et al. (2004) testaram diferentes citocinas na multiplicação de gemas axilares de acácia-negra e verificaram alongamento das brotações. As citocininas, segundo Preece (1995), atuam na quebra da dominância apical e na indução e no crescimento de brotações em segmentos nodais.

Dentre as concentrações testadas no meio de cultivo, analisando-se o número de folhas formadas em explantes de *Annona glabra* L. (Figura 2), constata-se que a concentração de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina obteve o maior número de folhas (2,63) quando foram utilizados explantes contendo duas gemas. Nessa condição, a qualidade dos brotos foi visualmente melhor.

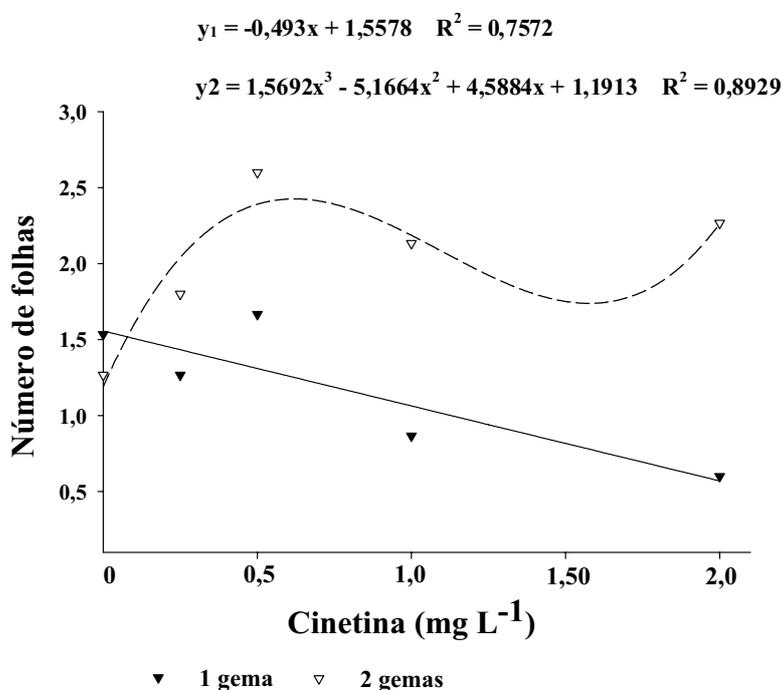


FIGURA 2 Número médio de folhas formadas em explantes de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e diferentes números de gemas axilares do explante inoculados ao meio de cultura WPM. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Resultados obtidos por Schmidt et al. (2007), sobre o cultivo de mamoeiro *in vitro*, também comprovaram maior eficiência do uso de cinetina para a formação de folhas. Também Fráguas et al. (2004), utilizando de 0,5 mg L⁻¹ de cinetina, promoveram melhor multiplicação de *Ficus carica* a partir de segmentos nodais inoculados com duas gemas no meio de cultivo.

Observa-se que o número de folhas por explantes apresentou tendência de reduzir na medida em que se elevaram as concentrações de cinetina adicionadas ao meio de cultura. Entretanto, constatou-se que, independente das concentrações utilizadas, não houve efeito significativo para a formação de

folhas em explantes com três gemas, ou seja, a formação da parte aérea das plantas não foi afetada, mesmo com a dose máxima da cinetina.

A concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina, em explantes com uma gema, induziu a formação de brotos pequenos e a reduzida presença de folhas, com tendência à redução à medida que aumenta a concentração dessa citocinina. Provavelmente, a espécie requer baixa concentração da citocinina para seu desenvolvimento.

O uso de explante com duas gemas é justificado em virtude de este tipo de explante apresentar número de folhas superior ao daqueles com uma ou três gemas vegetativa. Os resultados do número de folhas das brotações foram semelhantes aos da variável comprimento das brotações. Isso indica a direta relação entre as duas variáveis. Assim sendo, quanto maior o comprimento de uma brotação, maior será o número de gemas laterais e, conseqüentemente, o maior número de folhas.

A formação de gemas laterais é um processo de organogênese direta comandado pela dominância apical, na presença de um balanço auxinas/citocininas favorável as citocininas (Taiz & Zeiger, 2004) e, segundo Debiasi (2000), aspectos relacionados ao controle do desenvolvimento destas gemas vêm sendo amplamente estudados e relatados nos últimos anos, enfatizando o efeito dos reguladores de crescimento, da luz, da vascularização e dos nutrientes.

Explantes pequenos, normalmente, apresentam crescimento mais lento quando comparados a explantes maiores (Grattapaglia & Machado, 1998; Pereira et al., 2000). Nesse sentido, é bastante provável que a altura de brotações e o número de brotações evidenciados neste trabalho devem-se a este fator, visto que explantes inoculados com uma única gema apresentaram tamanho menor do que aqueles inoculados inicialmente com duas ou três gemas.

A interação destes fatores pode ser um dos pontos que explicam as diferenças na capacidade de multiplicação e no desenvolvimento das gemas em Annonaceae, especialmente na espécie em estudo.

Na Figura 3 pode ser observada a formação de gemas laterais no explante de *Annona glabra* proveniente do tratamento que se utilizou a concentração de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina no meio de cultivo.

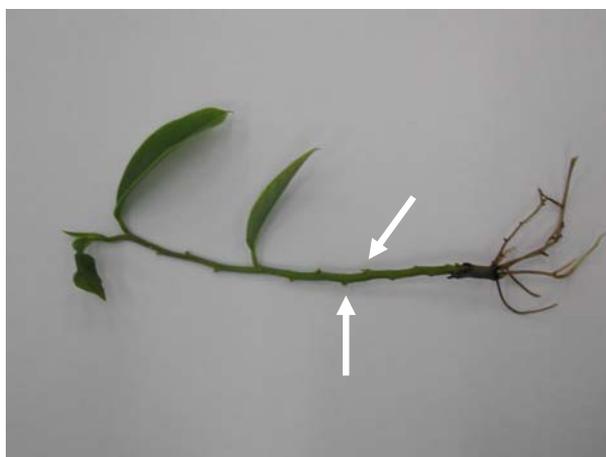


FIGURA 3 Planta de *Annona glabra* L. obtida de segmento nodal inoculado em meio WPM suplementado com 0,50 mg L⁻¹ de cinetina. Setas indicam formação de gemas laterais no explante. LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Para a variável porcentagem de folhas senescentes, não houve interação significativa, mas, quando as fontes de variações foram avaliadas isoladamente, observou-se que a ausência e a maior concentração da citocinina influenciaram diretamente no percentual de folhas senescentes, apresentando elevados percentuais de 31,1% e 28%, respectivamente (Tabela 2).

O ambiente fechado ao qual as plantas ou os explantes são submetidos proporciona, de modo geral, o acúmulo de etileno, fitormônio responsável pela abscisão de folhas, frutos e flores. Esse fitormônio, mesmo em pequenas concentrações, pode ser fisiologicamente ativo e desencadear vários processos, dentre estes a abscisão foliar (Kerbaui, 2004).

TABELA 2 Percentual de folhas senescentes oriundas dos segmentos nodais de *Annona glabra* L. inoculados ao meio WPM suplementado com diferentes concentrações de cinetina, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

| Cinetina (mg L ⁻¹) | Folhas senescentes (%) |
|--------------------------------|------------------------|
| 0,0 | 31,1 |
| 0,25 | 6,6 |
| 0,50 | 4,4 |
| 1,0 | 24 |
| 2,0 | 28 |

Neste trabalho, verificou-se ação efetiva da cinetina sobre os tratamentos aplicados aos explantes de *Annona glabra*, reduzindo o percentual de folhas senescentes, quando adicionada nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg L⁻¹. Provavelmente, essas concentrações causaram um efeito de retenção da área foliar dos explantes das plantas.

Oliveira (2006) constatou efeitos de retenção da área foliar nas brotações de *Annona glabra* durante as fases de multiplicação e enraizamento, em virtude da menor taxa de abscisão foliar com a utilização de cinetina no meio de cultura. Segundo Genkov et al. (1997), a competência para retardar a senescência foliar também varia amplamente entre os diversos tipos de citocininas.

Analisando-se a influência do número de gemas do explante para esta variável, constatou-se que o percentual de folhas caídas foi maior naqueles explantes contendo duas ou três gemas, provavelmente por apresentarem maiores valores de número de folhas.

O número de gemas no explante provavelmente influencia na resposta à abscisão foliar de plantas cultivadas *in vitro* de *Annona glabra*, visto que explantes inoculados com uma única gema apresentam tamanho menor e são poucos responsivos. Aqueles inoculados com duas gemas são bastante prováveis de proporcionar melhorias nas respostas organogênicas *in vitro*.

Foi observada interação significativa para o número de raízes em segmentos nodais de *Annona glabra* L. Explantes em meio de cultura WPM desprovido do regulador de crescimento contendo diferentes números de gemas mostraram baixa eficiência na formação de raízes.

Tais resultados são contrários aos obtidos por Decetti (2000) que observou alto percentual de enraizamento e maior número de raízes em brotações de *Annona glabra*, na ausência de regulador de crescimento. Silva (2007), utilizando meio MS 50% dos sais, em gérbera, obteve maior número de raízes na ausência de zeatina.

A análise de regressão mostrou-se significativa para as concentrações de cinetina testadas, tendo o tratamento com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ da citocinina reduzido a formação de raízes aos 30 dias de cultivo. Verificou-se que os explantes melhor enraizados foram aqueles inoculados ao meio de cultivo com duas e três gemas. Observou-se um aumento gradativo no número de raízes, à proporção que aumentou a concentração de cinetina. Este aumento foi observado com o uso da cinetina até a concentração de 0,50 mg L⁻¹, a partir da qual houve redução do número de raízes em explantes, tanto com duas como com três gemas axilares (Figura 4).

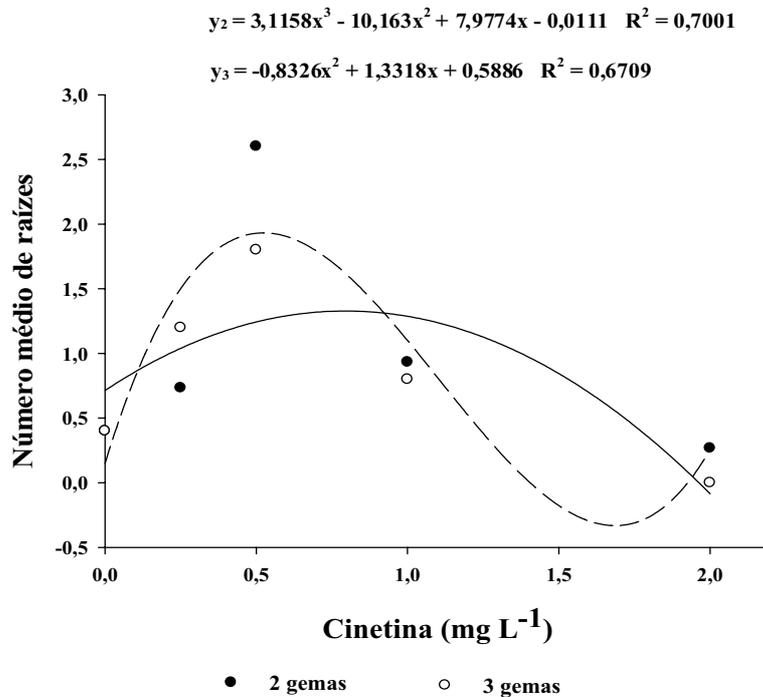


FIGURA 4 Número médio de raízes formadas em explantes de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e diferentes números de gemas axilares do explante inoculados ao meio de cultura WPM. UFLA, Lavras, MG, 2008.

O princípio fisiológico do enraizamento adventício é o de que muitas células, mesmo em tecidos maduros, têm a capacidade de voltar à condição meristemática (desdiferenciação) e produzir novas raízes e ou brotações. George (1993) relata alguns casos de estimulação do enraizamento por parte de algumas citocininas. No entanto, o autor observa que o mais comum é que as altas concentrações de citocininas (0,5 a 10 mg L⁻¹) inibam ou retardem a formação de raízes.

Não foram encontradas diferenças significativas para o número de raízes nos explantes inoculados com uma gema, nas diferentes concentrações de cinetina. O maior número de raiz (2,66) em relação às concentrações de cinetina e diferentes gemas contidas no explantes foi observado no tratamento com 0,50 mg L⁻¹ de cinetina, em explante de duas gemas. Com o aumento da concentração de cinetina, constata-se que a variável supracitada decresce (Figura 4).

Foi relatado, por Machado et al. (2006), que a cinetina não inibiu o enraizamento das microestacas do porta-enxerto de videira VR043-43. Tais resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Tanuwidjaja et al. (1998), segundo os quais, o número de raízes em brotações de akia evoluiu em resposta ao aumento das concentrações do fitormônio no meio de cultivo.

Esses resultados demonstram que a rizogênese em *Annona glabra* é influenciada pelo número de gemas contidas no explante e pelo uso da concentração adequada da citocinina. Essas observações são fundamentais para a adaptação dos explantes à nova condição estabelecida e posterior resposta ao estímulo.

Outro fator que contribuiu para o enraizamento é a presença de folhas nos explantes. Com a rápida formação de folhas, fato analisado anteriormente naqueles explantes que continham duas ou três gemas axilares, constatou-se que a formação de raízes foi significativamente maior nestes explantes, comparada à dos demais tratamentos. Hartmann et al. (1990) afirmam que, principalmente em espécies de difícil enraizamento, a presença de folhas estimula o enraizamento, visto que as auxinas não são os únicos fatores responsáveis pela rizogênese, sendo necessários outros fatores que normalmente são produzidos pelas folhas e gemas fisiologicamente ativas (Chalfun et al., 1997).

Analisando o comprimento de raízes formadas em explantes de *Annona glabra* cultivadas *in vitro*, foi observada interação altamente significativa para as diferentes concentrações de cinetina testadas e o número de gemas contidas no

explantes inoculados em meio de cultura WPM, sobretudo naqueles explantes que continham duas e três gemas axilares.

O meio desprovido de reguladores de crescimento mostrou-se incapaz de promover o crescimento de raízes nos explantes. O maior comprimento médio das raízes (2,71 cm) em relação às diferentes concentrações de cinetina testadas foi obtido quando se utilizou a concentração de 0,50 mg L⁻¹ com explantes de duas gemas inoculados ao meio. Observou-se que houve redução no comprimento das raízes com o aumento das concentrações de cinetina (Figura 5).

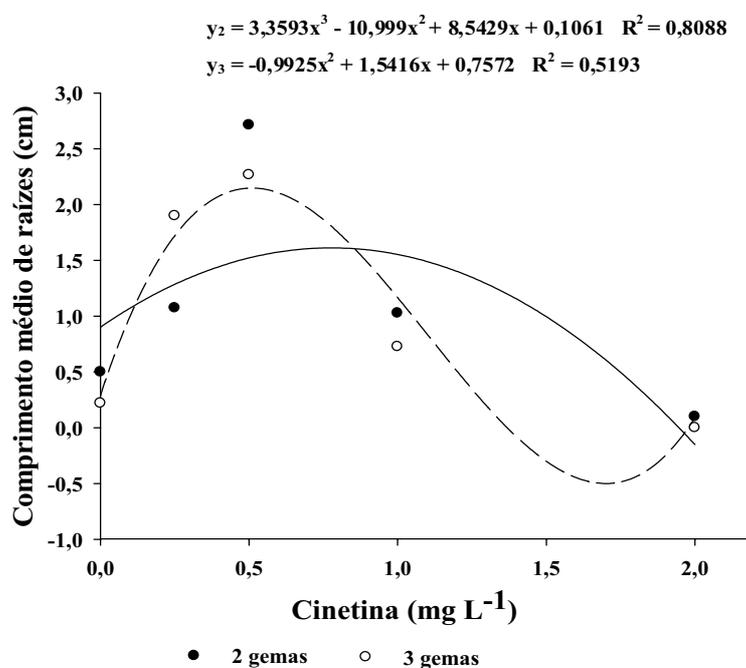


FIGURA 5 Comprimento médio de raízes formadas em explantes de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cinetina e diferentes números de gemas axilares do explante inoculados ao meio de cultura WPM. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A análise de regressão para explantes com três gemas apresentou resposta quadrática negativa. A concentração de 0,50 mg L⁻¹ foi a melhor, resultando num comprimento de 2,26 cm de raiz por explante. Entretanto, este valor não foi superior aos tratamentos, nos quais se utilizou a mesma concentração para explantes inoculados com duas gemas.

Verifica-se um incremento no crescimento das raízes com o uso da cinetina até a concentração de 0,50 mg L⁻¹, a partir da qual, verifica-se uma redução do comprimento das raízes. Este comportamento foi evidenciado para ambos os explantes utilizados.

Fráguas et al. (2004) verificaram que, embora a formação radicular tenha sido observada na ausência de cinetina, na concentração de 0,50 mg L⁻¹ também foram verificadas médias elevadas de raízes formadas em *Ficus carica*. De modo semelhante, Decetti (2000) observou alto percentual de enraizamento em brotações e maior número de raízes em *Annona glabra* na ausência de regulador de crescimento.

O efeito da redução do comprimento de raízes é semelhante à de brotações que tiveram seus valores elevados à medida que as concentrações testadas de cinetina foram até 0,50 mg L⁻¹ com explantes de duas gemas. Também o crescimento em altura das plantas foi favorecido pelo uso destas concentrações da citocinina no meio de cultivo.

O aspecto visual das brotações oriundas dos segmentos nodais de *Annona glabra* L., inoculados ao meio WPM suplementado com diferentes concentrações de cinetina e contendo diferentes números de gemas axilares do explante, pode ser observado na Figura 6. Pode-se perceber também que houve um desenvolvimento diferenciado destas plantas quanto aos caracteres morfológicos.



FIGURA 6 Aspectos de brotações dos segmentos nodais de *Annona glabra* L. inoculados ao meio WPM suplementado com diferentes concentrações de cinetina e contendo diferentes números de gemas axilares do explante. (A, B) uma gema; (C, D) duas gemas; (E, F) três gemas, após 30 dias de cultivo. LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

6 CONCLUSÕES

Segmentos nodais com duas gemas associados à adição de 0,50 mg L⁻¹ de cinetina são mais eficientes na indução de brotações *in vitro* em *Annona glabra* L.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. de; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R. de; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2003.

BORGES, N.J.; SOBOSA, R.C.; MARTINS-CODER, M.P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 493- 498, 2004.

CHALFUN, N.N.J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN, A.J.; JESUS, A.M. dos S. Efeito da auxina e do anelamento no enraizamento de estacas semilenhosas de azaléias. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 4, p. 516-520, 1997.

DEBIASI, C. **Efeitos de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira *in vitro* cvs. Grand Naine (AAA), Nanicão (AAA) e Enxerto (AAB)**. 2000. 100 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, PR.

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

EMRICH, E.B.; PAIVA, R.; SOARES, F.P.; STEIN, V.C.; FIGUEIREDO, M.A. de; VITOR, S.M.M. Concentrações de cinetina na indução de brotações *in vitro* de mangabeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 16., 2007, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 2007. p. 880-883.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2003.

FRÁGUAS, C.B.; MOACIR PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R. Multiplicação *in vitro* de *ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Journal Plant Growth Regulatory**, New York, v. 16, n. 3, p. 169-172, 1997.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. v. 2.

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: SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1990. 647 p.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 648-655, 2006.

MALOSSO, M.G. **Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em de banco de germoplasma *in vitro***. 2007. 101 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Coari, AM.

MANICA, I.; ICUMA, I.; JUNQUEIRA, K.P.; OLIVEIRA, M.A.S.; CUNHA, M.M.; OLIVEIRA JUNIOR, M.E.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ALVES, R.T. **Frutas anonáceas:** ata ou pinha, atemólia, cherimólia e graviola: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes Ed., 2003. 596 p.

MISHRA, M.; SAXENA, R.P.; PATHAK, R.K.; SRIVASTAVA, A.K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chaubattia, v. 31, n. 3/4, p. 116-122, 1999.

NAGORI, R.; PUROHIT, S.D. *In vitro* plantled regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 89-98, 2004.

NICIOLI, P.M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville] – Fabaceae.** 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, L.M. de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, Aug. 1995.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; FRANCA, S.C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 17-21, 2000.

PEREIRA, J.E.S.; FRANÇA, R.B.; DANTAS, A.D.M.; FORTES, G.R.L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 86-89, 2005.

PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Oxford, n. 1, v. 1, p. 26-37, 1995.

RIBEIRO, J.F.; BRITO, M.A.; SCALOPPI JUNIOR, E.J.; FONSECA, C.E.L. **Araticum.** Jaboticabal: FUNEP, 2000. 52 p. (Frutas Nativas, 12).

RIOS, J.F. **Micropropagação de *Gypsophila paniculata* pela cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de segmentos foliares**. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T. do. Cinetina e ANA na multiplicação *in vitro* de mamoeiro ‘tainung 01’. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 55-60, 2007.

SIEBRA, C.A. **Atividades biológicas de *Annona glabra* linn., Annonaceae**. 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SILVA, D.P.C. da. **Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento *in vitro* de gébera**. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TANUWIDJAJA, C.; WEBB, D.T.; SAGAWA, Y. Micropropagation of Akia (*Wikstroemia uva-ursi* A. Gray). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 53, n. 2, p. 85-90, 1998.

TEIXEIRA, J.B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27 p. (Documentos, 180).

CAPÍTULO III

AMBIENTE DE CULTIVO *IN VITRO* E TIPOS DE VEDAÇÕES NA QUALIDADE DE MUDAS DE *Annona glabra* L.

1 RESUMO

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. Ambiente de cultivo *in vitro* e tipos de vedações na qualidade de mudas de *Annona glabra* L. In: _____. **Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.** 2008. cap. 3, p. 57-108. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. *

O cultivo *in vitro*, em recipientes completamente fechados, pode conduzir a expressivas modificações da composição gasosa. Estudos de fatores ambientais associados ao uso de técnicas e condições que permitam tornar o ambiente *in vitro* mais semelhante ao ambiente natural são fundamentais para o processo de propagação *in vitro*, além de contribuir na investigação do comportamento sob a fisiologia e crescimento de plantas. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo verificar o ambiente de cultivo (sala de crescimento e casa de vegetação) e o tipo de vedação dos frascos (tampa Millipore com filtros que permitem trocas gasosas e tampa convencional) na propagação de *Annona glabra* L. durante a fase de enraizamento *in vitro*, considerando a provável influência do ambiente de cultivo sobre a qualidade das mudas, quanto à capacidade de crescimento e desenvolvimento após a transferência para ambiente natural. Os explantes foram inoculados em meio WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e fechados, respectivamente, com as diferentes vedações dos frascos. Após 30 dias avaliaram-se as características fitotécnicas, características bioquímicas e anatômicas das brotações de *A. glabra* L. Os melhores resultados quanto às características fitotécnicas foram obtidos na casa de vegetação com sombrite de 50%, utilizando tampas com membrana na vedação dos frascos. As brotações produzidas com este tratamento apresentam comprimento superior, com maior biomassa quando comparadas aos demais tratamentos. A influência das mudanças na anatomia, fisiologia e bioquímica sobre o comportamento das brotações de *A. glabra* indicam que a espécie apresenta potencial para desenvolver-se fotoautotroficamente sob ventilação natural com uso das diferentes vedações dos frascos, resultando na otimização do crescimento *in vitro*, na maximização da sobrevivência e na qualidade das plantas durante o enraizamento *in vitro*.

* Comitê de orientação: Renato Paiva, PhD – UFLA. (Orientador), Dr^a. Angela Maria Soares – UFLA. (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. *In vitro* culture environment and type of seal in the quality of *Annona glabra* L. plants. In: _____. **Culture environment in the micropropagation of *Annona glabra* L** 2008. chap. 3, p. 57-108. Dissertation (M.Sc. in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. *

The *in vitro* culture, in completely sealed containers, can lead to expressive modifications of the gaseous composition. Studies of environmental factors, associated to the use of techniques and conditions that turn the *in vitro* environment similar to the natural environment, are fundamental for the process of *in vitro* propagation and to contribute for the investigation of the physiology and plant growth behavior. In this context, the objective of this work was to verify the culture environment (growth room and greenhouse) and the type of flask seal (Millipore caps with filters that allow gaseous changes and conventional caps) in the propagation of *Annona glabra* L. during the *in vitro* rooting phase, considering the probable influence of the culture environment on the quality of the obtained plants, as for growth capacity and development after the transfer to natural environment. The explants were inoculated in WPM medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and sealed, respectively, with the different used flask seals. After 30 days, agronomic, biochemical and anatomical shoot characteristics were evaluated. The best results as for the agronomical characteristics were obtained at the greenhouse with 50% shade, using membrane caps as flask seal. The shoots produced with this treatment present superior length, with larger biomass when compared to the other treatments. The influence of the changes in the anatomy, physiology and biochemistry on the behavior of the shoots indicates that the species presents potential of photoautotrophic growth under natural ventilation using different flask seals, resulting in optimization of the *in vitro* growth, maximization of the survival and plant quality during *in vitro* rooting.

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Adviser), – UFLA, Dr^a. Angela Maria Soares (Co-Adviser). – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Dentre as plantas do cerrado, as espécies frutíferas ocupam lugar de destaque, pois existem em grande quantidade e variedade. Apesar da crescente divulgação das qualidades dos frutos nativos do cerrado, o extrativismo e o desmatamento acelerado e não planejado têm levado ao risco de erosão genética de muitas espécies, dentre estas, as *Annonaceae* frutíferas.

A *Annona glabra* L., espécie frutífera tropical, tem sido bastante pesquisada como porta-enxerto para anonáceas cultivadas. O interesse por este material deve-se à tolerância do sistema radicular a condições de excesso de umidade no solo e à indução de nanismo a copa enxertada. A espécie tem despertado grande interesse nos últimos anos, no Brasil, por se tratar de uma planta com capacidade adaptativa a diversos ambientes e devido a propriedades biológicas de substâncias isoladas de suas folhas, frutos e sementes. Além do potencial fitofarmacológico, apresenta propriedades antibactericidas, antifúngicas, inseticidas e citotóxicas (Padmaja et al., 1995).

A multiplicação *in vitro* e em larga escala de anonáceas ainda encontra algumas limitações. Os principais exemplos são: a contaminação endógena dos explantes (Santana et al., 2003), a alta concentração de compostos fenólicos em seus tecidos e, principalmente, a abscisão foliar precoce (Lemos, 2000), ocasionada pelo acúmulo de etileno nos tecidos confinados no ambiente *in vitro*, prejudicando o vigor e o crescimento das brotações.

Dentre os fatores que podem afetar as condições do ambiente de cultivo, destaca-se o tipo de vedação. Diferentes métodos *in vitro* têm sido empregados no intuito de fornecer condições ambientais que promovam a capacidade fotossintética do material micropropagado, sobretudo a aquisição de fotoautotrofia *in vitro*. A micropropagação fotoautotrófica apresenta várias vantagens sob o método heterotrófico, dentre estas, o aumento do crescimento

das plantas, a redução do risco de contaminação microbiana e a melhoria das características fisiológicas da planta (Santana et al., 2008).

A utilização de tampas com filtros de membranas com microporos permeáveis a gases surge como possibilidade potencial para aumentar a eficiência da micropropagação, promovendo o aumento na transferência de gases entre o recipiente de cultivo e o ambiente externo.

A existência de informações e do entendimento sobre os efeitos advindos das modificações no ambiente de cultivo *in vitro*, especialmente pelo uso da luz natural, sobre as plantas cultivadas *in vitro*, ainda são incipientes.

Dessa forma, objetivou-se estudar os efeitos do ambiente de cultivo sobre a fisiologia e a morfologia das plantas micropropagadas de *A. glabra* L., assim como determinar o ambiente de cultivo *in vitro* e o tipo de vedação dos frascos para otimizar o crescimento *in vitro* e, assim, favorecer a maximização da sobrevivência e qualidade das plantas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de condução do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), localizado no setor de Fisiologia Vegetal/Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e em casa de vegetação, no Departamento de Agricultura da UFLA.

4.2 Material botânico

Foram utilizados, como explantes primários, segmentos nodais obtidos por meio da secção das hastas caulinares jovens (não lenhosas), derivados de plantas matrizes com três anos de idade, oriundas da germinação *in vitro* de sementes coletadas no jardim clonal do CPATU/Embrapa, Belém, PA. Para

servirem como fonte de material botânico, as matrizes foram mantidas em sala de crescimento sob condições ambientais controladas.

Para a desinfestação, os explantes foram mantidos em água corrente por 40 minutos e lavados com detergente. A seguir, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em álcool 70% (v/v), por 1 minuto. Depois, foram imersos em hipoclorito de sódio 50% (v/v), por 15 minutos e lavados, por 3 vezes, em água destilada e estéril. A esterilização dos meios de cultura foi feita em autoclave, à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.

Em uma primeira fase, as plântulas foram mantidas em meio de multiplicação e mantidas em sala de crescimento, sob condições controladas.

4.3 Condições experimentais

Para promover o enraizamento *in vitro*, as brotações com, no mínimo, 2,0 cm de comprimento e 2 a 3 folhas mais próximas do meristema apical, foram removidas do meio de multiplicação e transferidas para frascos contendo 50 mL do meio *wood plant medium* (WPM), definido por Lloyd & McCown (1980), com metade da concentração dos sais, enriquecidos com 30 gL⁻¹ de sacarose, solidificado com 6 gL⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar com adição de 1 gL⁻¹ de carvão ativado. Inoculou-se apenas uma brotação em cada frasco, vedado com dois sistemas diferentes: tampas plásticas transparentes e selamento com parafilme, que restringem as trocas de gases entre o recipiente e a atmosfera externa (sistema convencional) e tampas plásticas modificadas, contendo um par de orifícios (10 mm de diâmetro) cobertos por dois filtros de membranas permeáveis a gases (Milliseal, Millipore, Tokyo), com poros de 0,5 µm, que aumentam a ventilação no recipiente de cultivo (sistema de ventilação natural) (Figura 1).

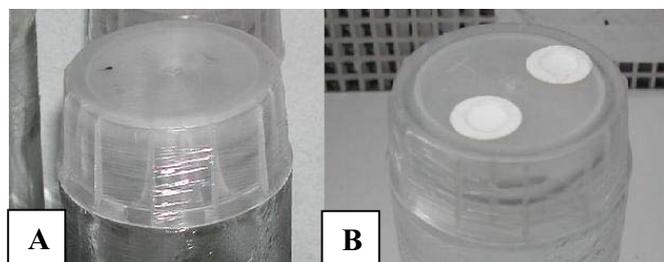


FIGURA 1 Sistema de vedação dos frascos utilizados para o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L: tampa convencional (A) e tampa Millipore (B). LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

4.4 Ambiente de cultivo

Os frascos, após serem fechados com os diferentes tipos de vedação, foram transferidos para dois ambientes: sala de crescimento (SC) sob condições controladas de irradiância ($43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e em casa de vegetação (CV), sob iluminação e temperatura natural. Na casa de vegetação, os frascos foram mantidos sobre uma bancada aberta, a cerca de 1,5 m de altura, e sob tela sombrite, que permite uma interceptação de 50% da luz solar incidente (Figura 2).



FIGURA 2 Aspecto dos ambientes de cultivo *in vitro* com diferentes vedações de frascos. Sala de crescimento (A) e casa de vegetação (B). LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Nos frascos mantidos em sala de crescimento, a iluminação foi fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes do tipo branca fria e a intensidade de luz foi ajustada em função do número de lâmpadas e da distância entre as lâmpadas e o recipiente de cultivo. O ambiente da casa de vegetação foi caracterizado por um piranômetro acoplado a um datalogger (LI – 1400 – LI-COR, Lincoln, Neb.) e por um termo-higrógrafo.

Estes locais de incubação constituíram um fator a ser estudado, permitindo a comparação dos dados obtidos em condições convencionais de micropropagação (sala de crescimento) e cultivo sob luz natural (casa de vegetação).

A caracterização do comportamento diurno da radiação solar e da temperatura do ar foi feita por meio de medidas dessas variáveis em dias de céu aberto. As coletas foram realizadas durante o período de cultivo (12/02/2008 – 12/03/2008). Os valores médios observados no ambiente da casa de vegetação estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 Radiação solar e temperatura média do ar observadas nos microambientes em casa de vegetação. LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

| Radiação (W. m ⁻² . dia ⁻¹) | | | Temperatura (°C) | | |
|---|-------|--------|---------------------|-------|--------|
| Máxima | Média | Mínima | Máxima | Média | Mínima |
| 199,69 | 99,43 | 49,38 | 28 | 23 | 16 |

4.5 Variáveis avaliadas

Ao término da fase de enraizamento, foram analisadas as características fitotécnicas, bioquímicas e anatômicas das brotações e plantas cultivadas sob os diferentes ambientes. Decorrido 30 dias, quantificaram-se os parâmetros fitotécnicos, procedendo-se a aclimatização.

Para aclimatização, 15 plantas por tratamento foram transferidas para tubetes de polietileno com capacidade para 288 cm³ e preenchidos com substrato comercial Plantmax[®]. As brotações foram cobertas com sacos plásticos transparentes e a cobertura plástica foi perfurada gradativamente, durante 21 dias, quando foi totalmente removida. As plantas foram mantidas por mais 40 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura 27 ± 2 °C. Foram avaliados a capacidade de aclimatização e o comprimento das plantas de cada tratamento.

Para efeito de comparação, o estudo anatômico também foi realizado em plantas que crescem *in vivo*, mantidas por três anos em sala de crescimento sob condições controladas.

4.5.1 Características fitotécnicas

Número de brotos, folhas e raízes por planta, comprimento da parte aérea e comprimento médio das raízes, oxidação, número de folhas senescentes e o número de plantas mortas foram determinados.

4.5.2 Características bioquímicas

As características bioquímicas determinadas neste trabalho incluem a composição centesimal, que equivale aos teores de açúcares totais, redutores e não-redutores e os teores de amido. Para a determinação dessas características, foram utilizadas folhas de *Annona glabra* L. pesando, aproximadamente, um grama de amostra de cada tratamento. As análises foram realizadas no Laboratório de Produtos Vegetais, no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

As amostras foram trituradas e homogeneizadas com o auxílio de miniprocessador doméstico. Os teores de cada componente avaliado foram calculados pelo programa SAAL[®] (Tomé, 2001).

Os açúcares totais, redutores e não-redutores foram determinados a partir de um grama de amostra triturada, em álcool etílico 80%, e dosados pelo método descrito por Somogyi, adaptado por Nelson (1944).

A determinação de amido foi realizada a partir do resíduo livre de açúcares. Após a obtenção do extrato, o amido foi quantificado pelo método de Somogyi, modificado por Nelson (1944).

4.5.3 Características anatômicas

Após a coleta de dados fitotécnicos, as plantas foram selecionadas e fixadas em álcool etílico 70%, até a realização das análises, para as quais foram coletadas cinco folhas expandidas das brotações de plantas em cada ambiente de cultivo, sob os diferentes sistemas de vedação dos frascos durante o enraizamento.

Os estudos anatômicos foram efetuados com base no exame microscópico de seções foliares obtidas à mão livre. Quanto à preparação, as seções foram primeiramente clarificadas em solução de hipoclorito de sódio (50% v/v) e, em seguida, lavadas em água destilada. Após a lavagem, as seções foram coradas com azul de astra e safranina, seguindo a metodologia de Kraus & Arduim (1997). As lâminas foram montadas em água glicerinada a 50%. Para os cortes transversais, utilizou-se um micrótomo de mesa, sendo realizados cortes na região do terço mediano das folhas.

As variáveis analisadas foram espessura total do limbo foliar, das células epidérmicas de ambas as faces da folha, dos parênquimas: paliádico e lacunoso. Para tanto, foram utilizadas 5 folhas, sendo avaliados 4 cortes por folha (repetição), num total de 20 observações. Também foram efetuados cortes paradérmicos na região mediana das folhas. As lâminas das seções paradérmicas foram preparadas com corante safranina em glicerina 1% (v/v). Dessas seções,

as variáveis analisadas foram frequência estomática (nº de estômatos por mm²) e diâmetros polares e equatoriais dos estômatos.

Todas as variáveis analisadas foram obtidas por meio de medições efetuadas no programa Sigma Scan Pro 5[®]. As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Anatomia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras (folhas) destinadas à microscopia de varredura foram imersas em solução fixadora Karnovisk (pH 7,2) por um período de 24 horas. Posteriormente, em capela de exaustão, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato, por três vezes e fixadas em tetróxido de ósmio 1%, por 4 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). As folhas foram conduzidas ao aparelho de ponto crítico para a secagem e, então, montadas em *stubs* para cobertura com ouro, conforme sugerido por Alves (2004). Os espécimes foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura LEO Evo 40, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

4.7 Delineamento experimental e análise estatística

4.7.1 Modelos generalizados e modelos de Poisson inflacionado de zeros

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (sala de crescimento e casa de vegetação) x (dois sistemas de vedação do recipiente de cultivo), totalizando quatro tratamentos, com 30 repetições. As plantas a pleno sol e as plantas matrizes foram tratamentos adicionais, tidos como testemunhas. Cada repetição foi composta por um frasco contendo uma planta.

O modelo utilizado para as variáveis fitotécnicas foi um modelo generalizado misto, com distribuição Poisson de parâmetro π , ou seja,

$$Y_{ijk} \sim \log(\pi)$$

Assume-se a função de ligação log e independência das observações. As parcelas estão no delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições, isto é,

$$\log[E(Y)] = \mu + \alpha_i + \beta_j + \eta_{ik}$$

Sendo: μ o efeito associado à média geral; α_i o efeito associado ao i -ésimo ambiente, $i = 1, 2$, sendo considerado fixo; β_j o efeito associado à j -ésima tampa, $j = 1, 2$, sendo considerado fixo e η_{ik} o efeito associado à interação ambiente x tampa.

Devido ao número excessivo de zeros em alguns parâmetros fitotécnicos, o modelo Poisson padrão não se ajusta adequadamente aos dados. Sendo assim, utilizou-se o modelo Poisson inflacionado de zeros. Os preditores lineares para o modelo de médias e modelo de zeros são dados respectivamente por:

$$\log[E(Y)] = \mu + \alpha_i + \beta_j + \eta_{ik}$$

Sendo: μ o efeito associado à média geral; α_i o efeito associado ao i -ésimo ambiente, $i = 1, 2$, sendo considerado fixo; β_j o efeito associado à j -ésima tampa, $j = 1, 2$, sendo considerado fixo e η_{ik} o efeito associado a interação ambiente x tampa e

$$\log\left(\frac{\omega}{1-\omega}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j$$

Para as demais variáveis foi utilizado um modelo linear com distribuição normal, com média μ e variância σ^2 , assumindo independência entre as

observações e função de ligação identidade, Em delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições, isto é,

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \eta_{ik}$$

sendo: μ o efeito associado à média geral; α_i o efeito associado ao i -ésimo ambiente, $i = 1,2$, sendo considerado fixo; β_j o efeito associado à j -ésima tampa, $j = 1,2$, sendo considerado fixo e η_{ik} o efeito associado a interação ambiente x tampa.

Foi utilizado o software R 2.7.0, com auxílio da função GLM e da biblioteca PSCL.

Para as análises de variância dos estudos bioquímicos e anatômicos, utilizou-se o programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 2003). As médias foram comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características fitotécnicas

Os dados apresentaram homogeneidade de variâncias e normalidade. Sendo assim, foram submetidos à análise de variância. Não houve interação entre os fatores ambiente de cultivo e o sistema de vedação, para todas as variáveis fitotécnicas analisadas.

A avaliação realizada após 30 dias de cultivo, na fase de enraizamento, mostrou que foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos do fator ambiente de cultivo, tendo o melhor resultado sido obtido em casa de vegetação.

De acordo com a análise de “Deviance” (Quadro 1), não foi observado efeito significativo na interação entre o ambiente e o sistema de vedação dos frascos. Porém, houve influência significativa do ambiente de cultivo sobre o

número médio de brotações obtidas por segmento nodal de *Annona glabra* L., sendo produzidas maiores médias de brotos (2,16 brotos/explante) quando as plantas se encontravam no ambiente de casa de vegetação (Figura 3). As brotações apresentaram comprimento superior, com maior biomassa. Esta característica pode estar relacionada com a ocorrência de fotossíntese *in vitro*, o que pode favorecer, posteriormente, a transferência do cultivo *in vitro* para o ambiente externo.

QUADRO 1 Análise de “Deviance” para o número médio de brotações por segmento nodal de *Annona glabra* L. sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e diferentes tipos de vedações dos frascos. Lavras, MG, 2008.

| FV | GL | Deviance |
|-------------------------|-----------|-----------------|
| Ambiente | 1 | 24,684** |
| Tampa | 1 | 24,684 |
| Ambiente x Tampa | 1 | 21,503 |

Significativo, a ** 5%,

Quanto ao sistema de vedação, não houve diferenças significativas para a variável em questão, entretanto, os resultados obtidos permitem inferir que o sistema natural (casa de vegetação) leva à formação de um maior número médio de brotações em relação ao sistema convencional (sala de crescimento) de vedação.

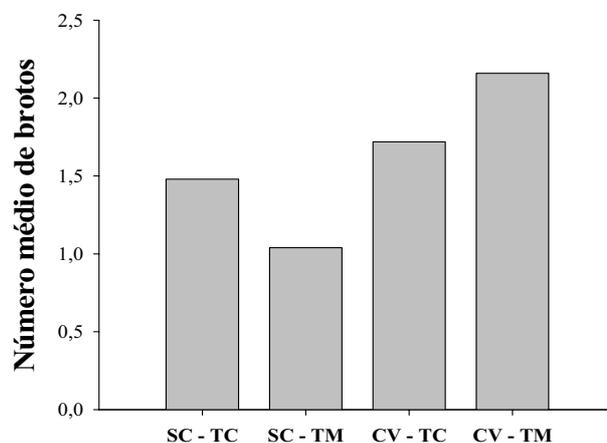


FIGURA 3 Número médio de brotos formados em explantes de *Annona glabra* L. cultivados *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Millipore (TM). Lavras, MG, 2008.

Trabalhando com *Dendranthema grandiflora* TZVELEV cv. Rage, Braga et al. (2007) avaliaram diferentes condições de cultivo *in vitro* e obtiveram melhores resultados também em condições de cultivo sob baixa irradiância e sistema de vedação natural.

Na micropropagação de bananeiras, explantes crescidos sob luz natural apresentaram maior taxa de multiplicação que aqueles multiplicados em sala de crescimento (Kodym & Zapata-Arias, 1999). Respostas benéficas foram também reportadas por Dignart (2006), que obteve melhores resultados com *Cattleya* em sala de crescimento e em casa de vegetação sem proteção de sombrite, tendo esses resultados diferenças significativa em relação ao tratamento casa de vegetação com proteção de sombrite 50%.

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

Foi adotado, neste estudo, que a eliminação total de sacarose do meio não seria apropriada, em função da necessidade de uma fonte de energia para o enraizamento, visto que as condições ambientais eram insuficientes para favorecer a fotossíntese. Para tanto, utilizaram-se menores concentrações de sacarose ao meio na fase de enraizamento.

A influência positiva da sacarose foi verificada no crescimento *in vitro* de plantas de maracujazeiro no meio de cultivo pela suplementação de 30 gL⁻¹ de sacarose (Couceiro, 2002). Em videiras, Gribaudo et al. (2003) também relatam que o crescimento das plantas foi otimizado pela presença de sacarose no meio de cultivo.

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

Analisando-se o comprimento das brotações obtidas nas condições experimentais (Quadro 2), constatou-se que, pela análise de “Deviance”, a interação entre o ambiente e o tipo de tampa utilizada foi significativa, obtendo-se maiores médias de comprimento (3,61 cm) nos tratamentos em que foram utilizadas, como vedação dos frascos, as tampas Millipore, no ambiente casa de vegetação.

De acordo com a análise “Deviance”, o comprimento médio das brotações de *Annona glabra* L. foi afetado pelo ambiente em que as plantas foram submetidas, sendo a interação com o uso de diferentes tampas significativa. Os resultados deste estudo indicam que o uso de diferentes

vedações dos frascos, isoladamente, não possui efeito significativo sobre o comprimento médio dos brotos.

QUADRO 2 Resumo da análise de variância para o comprimento médio de brotações por segmento nodal de *Annona glabra* L., sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e diferentes tipos de vedações dos frascos. Lavras, MG, 2008.

| FV | GL | QM |
|-------------------------|-----------|------------|
| Ambiente | 1 | 64,000 *** |
| Tampa | 1 | 4,494 |
| Ambiente x Tampa | 1 | 16,646 *** |
| Resíduos | 96 | 1,430 |

Significativo, a * 10%, **5% e ***1%.

Conforme demonstrado no gráfico da Figura 4, brotações mais alongadas (superiores a 2,0 cm) ideais para a fase de enraizamento podem ser obtidas, nas condições de cultivo em casa de vegetação. Isso porque as médias de comprimento de broto nos tratamentos em casa de vegetação foram superiores àquelas da condição convencional de cultivo, o que confirma o efeito isolado do ambiente.

Esses resultados estão de acordo com Chiste et al. (2006), que obtiveram maior comprimento das brotações em casa de vegetação no cultivo *in vitro* de Mirtilo cv. Delite. Dessa forma, se o objetivo é produzir brotos maiores, para posterior enraizamento, pode-se trabalhar no sistema de cultivo citados acima.

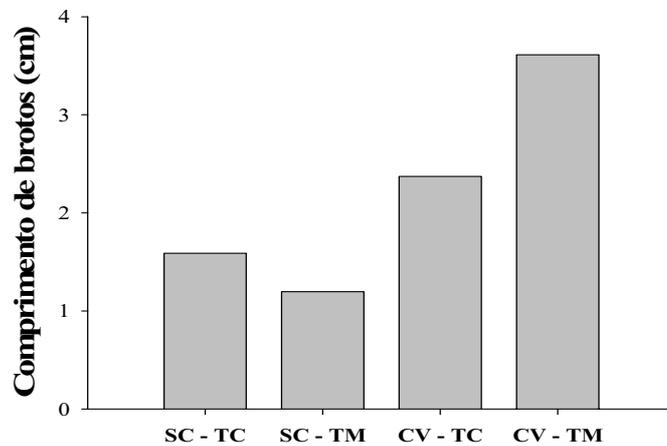


FIGURA 4 Comprimento médio de brotos formados em explantes de *Annona glabra* L., cultivadas *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Millipore (TM). Lavras, MG, 2008.

Nessas condições, observa-se que ocorre um estímulo ao crescimento das brotações favorecidos pela luz e ventilação natural, em função do tipo de tampa utilizado, sugerindo que, sob essas condições, podem ocorrer o estímulo e o desenvolvimento da fotoautotrofia.

Resultados contrários foram reportados por Fontes et al. (2007), durante a produção de brotações de *Musa* spp., que obtiveram maiores médias para a cultivar Caipira em ambiente artificial (sala de crescimento).

Os resultados sugerem que as condições encontradas no ambiente de cultivo com tipo de tampa utilizado foram eficientes para promover o desenvolvimento *in vitro* das brotações na casa de vegetação. Os frascos vedados com a tampa Millipore têm mostrado bons resultados na otimização do crescimento das plantas, pelas trocas gasosas com o ambiente externo.

Quanto às variáveis número médio de folhas formadas e número de folhas senescentes, de acordo com os resultados da análise de “Deviance”, houve diferença estatística apenas para o efeito do ambiente.

Maior número de folhas formadas foi obtido no ambiente casa de vegetação, apresentando média de 4,4 folhas/explante (Quadro 3).

QUADRO 3 Análise de “Deviance” para o número médio de folhas formadas e número de folhas senescentes de brotações de *Annona glabra* L. sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e diferentes tipos de vedações dos frascos. Lavras, MG, 2008.

| Fonte de variação | GL | Deviance | |
|-------------------|----|--------------------|-----------------------|
| | | Nº folhas formadas | Nº folhas senescentes |
| Ambiente | 1 | 145,242*** | 87,196*** |
| Tampa | 1 | 142,910 | 84,897 |
| Amb. x Tampa | 1 | 139,160* | 84,862 |

Significativo, a * 10%, ** 5%, *** 0,1%

Para o número de folhas senescentes, resultado significativamente superior foi verificado em plantas enraizadas em ambiente natural, tanto com frascos vedados com tampa Millipore (1,12), quanto para aqueles frascos vedados com tampa convencional (0,72). Com o uso da vedação convencional dos frascos no ambiente sala de crescimento, constataram-se médias inferiores (0,16), não diferindo estatisticamente do tratamento com uso de tampas Millipore (0,12).

A maior abscisão foliar em ambiente natural representa benefícios para a qualidade das plantas, favorecendo, inclusive, seu posterior desenvolvimento *ex vitro*. Isso porque as novas folhas emitidas sob luz solar estão mais sujeitas à influência de flutuações ambientais (temperatura, irradiância e umidade), as quais são mais parecidas às condições do ambiente *ex vitro*, fato que pode

possibilitar rustificação das plantas e, conseqüentemente, menor estresse no momento do transplântio para a casa de vegetação.

Resultados semelhantes foram reportados por Fontes et al. (2007), no cultivo *in vitro* de *Musa* spp. Segundo Tsay (2006), plantas de *Scrophularia yoshimurae* apresentaram folhas menores quando desenvolvidas em ambientes com pouca troca gasosa e maiores em ambientes com trocas gasosas.

A resposta quanto à formação e à abscisão de folhas de *Annona glabra* L. é demonstrada na Figura 5.

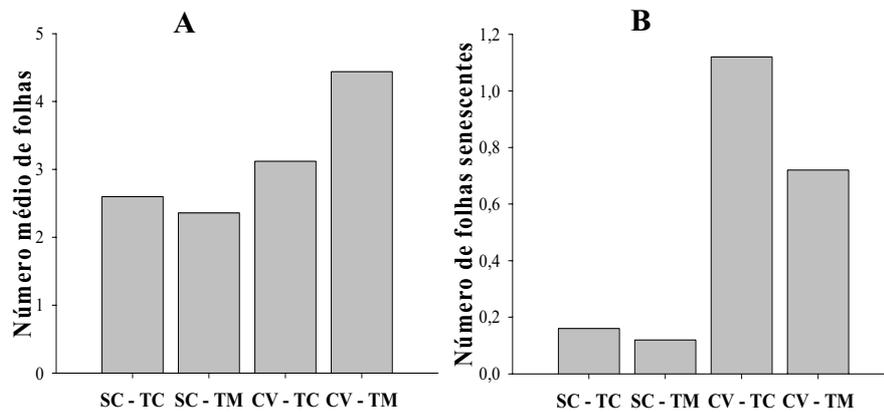


FIGURA 5 Número médio de folhas formadas (A) e número de folhas senescentes (B) de brotações de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

É sugerido que as folhas formadas *in vitro*, na presença de carboidrato, no caso a sacarose fornecida no meio, iniciam um importante papel na fotossíntese, contribuindo para a emissão e a expansão de novas folhas *in vitro* e durante o posterior desenvolvimento *ex vitro* (Yué et al., 1993).

Neste experimento, a sacarose (30 mg L^{-1}) foi fornecida em todos os tratamentos, o que comprovou a influência significativa do ambiente na formação e abscisão das folhas das plantas nos ambientes casa de vegetação e sala de crescimento, respectivamente. Sendo assim, as variáveis fitotécnicas estudadas não foram dependentes do suprimento de carbono no meio de cultura.

Para promover fotoautotrofismo nas plantas *in vitro*, Debergh (1991) sugere a omissão de sacarose no meio. Entretanto, os resultados aqui encontrados não confirmam esta hipótese. Provavelmente, seria necessário modificar a intensidade de luz e concentração de CO_2 . Esta afirmação baseia-se em trabalhos realizados com morangueiro por Arai et al. (1991), Yue et al. (1993) e Desjardins et al. (1987).

Ao estudarem a micropropagação de espécies lenhosas, como *Acacia mangium* (acácia), *Coffea arabusta* (cafeeiro), *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto), *Pinus radiata* (pinheiro-americano), *Rubus idaeus* (framboeseira), *Garcinia mangostana* (mangostão), *Azadirachta indica* (nim), *Paulownia fortunei* (quiri), entre outras, Kozai & Kubota (2001) verificaram que o crescimento de explantes da maioria das espécies foi maior sob condições fotoautotróficas do que sob condições fotomixotróficas. Tomateiros micropropagados de forma fotoautotrófica apresentaram maior vigor, raízes mais desenvolvidas, folhas e ramos mais espessos e tiveram melhor crescimento após a aclimatização, quando comparados às plantas micropropagadas de forma fotomixotrófica (Kubota & Tadokoro, 1999).

De acordo com as análises, houve interação entre os fatores ambiente de cultivo e o sistema de vedação para as variáveis fitotécnicas número e comprimento de raízes analisadas. Analisando isoladamente os fatores, foram também observadas diferenças significativas entre os tratamentos do fator ambiente de cultivo e tipo de vedação, sendo o melhor resultado obtido em casa de vegetação (Quadro 4).

Foi observado um incremento significativo no sistema radicular das plantas, quando desenvolvidas nos tratamentos casa de vegetação sob sistema de vedação com tampa Millipore. Entretanto, a formação (rizogênese) e o crescimento de raízes são reduzidos nos tratamentos em sala de crescimento.

QUADRO 4 Análise de “Deviance” para o número médio de raízes formadas de brotações de *Annona glabra* L. sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e diferentes tipos de vedações dos frascos. Lavras, MG, 2008.

| Fonte de variação | GL | Deviance |
|-------------------|----|-------------|
| Ambiente | 1 | 175,112 *** |
| Tampa | 1 | 163,040*** |
| Ambiente x tampa | 1 | 150,399*** |

Significativo, a * 10%, ** 5%, ***1%

As maiores médias de número de raízes foram encontradas nos frascos vedados com tampa Millipore, apresentando 5,2 raízes brotação, no ambiente casa de vegetação, enquanto, para vedação com tampa convencional, 2,6 raízes/brotação, neste mesmo tipo de ambiente. Com o método tradicional de cultivo *in vitro* (sala de crescimento), obtiveram-se médias bastante inferiores, de ordem 0,84 raízes no sistema de vedação convencional e 0,4 raízes (Figura 6A).

Considerando que a rizogênese é um processo que requer muita energia e que as plantas foram cultivadas sob a mesma concentração de sacarose no meio de cultura, a maior formação de raízes em casa de vegetação, principalmente com o uso de tampas Millipore, sugere que, sob essas condições, aumenta a disponibilidade de açúcares. Isso, provavelmente, ocorre como resposta do aumento na produção de fotoassimilados por meio da fotossíntese ou da maior absorção da sacarose presente no meio de cultivo.

Quanto ao comprimento da maior raiz, a interação ambiente x tipo de vedação foi significativa. Os efeitos isolados do ambiente e do tipo de vedação

foram altamente significativos para a variável supracitada (Quadro 5). O ambiente natural proporcionou maior estímulo ao crescimento das raízes adventícias, entretanto, o tipo de vedação foi o fator que mais influenciou no crescimento das raízes.

No ambiente casa de vegetação com vedação da tampa Millipore, as raízes cresceram 4,28 cm, enquanto que no ambiente sala de crescimento com mesma vedação com tampa Millipore o crescimento foi de 0,65 cm (Figura 6B).

QUADRO 5 Resumo da análise de variância para o comprimento médio de raiz de brotações de *Annona glabra* L. sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e diferentes tipos de vedações dos frascos. Lavras, MG, 2008.

| Fonte de variação | GL | QM |
|--------------------------|-----------|------------|
| Ambiente | 1 | 126,79 *** |
| Tampa | 1 | 0,67 |
| Ambiente x tampa | 1 | 47,06 *** |

Significativo, a * 10%, ** 5%, ***1%

Quando os frascos foram completamente vedados com tampa convencional, em sala de crescimento, as raízes apresentaram o menor comprimento médio (2,19 cm). Já com mesmo tipo de vedação convencional, no ambiente casa de vegetação, o comprimento médio da maior raiz foi de 3,07 cm, evidenciando, assim, um incremento no crescimento radicular, favorecido pelo ambiente casa de vegetação (Figura 6B).

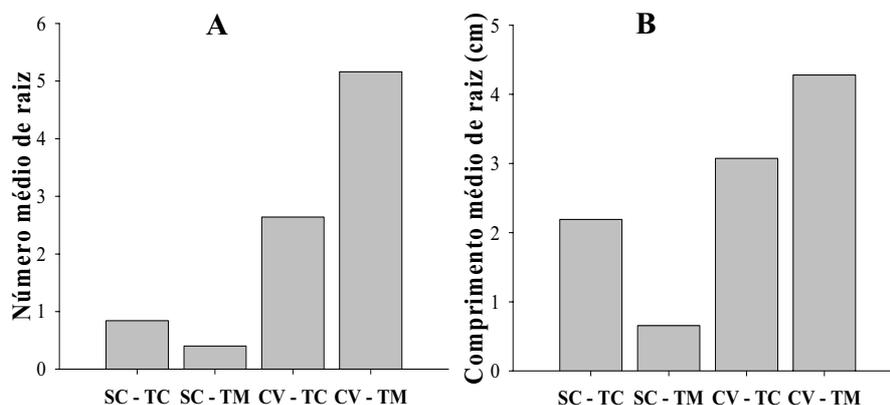


FIGURA 6 Número médio de raízes formadas (A) e comprimento médio de raízes (B) de brotações de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

Respostas benéficas advindas do uso da luz natural foram também reportadas por Santana et al. (2008), na indução ao estímulo do comportamento fotoautotrófico, durante o enraizamento *in vitro* em brotações de *Annona glabra* L.. A melhora nas trocas gasosas entre a atmosfera interna do frasco de cultura e o meio externo conduz a um efeito positivo sobre o crescimento e sobre o estímulo do comportamento fotoautotrófico.

O processo de oxidação de compostos fenólicos existentes nas plantas é caracterizado pelo escurecimento das superfícies injuriadas devido à oxidação de diversos tipos de fenóis provenientes das células e que, ao difundirem-se e entrarem em contato com o ar, iniciam a reação (Monaco et al., 1977).

Para Fachinello et al. (1995), a utilização de substâncias antioxidantes no enraizamento de estacas ainda é muito restrita, ao contrário do uso na micropropagação de plantas.

No enraizamento de *Annona glabra* L. não foram utilizadas substâncias antioxidantes, justamente para verificar a influência do ambiente e do tipo de vedação dos frascos sobre o percentual de oxidação e de sobrevivência de plantas nesta fase da micropropagação.

Os resultados aqui reportados foram analisados estatisticamente e, de acordo com a análise “Deviance” (Quadro 6), apenas o ambiente causou efeito significativo para as variáveis oxidação e sobrevivência.

QUADRO 6 Análise de “Deviance” para oxidação e sobrevivência de plantas de *Annona glabra* L. sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e diferentes tipos de vedações dos frascos. Lavras, MG, 2008.

| Fonte de variação | GL | Deviance | |
|-------------------------|----|------------------|-----------|
| | | Perda de plantas | Oxidação |
| Ambiente | 1 | 36,462*** | 66,733*** |
| Tampa | 1 | 36,211 | 66,122 |
| Ambiente x tampa | 1 | 36,211 | 66,107 |

Significativo, a * 10%, ** 5%, *** 0,1%

Analisando-se o gráfico da Figura 7A, observam-se maiores percentuais de oxidação nas brotações advindas do ambiente de sala de crescimento com uso das tampas convencional (52%) e tampa Millipore (68%), na de vedação dos frascos. Resultados satisfatórios foram verificados no ambiente de casa de vegetação, sendo encontrados, nessas condições, baixos percentuais de oxidação. Constatou-se 20% com o uso de tampas convencionais e 24% quando se utilizou tampa Millipore na vedação dos frascos, constituindo o melhor ambiente para o enraizamento de *Annona glabra* L.

De maneira similar, o ambiente casa de vegetação contribuiu significativamente para a sobrevivência das plantas, favorecido pela maior troca gasosa, mesmo não sendo encontrada diferença significativa na interação ou no

efeito isolado do tipo de vedação nos tratamentos. Foi verificado um percentual de 26% de perda das plantas no ambiente sala de crescimento quando se utilizou a tampa convencional. Nestas mesmas condições ambientais, os frascos vedados com tampa Millipore apresentaram 36% de perda (Figura 7B). Entretanto, verificou-se 100% de sobrevivência das plantas nas condições de casa de vegetação, independentemente do tipo de vedação testada.

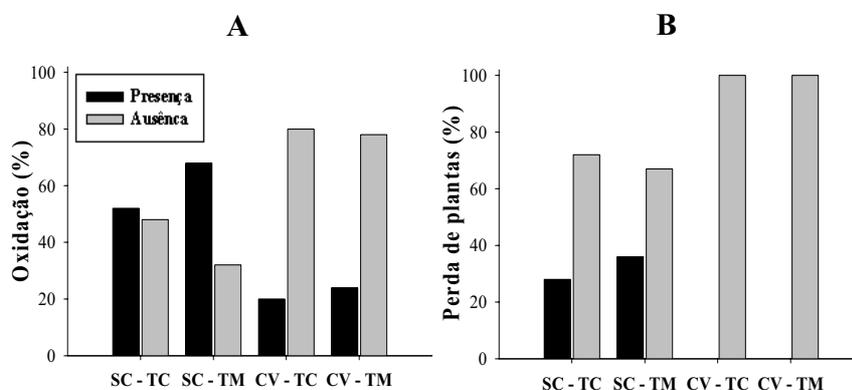


FIGURA 7 Percentual de oxidação (A) e percentual de perda de plantas (B) em brotações de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* sob influência dos ambientes sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

5.2 Características bioquímicas

A concentração de açúcares solúveis totais nas folhas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* foi influenciada significativamente pelos ambientes e pelo sistema de vedação do frasco utilizados durante o período de enraizamento das plantas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que, ao final do enraizamento, nas condições de cultivo em sala de crescimento, tanto sob sistema de vedação convencional como tampa Millipore,

foram encontrados menores percentuais de açúcares solúveis totais. Já a maior porcentagem de açúcares solúveis totais no cultivo em casa de vegetação foi de 6,38% e em sala de crescimento, 5,54%, ambos sob vedação de tampa Millipore.

TABELA 2 Teores de açúcares solúveis totais (AST), sacarose e amido em folhas de *Annona glabra* L. cultivadas *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

| Sistema de vedação | AST (%) | | SACAROSE (%) | | AMIDO (%) | |
|--------------------|---------|---------|--------------|---------|-----------|--------|
| | SC | CV | SC | CV | SC | CV |
| TC | 5,48 cB | 5,94 bA | 0,77 cA | 1,08 bA | 7,84 a | 8,42 a |
| TM | 5,54 cB | 6,38 aA | 0,95 cB | 2,33 aA | 8,18 a | 8,74 a |

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente, a 5%, pelo teste F.

As plantas sob sistema natural (casa de vegetação) apresentaram quantidade de açúcares significativamente superiores quando cultivadas em tampas Millipore (6,38%). De maneira geral, estas foram superiores, quando comparadas ao sistema de vedação com uso de tampa convencional neste mesmo ambiente de cultivo (5,95%).

Foi observado um incremento significativo com o uso de tampa Millipore no ambiente casa de vegetação. A utilização de tampas que permitam as trocas gasosas, principalmente na fase de enraizamento, pode estimular a produção de açúcares solúveis.

Segundo Hess (1969), a capacidade de enraizamento está diretamente relacionada com o teor de carboidratos, de maneira que um aumento nos níveis destes promoveria maior porcentagem de enraizamento.

As análises bioquímicas quantificaram a presença de amido nas folhas de *Annona glabra* L. (Tabela 2). Não foram encontradas diferenças significativas para os teores de amido nas condições ambientais de cultivo sob diferentes tipos de tampas na vedação dos frascos. Entretanto, os percentuais de amido obtidos no cultivo em casa de vegetação com os frascos vedados com tampa Millipore permitem inferir que, nessas condições de cultivo, ocorre maior síntese em relação ao cultivo em sala de crescimento, utilizando-se a mesma vedação dos frascos. Enquanto a maior porcentagem de amido no cultivo em sala de crescimento foi de 8,18%, em casa de vegetação foi de 8,74%, ambas com a utilização de tampa Millipore na vedação dos frascos.

Uma vez que ocorreu aumento do teor de amido, que é uma substância de reserva, é possível esperar que as plantas submetidas aos ambientes de casa de vegetação, além de terem maior capacidade de enraizamento, terão, ainda, maior resistência em caso de condições adversas (baixas temperaturas, déficit hídrico, etc.) ao enraizamento.

O aumento do acúmulo de amido durante o cultivo pode indicar aquisição de comportamento fotoautotrófico *in vitro*, visto que o amido acumulado durante o fotoperíodo pode suportar o crescimento durante o subsequente período de escuro (Amâncio et al., 1999).

As concentrações de sacarose (Tabela 2) foram influenciadas significativamente pelas condições ambientais durante o enraizamento. Não foi observado acúmulo significativo de sacarose nas folhas que cresceram sob sistema convencional, durante o enraizamento com o uso de tampa convencional ou tampa Millipore. Porém, sob sistema natural (casa de vegetação), a concentração de sacarose nas folhas aumenta com o uso de tampas que permitam as trocas gasosas. Isto, possivelmente, indica maior contribuição de fotoassimilados e maior absorção de sacarose do meio.

A sacarose presente no meio de cultura pode contribuir consideravelmente para aumentar a quantidade de carboidratos, principalmente solúveis, na folha (De RicK et al., 1997). Níveis crescentes de sacarose resultaram em aumento da biomassa *in vitro*, de forma semelhante tanto para a parte aérea como para a raiz.

De acordo com Darnel & Birkhold (1997), aproximadamente um terço das reservas acumuladas é empregada no desenvolvimento de novas folhas, as quais, posteriormente, contribuirão para a formação de outras folhas e para o crescimento da planta.

Deccetti (2004), na micropropagação de *Annona glabra* L., já mencionava o significativo aumento observado na concentração de açúcares solúveis e no acúmulo de amido no cultivo sob vedação com tampa Millipore em sala de crescimento.

5.3 Características anatômicas

Por meio da análise de variância dos resultados obtidos, verificou-se efeito significativo da interação dos fatores ambiente de cultivo x tipo de vedação dos frascos, sobre a estrutura anatômica das plantas estudadas durante a fase de enraizamento.

Analisando-se os ambientes de cultivo separadamente, observaram-se diferenças significativas entre estes. Para as epidermes abaxial e adaxial, a maior espessura foi observada em casa de vegetação (Tabela 3).

O efeito do ambiente de cultivo sobre a epiderme das folhas de *Annona glabra* L. foi marcante e evidente (Tabela 3). Verificou-se que a espécie apresentou maior espessura da face superior da epiderme ou adaxial quando cultivada em ambiente de casa de vegetação sob os diferentes tipos de vedação dos frascos, tampa convencional (35,86 μm), seguida pela vedação com tampa Millipore (34,41 μm), sendo próximas às condições *in vivo* a pleno sol, tidas

como plantas testemunhas que apresentou espessura de 40,75 μm . No entanto, quando cultivadas em sala de crescimento sob vedação convencional, a espessura da epiderme adaxial foi menor (23,71 μm).

TABELA 3 Espessura da epiderme da face adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, epiderme da face abaxial e do limbo foliar de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM, sob influência dos sistemas de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

| Sistema de vedação | Espessura (μm) | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| | Epiderme adaxial | Epiderme abaxial | Parênquima paliçádico | Parênquima esponjoso | Limbo foliar |
| Sala de crescimento | | | | | |
| TC | 23,71d | 16,55d | 40,16c | 52,53c | 132,96e |
| TM | 31,48c | 23,55ab | 44,47c | 75,49b | 176,08cd |
| Casa de vegetação | | | | | |
| TC | 35,86b | 20,60bc | 56,82b | 68,26b | 181,54bc |
| TM | 34,41bc | 24,63a | 64,77b | 72,18b | 194,92b |
| <i>In vivo</i> | | | | | |
| Pleno Sol | 40,75a | 20,62bc | 82,82a | 143,98a | 288,19a |
| Matriz (SC) | 31,91c | 18,89cd | 41,66c | 67,76b | 160,22d |

As médias dentro da coluna seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, a 5%, pelo teste F.

Pelo fato de a epiderme ser o tecido mais externo dos órgãos vegetais e por estar em contato direto com o ambiente, ela fica sujeitas a modificações estruturais decorrentes de estresses ambientais em que as plantas se encontram.

O mesofilo, nas duas condições de cultivo, mostrou-se dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico na face superior da lâmina (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (abaxial).

A espessura da face inferior da epiderme ou face abaxial em *A. glabra* foi significativamente inferior em ambos os ambientes de cultivos, quando se utilizou a tampa convencional para vedação dos frascos. Verificou-se espessura de 16,55 μ m com o uso da tampa convencional e de 23,55 μ m nas folhas de plantas cultivadas com tampa Millipore. A maior espessura da epiderme (face) abaxial foi encontrada em folhas de plantas cultivadas a pleno sol (20,62 μ m). Entretanto, ocorreu maior espessura da epiderme (face) abaxial em plantas cultivadas *in vitro* em casa de vegetação, quando se utilizou tampa Millipore na vedação dos frascos (Tabela 3).

As espessuras da face adaxial foram estatisticamente superiores quando se utilizaram tampas Millipore no ambiente casa de vegetação, em comparação aos demais tratamentos.

De maneira geral, o sistema de vedação influenciou o desenvolvimento da epiderme abaxial. Em relação às células que compõem o mesófilo, a espessura do parênquima paliádico, na fase de enraizamento, aumenta significativamente sob condições de casa de vegetação, quando comparado ao das plantas cultivadas em sala de crescimento, quando o tipo de vedação utilizado foi a tampa Millipore. Constataram-se maiores espessuras nestes ambientes, relativamente próximos às condições *in vivo*.

As células dos parênquimas podem apresentar características especiais que possibilitam o desempenho de atividades essenciais na planta, como fotossíntese, reserva, transporte, secreção e excreção (Apezatto-da-Gloria & Carmello-Guerreiro, 2006).

O sistema de vedação do frasco exerceu influência sobre a espessura do parênquima paliçádico durante a fase de enraizamento. As maiores espessuras de parênquima clorofiliano podem representar um artifício usado pela planta para proteger o citoplasma das células do mesofilo e ou aumentar a superfície de contato para a captação de energia luminosa e dos elementos gasosos necessários à realização da fotossíntese.

Serret et al. (1997) observaram também maior desenvolvimento de parênquima paliçádico em plantas de *Gardenia jasminoides* cultivadas *in vitro*.

Observou-se um aumento na espessura do parênquima esponjoso e, conseqüentemente, maior espessura do limbo foliar nas condições de cultivo *in vivo* em plantas a pleno sol. Já em condições *in vitro*, maiores espessuras de parênquima esponjoso das folhas foram verificadas no cultivo em casa de vegetação. Klich (2000) afirma que essa característica reflete num mecanismo estrutural que potencializa a fotossíntese por unidade de área foliar e habilita a uma maior eficiência no uso da água.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Santos (2007), no estudo de respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro*.

Maior espessura de limbo foliar foi constatada em folhas *in vivo* a pleno sol, seguida das plantas cultivadas em casa de vegetação com uso de tampa Millipore. Esse espessamento da folha pode estar associado ao tamanho das células do mesofilo. O aumento na espessura da folha e células paliçádicas mais alongadas constitui um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade de luz (Lee et al., 2000).

Respostas das folhas de brotações sob influência dos diferentes ambientes de cultivo são apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 Espessura da epiderme da face adaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, epiderme da face abaxial e do limbo foliar de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM, sob influência dos ambientes sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV). Lavras, MG, 2008.

| Ambiente de cultivo | Espessura (μm) | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| | Epiderme adaxial | Epiderme abaxial | Parênquima paliçádico | Parênquima esponjoso | Limbo foliar |
| Tampa convencional | | | | | |
| SC | 24,44c | 17,63c | 40,53d | 56,31d | 138,91d |
| CV | 35,97a | 20,79b | 57,32b | 70,38b | 184,46b |
| Tampa Millipore | | | | | |
| SC | 31,87b | 23,19a | 44,73c | 69,23c | 169,02c |
| CV | 33,29b | 24,34a | 62,29a | 73,91a | 193,83a |

As médias dentro da coluna, seguidas pelas mesmas letras, não diferem significativamente entre si, a 5%, pelo teste F.

Nobel (1991) cita que os fatores ambientais podem afetar a anatomia foliar, podendo causar mudanças no número de camadas do mesofilo. A luz natural associada ao uso de vedações que permitam trocas gasosas entre os ambientes interno do frasco e a atmosfera exerce importante influência sobre a anatomia foliar, como já relatado por Deccetti et al. (2008) e Serret et al. (1997).

O número de estômatos variou significativamente entre as plantas cultivadas sob os diferentes ambientes de cultivo (Figura 8). Observou-se que as maiores freqüências estomáticas são associadas, geralmente, às condições de cultivo *in vivo* (pleno sol e sala de crescimento), seguidas daquelas plantas em condições de cultivo *in vitro* em ambiente natural (casa de vegetação).

Nery et al. (2007) relatam também que as plantas *Calophyllum brasiliense* Cambess. cultivadas a pleno sol apresentaram as maiores médias na densidade estomática. Neste trabalho, foram observadas médias significativamente superiores nessas condições, entretanto, para o tipo de vedação utilizada, não foram encontradas diferenças estatísticas no ambiente casa de vegetação e na sala de crescimento (Figura 8).

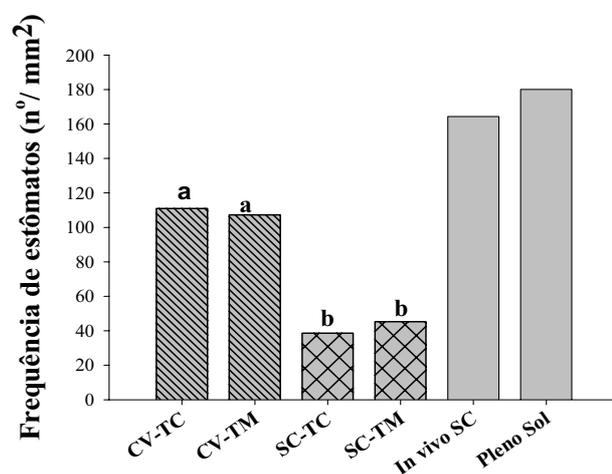


FIGURA 8 Freqüência de estômatos em folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas *in vivo* e durante o enraizamento *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

Castro et al. (2007), estudando alterações de folhas de *Mikania gomerata* Sprengel (*Asteraceae*), verificaram que, em condições de pleno sol (a campo), essas folhas apresentavam, em média, 170 estômatos/mm² e, quando eram submetidas a sombreamento de 30%, a quantidade de estômato por mm² subiu para 217.

Menores densidades foram observadas em plantas cultivadas em sala de crescimento sob vedação dos frascos, tanto com tampa convencional como aqueles vedados com tampa Millipore.

O aumento no número de estômatos no sistema natural (casa de vegetação) demonstra que as plantas *in vitro* apresentam a mesma tendência de aumentar a frequência de estômatos sob maior disponibilidade de luz e CO₂. Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Deccetti et al. (2008).

Silva Júnior (2007) verificou que os estômatos das folhas de plântulas de bastão-do-imperador, mantidas *in vitro*, apresentaram formato circular, indicando sua menor funcionalidade em relação aos de formato elíptico, encontrados nas plântulas aclimatizadas ou em campo. Diversos estudos mencionam que a estrutura dos estômatos das plantas micropropagadas apresenta grandes diferenças em relação à observada nas plantas que se desenvolvem em ambiente natural (Fráguas, 2003).

Observou-se que houve interação significativa entre os fatores ambiente e sistema de vedação dos frascos nas variáveis diâmetros polar e equatorial. Todavia, não foram observadas diferenças significativas para a relação DP/DE (Tabela 5). Ainda assim, maiores relações DP/DE foram obtidas em condições *in vivo* (Tabela 6).

TABELA 5 Diâmetro equatorial (DE), diâmetro polar (DP), relação DP/DE em folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro*, em meio WPM, sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

| Sistema de vedação | Diâmetro equatorial (μm) | | Diâmetro polar (μm) | | Relação DP/DE (μm) | |
|-----------------------|---|---------|-------------------------------------|---------|------------------------------------|-------|
| | SC | CV | SC | CV | SC | CV |
| TC | 11,01aA | 8,64bB | 26,68aA | 19,90bB | 2,54a | 2,40a |
| TM | 8,52bB | 10,78aA | 16,11bB | 21,01aA | 1,92a | 2,00a |

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha não diferem estatisticamente, a 5%, pelo teste F.

Maiores médias para diâmetro equatorial foram obtidas em sala de crescimento com sistema de vedação convencional (11,01 μm), seguido do tratamento casa de vegetação com sistema de vedação Millipore (8,52 μm). Foram verificadas diferenças significativas entre os tipos de vedações dos frascos para o diâmetro equatorial. Plantas mantidas em casa de vegetação com tampa Millipore na vedação dos frascos apresentaram médias significativamente superiores, comparadas aos tratamentos com uso de tampa convencional.

Foram verificadas maiores médias para diâmetro polar em condições de cultivo *in vivo* em folhas de plantas a pleno sol, seguido de plantas matrizes cultivadas em sala de crescimento (Tabela 6), diferentemente da anatomia *in vitro*, em que o melhor resultado foi casa de vegetação com sistema de vedação Millipore. Quando se utilizou tampa Millipore em ambiente casa de vegetação, foi observado um aumento significativo no diâmetro polar (Tabela 5).

TABELA 6 Diâmetro equatorial (DE), diâmetro polar (DP), relação DP/DE em folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vivo*, sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e a pleno sol. Lavras, MG, 2008.

| Ambiente de cultivo | Diâmetro equatorial (μm) | Diâmetro polar (μm) | Relação DP/DE |
|---------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| <i>In Vivo</i> | | | |
| Pleno sol | 13,88a | 37,04a | 2,72a |
| Matriz (SC) | 13,18a | 30,46b | 2,42b |

As médias dentro da coluna seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si, pelo teste F, a 5%.

É notório, quanto o uso de vedação com tampa Millipore no ambiente casa de vegetação, que as respostas dessas condições de cultivo são mais eficientes quando comparadas às do ambiente sala de crescimento quando se utilizou a mesma vedação dos frascos.

As plantas cultivadas em pleno sol apresentaram estômatos com maior diâmetro equatorial e polar, seguidas das cultivadas em sala de crescimento. Maiores resultados foram observados para diâmetro polar em condições *in vivo*. Nas condições de cultivo *in vitro*, o sistema de vedação para o qual ocorreu maior diâmetro polar foi com tampa convencional em sala de crescimento.

A funcionalidade dos estômatos sob diferentes condições de cultivo, condições estas que se aproximem ao ambiente natural, pode impedir a excessiva dessecação das plantas micropropagadas após o transplante, aumentando as taxas de sobrevivência durante o processo de aclimatização (Braga, 2007). De acordo com Khan et al. (2003), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam um funcionamento normal.

As variações nas características das células epidérmicas das folhas de *Annona glabra* sob os diferentes ambientes de cultivo são demonstradas na Figura 9.

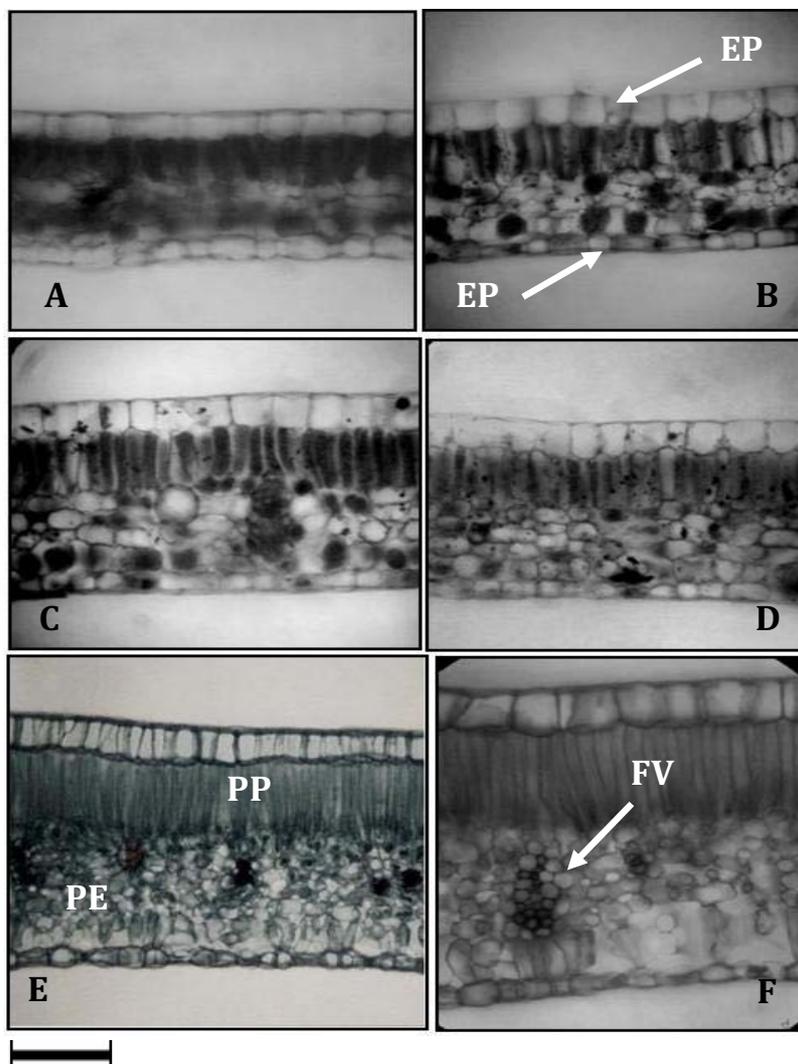


FIGURA 9 Fotomicrografia de seções transversais de folhas de *Annona glabra* L. cultivada *in vitro* sob influência de diferentes ambientes e vedações dos frascos: SC-TC (A), SC-TM (B); CV-TC (C); CV-TM (D); pleno sol (E); matriz em SC; (F) sala de crescimento (SC), tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). EP – epiderme, PP – parênquima paliçádico, PE – parênquima esponjoso e FV – feixe vascular. Lavras, MG, 2008. Barras = 50µm.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio das análises da superfície foliar na face abaxial da epiderme e da face abaxial de *A. glabra* L., pode-se confirmar que suas folhas são hipoestomáticas.

As análises estruturais revelaram que os estômatos sofreram alterações quando as plantas foram submetidas aos ambientes com os diferentes tipos de vedações dos frascos.

Em ambiente casa de vegetação com uso de tampas convencionais na vedação dos frascos, verificaram-se danos na superfície da epiderme. Na face abaxial da epiderme, as células-guarda apresentam-se deformadas e os estômatos mal formados. Foram observadas alterações na superfície adaxial da epiderme das folhas de plantas que cresceram no ambiente sala de crescimento, nos diferentes tipos de vedações testados. Resultados semelhantes foram reportados em jojoba (Apóstolo & Llorente, 2000), em videiras (Santos, 2007) e em berinjeleira (Picoli et al., 2001), em que foram encontradas anormalidades na forma e no tamanho das células-guarda.

Quando foram utilizadas como vedação dos frascos as tampas Millipore, constatou-se que os estômatos apresentavam-se aparentemente normais e mais elípticos. Constatou-se maior deposição de cera nos tratamentos em casa de vegetação, principalmente em frascos vedados com tampa Millipore. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de videiras (Santos, 2007). Tanto em sala de crescimento como em casa de vegetação, observou-se menor deposição de ceras nas folhas de plantas cultivadas em frascos vedados com tampa convencional. Outro fato observado foi nas células da epiderme, as quais se apresentaram mais alongadas nos tratamentos com tampa convencional, quando mantidas tanto em sala de crescimento como em casa de vegetação.

Nas Figuras 10 e 11 podem ser observadas as variações na morfologia dos estômatos e as alterações nas epidermes das folhas.

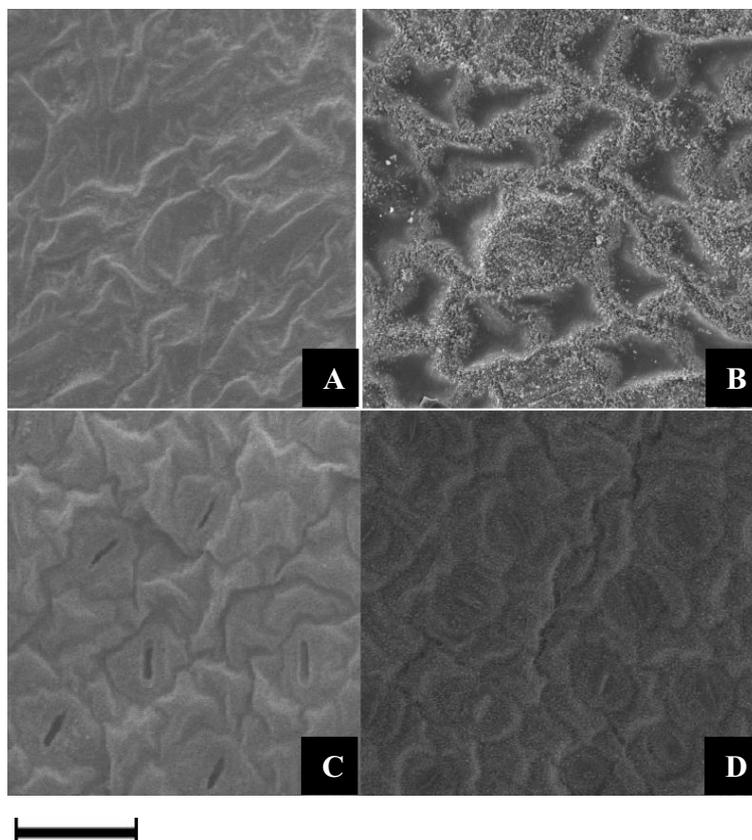


FIGURA 10 Eletromicrografias de varredura da face adaxial da epiderme (A, B) e da face abaxial da epiderme (C, D) de folhas de *Annona glabra* L. sob influência de diferentes ambientes e vedações dos frascos: SC-TC (A, C), SC-TM (B, D). Sala de crescimento (SC), tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008. Barras = 50 μ m.

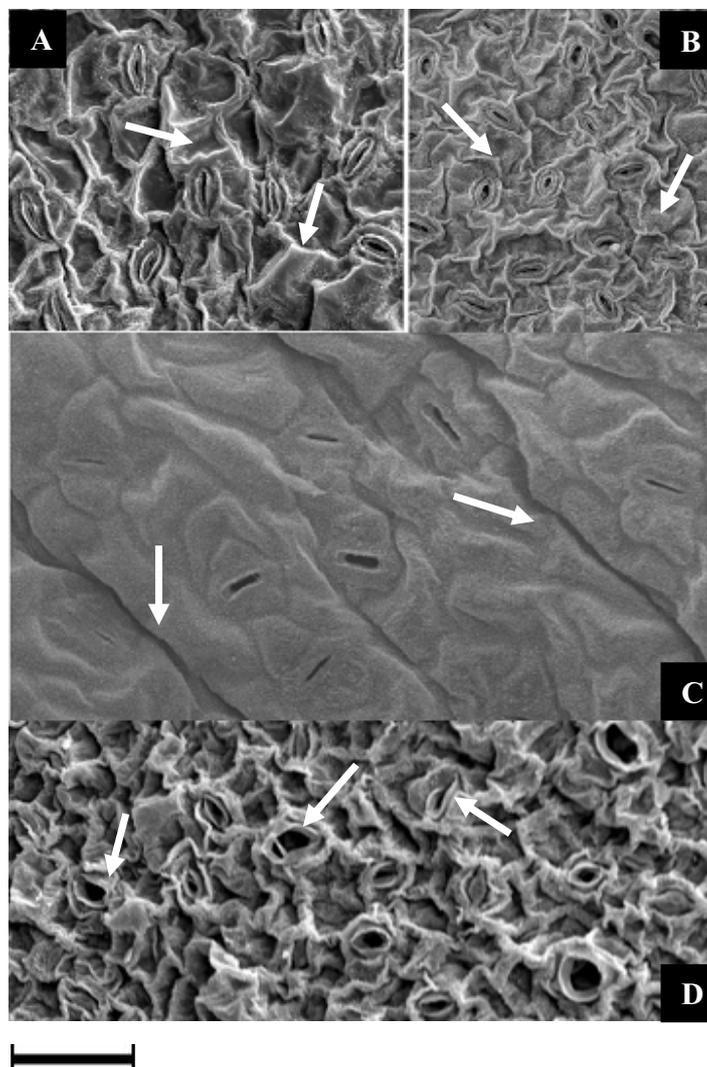


FIGURA 11 Eletromicrografias de varredura da face abaxial da epiderme de folhas de *Annona glabra* L. sob influência de diferentes ambientes e vedações dos frascos: CV-TC (A, C), CV-TM (B, D), SC-TC (C). Sala de crescimento (SC), casa de vegetação (CV), tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Setas em A e B, danos na superfície da epiderme, em C formação de sulcos na superfície e, em D, anomalias nos estômatos. Lavras, MG, 2008. Barras = 50 μ m.

De acordo com Santos (2007), as alterações nos estômatos associados à redução ou à ausência de cera nas folhas das plantas cultivadas *in vitro* relacionam-se à baixa capacidade fotossintética potencial dessas plantas, possivelmente algumas das causas que limitam a sobrevivência das mesmas sob condições *ex vitro*. Ainda assim, a redução na deposição de cera está mais associada à maior dificuldade de controlar a perda de água das plantas cultivadas *in vitro*.

As células da epiderme das plântulas mantidas *in vitro* apresentam-se mais sinuosas e dotadas de parede menos espessas, o que pode estar relacionado com o fato de essas plântulas não apresentarem, ainda, características adaptativas contra a perda excessiva de água.

5.5 Aclimatização das plantas de *Annona glabra* L.

Tanto as plantas cultivadas em sala de crescimento como aquelas provenientes de casa de vegetação tiveram 100% de sobrevivência. A avaliação realizada 15 dias após o período de 21 dias de aclimatização demonstrou que o comprimento da parte aérea foi significativamente influenciado, tanto pelos tipos de vedação como pelos ambientes de cultivos.

Em decorrência dessas observações, constatou-se que o ambiente casa de vegetação e a vedação com tampas Millipore favoreceram o crescimento e o desenvolvimento das plantas de *Annona glabra* L.

Todas as plantas sobreviventes mostraram-se vigorosas, porém, observou-se que, aos 36 dias, houve variação no crescimento das plantas mantidas em sala de crescimento. Plantas com maior comprimento foram obtidas nas condições de cultivo em casa de vegetação, sob sistema de vedação com tampas Millipore (24,89 cm) (Figura 12). Esses resultados eram esperados devido ao vigor desenvolvido nas plântulas cultivadas com esse tipo de vedação e à maior disponibilidade de luz.

Plântulas cultivadas com tampas convencionais na vedação dos frascos apresentaram comprimento inferior (20,46 cm), comparadas àquelas cultivadas com tampas Millipore (24,89 cm) sob ambiente casa de vegetação. Sob cultivo em sala de crescimento com as tampas convencionais, as plantas atingiram 12,33 cm, enquanto, sob vedação com tampas Millipore, as plantas atingiram comprimento máximo de 21,18 cm.

Os resultados corroboram com Deccetti (2000), na aclimatização de mudas também de *A. glabra* L. De maneira semelhante, Santos (2001) concluiu que foi possível a aclimatização de mudas de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, por um período de 21 dias, provenientes da micropropagação *in vitro*.

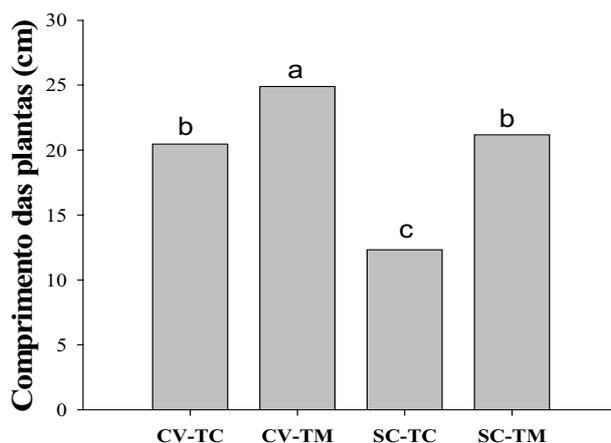


FIGURA 12 Eficiência de aclimatização em plantas de *Annona glabra* L. após desenvolvimento *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). Lavras, MG, 2008.

Em casa de vegetação, verificou-se melhor aclimatização que aquelas em sala de crescimento. Dignart (2006) observou que as plântulas de *Cattleya* cultivadas em sala de crescimento tiveram porcentagem de aclimatização inferior àquelas mantidas em casa de vegetação e resultaram em menor taxa de sobrevivência durante o cultivo *in vitro*, ressaltando as vantagens de se trabalhar em casa de vegetação.

No desenvolvimento da metodologia de micropropagação de duas espécies de *Eucalyptus*, Pinedo et al. (1990) obtiveram cerca de 80% de sobrevivência em *E. citriodora*, mas não obtiveram êxito na transferência de *E. tereticornis*. Este resultado deve-se não só às diferenças entre as espécies, mas também às diferenças de cultivo, cujos fatores necessitam ser determinados. Esses fatores devem ser otimizados durante a fase *in vitro* e durante a aclimatização na casa de vegetação, a fim de garantir a máxima sobrevivência das plântulas.

O aspecto visual das plantas de *A. glabra* L. cultivadas após desenvolvimento *in vitro* sob influência dos ambientes sala de crescimento e casa de vegetação e dos tipos de vedações dos frascos tampa convencional e tampa Millipore, pode ser observado na Figura 13.

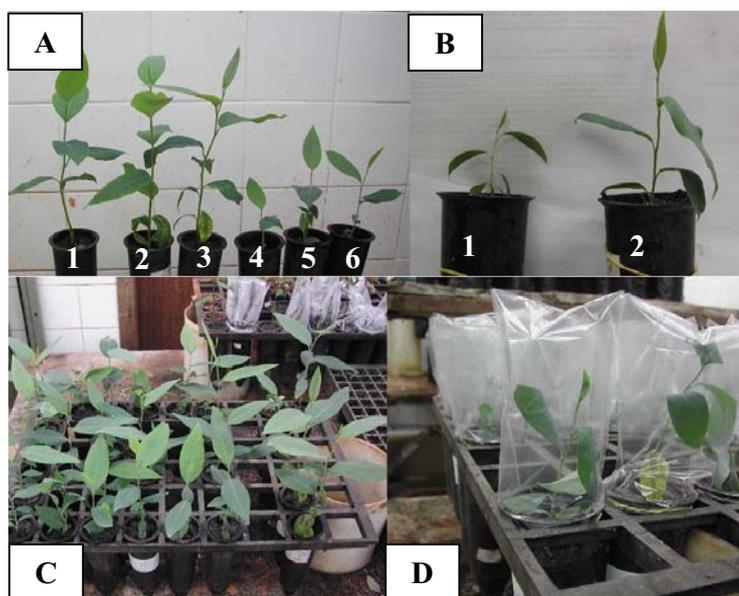


FIGURA 13 Acclimatização de plantas de *Annona glabra* L. Plantas no 36º dia de acclimatização: CV-TM (A-1,2,3) e CV-TC (A-4,5,6). SC-TC (B-1) e SC-TM (B-2). Aspecto geral das plantas mantidas em sala de crescimento (C, D). Sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV); tampa convencional (TC) e tampa Milipore (TM). LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

6 CONCLUSÕES

A influência das mudanças na anatomia, na fisiologia e na bioquímica sobre o comportamento das brotações de *Annona glabra* indica que a espécie apresenta potencial para desenvolver-se fotoautotroficamente sob ventilação natural, com uso das diferentes vedações dos frascos.

O ambiente de cultivo e o tipo de vedação dos frascos causam alterações anatômicas e fisiológicas em *Annona glabra* L., otimizando o crescimento *in vitro* e maximizando a sobrevivência e a qualidade das plantas durante o enraizamento *in vitro*.

Os teores de amido e sacarose nas folhas de *Annona glabra* responderam às variações de ambiente nas vedações dos frascos utilizadas. A maior síntese de AST ocorre em folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação, em frascos vedados com tampa Millipore.

A utilização de luz natural (casa de vegetação) associada ao sistema de vedação com ventilação natural (tampa Millipore) aumenta as taxas de crescimento, o que promove uma adaptação da planta ao ambiente de cultivo, minimizando as injúrias na epiderme e as deformações dos estômatos em *Annona glabra* L.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Curso introdutório microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA, 2004. 51 p.

AMÂNCIO, S.; REBRODÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 31-37, 1999.

APOSTOLO, N.M.; LLORENTE, B.E. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Buenos Aires, v. 36, n. 4, p. 243-249, 2000.

APPEZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006. 438 p.

ARAI, S.; ASAO, H.; KOBATAKE, H. The effect of CO₂ enrichment on the growth and quality of strawberry plantlets regenerated from a shoot-tip culture. **Bulletim of the Nara Agricultural Experiment Station**, Ibaraki, v. 1, n. 22, p. 9-16, 1991.

BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de; DIGNART, S.L. Luz natural e sistemas de vedação na propagação *in vitro* de *Dendranthema grandiflora* TZVELEV cv. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, p. 371-374, 2007.

CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; SOARES, A. M.; MELO, H.C.; BERTALUCCI, S.K.V.; VIEIRA, C. V.; LIMA JÚNIOR, E.C. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (*Asteraceae*), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 8-16, 2007.

CHISTE, E.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Influência do tipo de vedação dos frascos, local de crescimento e sacarose na multiplicação *in vitro* de mirtilo, cultivar Delite. In: XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2006, Pelotas, RS. **Resumos...** Pelotas: Universidade federal de Pelotas, 2006. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos/conteudo_CA.html#00325> Acesso em: 25 de janeiro 2008

COUCEIRO, M.A. **Organogênese *in vitro* em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* DEG.)**. 2002. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DARNELL, R.L.; BIRKHOLOD, K.B. Carbohydrate contribution to fruit development in two phenologically distinct rabbiteye blueberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 6, p. 1132-1136, 1996.

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

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

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

DECCETTI, S.F.C.; SOARES, A.M.; PAIVA, R.; CASTRO, E.M. de. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v. 117, n. 4, p. 341-344, 2008.

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

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

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

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.

FERREIRA, D.F. **SISVAR:** versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003.

FONTES, Z.D.A.G.; SANTOS, A.M. dos; COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A. Luz natural no cultivo *in vitro* de *Musa* spp.: uma alternativa a utilização de lâmpadas fluorescentes na fase de enraizamento. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 1066-1069, 2007.

FRÁGUAS, C.B.; PEREIRA, A.R.; PASQUAL, M. **Aclimatização de plântulas de *Ficus carica* cv. roxo-de-valinhos micropropagadas.** Lavras: UFLA, 2003. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/928.htm>. Acesso em: 27 maio 2007.

GRIBAUDO, I.; RESTAGNO, M.; NOVELLO, V. Vented vessels affect growth rate of *in vitro* *Vitis vinifera* cv. *Nebbiolo*. **Acta Horticulture**, Brugg, v. 1, n. 616, p. 129-133, 2003.

HESS, C.E. Internal and external factors regulating root initiation. In: WHITTINGTON, W.J. (Ed.). **Root growth**. London: Butterworth, 1969. p. 42-53.

KHAN, S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, 2003.

- KLICH, M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 44, n. 3, p. 171-183, 2000.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1999.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 4, p. 525-537, 2001.
- KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 12, p. 1312-1314, 1992.
- KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v. 35, n. 4, p. 296-298, 1999.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 198 p.
- LEE, D.W.; OBERBAUER, S.F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S.K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Missouri, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.
- LEMOS, E.E.P. Organogênese e micropropagação em anonáceas. In: WORKSHOP SOBRE AVANÇOS NA PROPAGAÇÃO DE PLANTAS LENHOSAS, 3., 2000, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2000. p. 4-21.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MONACO, L.C.; SONDAHL, M.R.; CARVALHO, A. Application of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAY, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 109-129.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, p. 136-175, 1944.

NERY, F.C.; ALVARENGA, A.A. de; JUSTO, C.F.; CASTRO, E.M. de; SOUZA, G.S. de; ALVES, E. Aspectos anatômicos de folhas de plantas jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 129-131, jul. 2007.

NOBEL, P.S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. San Diego: Academic, 1991. 635 p.

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

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 48, n. 1, p. 21-24, 1995.

PICOLI, E.A.; OTONI, W.C.; FIGUEIRA, M.L.; CAROLINO, S.M.B.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, E.A.M.; CARVALHO, C.R.; FONTES, E.P.B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 3, p. 857-868, 2001.

PINEDO, D.N.H.; GRAÇA, M.E.C.; ARAÚJO, A.J. Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. p. 361-372.

SANTANA, J.R.F. de; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; LEMOS, E.E.P. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured *in vitro*. **Fruits**, Paris, v. 58, n. 4, p. 357-361, 2003.

SANTANA, J.R.F. de; PAIVA, R.; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M. de. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L.: desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008.

SANTOS, C.G. **Micropropagação e caracterização bioquímica-anatômica em *Coffea arábica* e *Coffea canephora***. 2001. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, R.P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro***. 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I.; MATAS, J.; ARAUS, J.L. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, n. 3, p. 217-230, 1997.

SILVA JUNIOR, J.M. da. **[*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos**. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TOMÉ, P.H.F. **Sistema de análise de alimentos**. [S.l.: s.n.], 2001.

TSAY, H.S.; LEE, C.Y.; AGRAWAL, D.C.; BASKER, S. Influence of ventilation closure gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. ***In vitro cellular and Developmental Biology-Plant***, Wallingford, v. 42, n. 5, p. 445-449, 2006.

YUE, D.; DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A. Photosynthetic capacity and effects of forced ventilation on growth of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Acta Horticulturae**, Brugg, v. 20, p. 123-126, 1993.

CAPÍTULO IV

EVOLUÇÃO DE O₂ FOTOSSINTÉTICO, TEORES DE CLOROFILA E PERDA DE ÁGUA DE PLANTAS DE *Annona glabra* L. SOB DIFERENTES AMBIENTES DE CULTIVO

1 RESUMO

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. Evolução de O₂ fotossintético, teores de clorofila e perda de água de plantas de *Annona glabra* L. sob diferentes ambientes de cultivo. In: _____. **Ambiente de cultivo na micropropagação de *Annona glabra* L.** 2008. cap. 4, p. 109-137. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. *

Conduziu-se este trabalho com o objetivo de determinar o potencial fotossintético, perda de água do tecido foliar e os teores de clorofilas de plantas de *Annona glabra* L nas fases de multiplicação e enraizamento. As plantas cresceram sob diferentes ambientes de cultivo (Sala de crescimento e Casa de vegetação) e sistema de vedação dos frascos (tampas plásticas transparentes e selamento com parafilme, caracterizado como sistema convencional e tampas plásticas modificadas, com poros de 0,5 µm como sistema de ventilação natural). Após a inoculação em meio WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, os frascos com as brotações foram mantidos na sala de crescimento sob radiação fotossintética ativa de 45-56 mol m⁻²s⁻¹ a 25 ± 2° C e em casa de vegetação, sob iluminação e temperatura natural. Houve variabilidade nas taxas de fotossíntese potencial, teores de clorofila e nos teores de água do tecido foliar entre as duas fases da micropropagação de *A. glabra* L. As plantas submetidas às condições de casa de vegetação sob sistema de vedação com tampa Millipore apresentaram respostas superiores nas taxas fotossintéticas durante a multiplicação em relação à fase do enraizamento *in vitro*. Os maiores teores de clorofila *a*, *b* e total nas folhas foram obtidos durante a fase de enraizamento, quando comparadas à fase de multiplicação. Plantas sob condições *in vivo* apresentaram teores mais elevados de clorofilas nas folhas, seguidas daquelas cultivadas em condições *in vitro* no ambiente casa de vegetação com tampa Millipore na vedação do frasco. Ao final da avaliação, a perda total de água foliar das plantas cultivadas sob sistema convencional foi de cerca de 80%, valor similar ao observado para as plantas *in vivo* cultivadas na sala de crescimento. Plantas cultivadas em casa de vegetação apresentam uma menor velocidade inicial de perda de água, em relação às plantas cultivadas em sala de crescimento. As plantas de *A. glabra* L. apresentaram adaptabilidade às condições de cultivo e características fotossintéticas apropriadas para a propagação *in vitro*, demonstrando grande plasticidade, quando submetida a diferentes condições de cultivo.

* Comitê de orientação: Renato Paiva, PhD – UFLA. (Orientador), Dr^a. Angela Maria Soares – UFLA. (Co-orientadora).

2 ABSTRACT

MOREIRA, Cleilton Vasconcelos. Evolution of photosynthetic O₂, chlorophyll levels and water loss of *Annona glabra* L. plants under different culture environments. In: _____. **Culture environment in the micropropagation of *Annona glabra* L.** 2008. chap. 4, p. 109-137. Dissertation (M.Sc. in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. *

The objective of this work was to determine the photosynthetic potential, water loss of the leaf tissue and chlorophyll levels of *Annona glabra* L plants during the *in vitro* multiplication and rooting phases. The plants were grown under different culture environments (growth room and greenhouse) and flask seal systems [transparent plastic cap and sealing with parafilm (conventional system) and modified plastic cap, with 0.5 µm pores (natural ventilation)]. After the inoculation in WPM medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 1 g L⁻¹ activated charcoal, the flasks with the buds were maintained in a growth room under active photosynthetic radiation of 45-56 mol m⁻² s⁻¹, 25 ± 2° C and in greenhouse, under natural temperature and illumination. There was Variability in the rates of potential photosynthesis; chlorophyll levels and leaf water content between the two phases of the micropropagation were observed. Plants submitted to greenhouse conditions using closure system with Millipore cap presented higher photosynthetic rates during the multiplication when compared to the *in vitro* rooting phase. Higher *a b* and total leaf chlorophyll levels were obtained during the rooting phase, when compared to the multiplication phase. Plants under *in vivo* conditions presented higher levels of chlorophylls in the leaves, followed by those cultivated on *in vitro* conditions on greenhouse environment using Millipore cap as flask seal. At the end of the evaluation, the total loss of leaf water of plants cultivated under conventional system was around 80%, similar to the value observed for the *in vivo* grown plants cultivated in growth room. Plants cultivated in greenhouses present a reduced initial water loss velocity, in relation to the plants cultivated in growth room. The plants of *A. glabra* L. presented adaptability to the culture conditions and adequate photosynthetic characteristics for *in vitro* propagation, showing a high plasticity when submitted to different culture conditions.

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Adviser), – UFLA, Dr. Angela Maria Soares (Co-Adviser). – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Os estudos fisiológicos de fatores ambientais ligados à atividade fotossintética de plantas em cultura de tecidos são fundamentais para o processo de propagação *in vitro*, bem como o monitoramento do material vegetal até as condições *ex vitro*.

As plantas produzidas por micropropagação apresentam marcantes mudanças morfológicas e fisiológicas no âmbito celular, de tecidos e de órgãos (Chenevard et al., 1997). Essas alterações reduzem a capacidade de sobrevivência e de crescimento dessas plantas após a transferência para o ambiente natural, visto que diminuem a habilidade delas em controlar eficientemente os processos de perda e absorção de água, mantendo um balanço hídrico favorável e a capacidade de suprir a necessidade de energia e carbono por meio da fotossíntese.

Segundo Pasqual (2001), uma vez que as plantas *in vitro* têm certa habilidade fotossintética e desenvolvem autotrofia, tem sido sugerido que, na presença de fatores físicos do ambiente, como o CO₂ e luz, não é necessário adicionar sacarose ao meio de cultura. Dubé & Vidaver (2006) mostraram que a elevação da intensidade luminosa, fornecida durante o cultivo *in vitro*, resultou no aumento na fotossíntese.

As taxas fotossintéticas das plântulas micropropagadas e de mudas são altamente dependentes do ambiente *in vitro*. O fornecimento de condições favoráveis à fotossíntese resulta em um crescimento autotrófico para o cultivo *in vitro*. Além disso, a modificação nas condições ambientais dentro dos frascos de culturas pode melhorar a aclimatização.

Em bananeira, Kodym & Zapata-Arias (1999) utilizaram a luz natural numa intensidade média de 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de DFFFA, temperatura de 23-30 °C e fotoperíodo de 12-16 horas. Nestas condições, houve a maior produção de

brotos comparativamente a plantas crescidas em luz artificial a $65 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de 23 – 29 °C e fotoperíodo de 16 horas.

A micropropagação fotoautotrófica (sem sacarose) apresenta várias vantagens sobre o método heterotrófico (com sacarose), tais como aumento do crescimento das plantas, redução do risco de contaminação microbiana, melhoria das características fisiológicas da planta e redução do estresse da planta durante a aclimatização. Segundo Zobayed et al. (2002), outra grande vantagem da micropropagação fotoautotrófica é a possibilidade de usar grandes recipientes de cultura, com o risco mínimo de contaminação e, por conseguinte, otimizar o crescimento do explante sem uma elevação nos custos e na contaminação do meio de cultivo. Respostas benéficas advindas do uso da luz natural (Casa de vegetação) foram também reportadas por Talavera et al. (2005) em plantas de *Cocos nucifera* L., que tiveram maior taxa fotossintética do que aquelas cultivadas em sala de crescimento convencional.

Nesse sentido, em virtude das dificuldades para propagação e obtenção de mudas por vias convencionais do araticunzeiro, torna-se necessário o estudo de aplicações mais nobres dos aspectos relacionados à micropropagação fotoautotrófica e utilização da luz natural.

Portanto, a luz natural pode ser satisfatoriamente utilizada e aumentar a eficiência das técnicas de micropropagação. Sendo assim, objetivou-se induzir o estímulo do comportamento fotoautotrófico e investigar a resposta aos efeitos do ambiente de cultivo e do tipo de vedação dos frascos, utilizando-se variáveis fisiológicas como a evolução de oxigênio fotossintético, os teores de clorofila e a perda de água das folhas de plantas micropropagadas *in vitro* de *A. glabra* L., para potencializar a tecnologia convencional de aclimatização e eliminar efetivamente o problema de mudança das condições *in vitro* para *ex vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico e condições experimentais

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para servirem como fonte de material botânico, as plantas matrizes foram mantidas em sala de crescimento, sob condições ambientais controladas. Os segmentos nodais foram obtidos por meio da secção das hastes caulinares jovens (não lenhosas), derivados das matrizes com três anos de idade, oriundas da germinação *in vitro* de sementes coletadas no jardim clonal do CPATU/Embrapa, Belém, PA.

Multiplificação

Os explantes (segmentos nodais) foram inoculados em frascos contendo 30 mL do meio MS, solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar e suplementado com 20,0 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio cultura foi ajustado para 6,0, antes da autoclavagem.

Foi inoculado um segmento nodal por frasco, que foi vedado com dois sistemas diferentes: tampas plásticas transparentes e selamento com parafilme, que restringem as trocas de gases entre o recipiente e a atmosfera externa (sistema convencional) e tampas plásticas modificadas, contendo um par de orifícios (10 mm de diâmetro) cobertos por dois filtros de membranas permeáveis a gases (Milliseal, Millipore, Tokyo) com poros de 0,5 µm, que aumentam a ventilação no recipiente de cultivo (sistema de ventilação natural). Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de crescimento no escuro, durante 15 dias.

Após o período de escuro, os recipientes foram transferidos para dois ambientes: sala de crescimento (SC) sob condições de alta irradiância ($300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em (temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e em casa de vegetação (CV), sob iluminação e temperatura natural. Na casa de vegetação, os frascos foram mantidos sobre uma bancada aberta, cerca de 1,5 m de altura e sob tela sombrite que permite uma interceptação de 70% da luz solar incidente.

Na área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, o ambiente da casa de vegetação foi caracterizado por um piranômetro acoplado a um datalogger (LI – 1400 – LI-COR, Lincoln, Neb.) e por um termo-higrógrafo. Os valores médios observados foram temperatura máxima de $36 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura mínima de $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar máxima de $59 \pm 8\%$ e mínima de $35 \pm 8\%$. A radiação global média, na altura do recipiente de cultivo, foi de $520 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nas semanas de avaliação.

Enraizamento

Para promover o enraizamento *in vitro*, foram utilizadas brotações com, no mínimo, 2,0 cm de comprimento e 2 a 3 folhas mais próximas do meristema apical, obtidas a partir de segmentos nodais de *A. glabra* L. germinadas *in vitro* e mantidas sob condições controladas em sala de crescimento. As plantas que vinham sendo mantidas *in vitro* foram removidas do meio de multiplicação e transferidas para frascos contendo 50 mL do meio *Wood plant medium* (WPM), com metade da concentração dos sais, enriquecidos com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com 6 g L^{-1} de Agar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar com adição de 1 g L^{-1} de carvão ativado, de acordo com protocolo estabelecido por Deccetti (2000). Inoculou-se apenas uma brotação em cada frasco, em câmara de fluxo laminar. Foram mantidas as mesmas condições de vedação dos recipientes de cultivo descritos na fase anterior e os mesmos ambientes.

Os frascos após serem fechados com os diferentes tipos de vedação, foram transferidos para dois ambientes: sala de crescimento (SC) sob condições controladas de radiação ($43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e em casa de vegetação (CV), sob iluminação e temperatura natural.

A caracterização do comportamento diurno da radiação solar e da temperatura do ar foi feita por meio de medidas dessas variáveis em dias de céu aberto, durante o período de cultivo (12/02/2008 a 12/03/2008), apresentando os seguintes parâmetros ambientais: (temperaturas máximas, mínimas e médias de $26 \text{ }^\circ\text{C}/ 32 \text{ }^\circ\text{C}; 16 \text{ }^\circ\text{C}/ 16 \text{ }^\circ\text{C}$ e $20 \text{ }^\circ\text{C}/ 23 \text{ }^\circ\text{C}$) e (irradiâncias máximas, mínimas e médias de $93,95 \text{ W.m}^{-2}/ 199,69 \text{ W.m}^{-2}; 11,13 \text{ W.m}^{-2}/ 10,66 \text{ W.m}^{-2}$ e $49,38 \text{ W.m}^{-2}/ 99,43 \text{ W.m}^{-2}$).

Na casa de vegetação do Departamento de Agricultura, os frascos foram mantidos sobre uma bancada aberta, cerca de 1,5 m de altura, e sob tela sombrite que permite uma interceptação de 50% da luz solar incidente.

4.2 Variáveis avaliadas

O estudo das características fotossintéticas das plantas sob influência dos diferentes ambientes de cultivo e dos dois tipos de vedações dos frascos foi realizado ao final de 30 dias das fases de multiplicação e enraizamento do araticunzeiro. Para efeito de comparações, foram também realizadas avaliações em plantas *in vivo* com o mesmo número de folhas expandidas. Foram realizadas avaliações de evolução de O_2 fotossintético, perda de água do tecido foliar e do teor de clorofila.

4.2.1 Evolução de O_2 fotossintético

Para determinar a resposta fotossintética das brotações que cresceram sob os diferentes ambientes de cultivo, foram medidas taxas de evolução do O_2 fotossintético, utilizando-se o monitor de oxigênio com eletrodo tipo Clark

(Hansatech, UK) sob saturação de CO₂ e temperatura ótima de 35 °C. As avaliações foram realizadas utilizando-se densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) saturante de 1.400 μmol m⁻²s⁻¹, conforme determinado por Deccetti (2004), por um quantômetro acoplado a um porômetro (modelo 1600M; LI-COR, Lincoln, Neb.). A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada de halogênio.

Em cada determinação, foram utilizadas folhas expandidas de duas brotações, com aspecto visual semelhante e procedeu-se à medida da área foliar. Para cada condição ambiental foram realizadas três determinações (repetições).

4.2.2 Teores de clorofila

Para quantificar os teores de clorofila ao final da fase de multiplicação, foram utilizadas três amostras de 100 mg de tecido foliar fresco para cada ambiente de cultivo. Por conseguinte, a determinação do teor de clorofila da fase de enraizamento foi realizada, no final do período experimental, em seis plantas por tratamento, tomadas aleatoriamente.

De cada planta foram retiradas as folhas completamente expandidas e acondicionadas em papel alumínio. Posteriormente, foram colocadas em caixa de isopor e mantidas em refrigerador.

As concentrações de clorofila *a*, *b* e total foram determinadas de acordo com o método de Arnon (1949), após a obtenção dos dados de absorbância com base nas leituras em espectrofotômetro a 663 e 645 nm.

4.2.3 Perda de água do tecido foliar

Em intervalos de 10 minutos, durante um período de 110 minutos, discos foliares de 10 mm² foram pesados para determinar a perda de água dos tecidos. Foram utilizados seis discos foliares (folhas expandidas) para cada tratamento,

da fase de multiplicação. No final do período, os discos foram submetidos à secagem em estufa, a 60 °C, por 48 horas, para a obtenção da massa seca.

Os valores de perda de água foram expressos como porcentagem do conteúdo total de água do tecido foliar.

4.3 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, sendo constituídos, durante as fases de multiplicação e enraizamento, por seis tratamentos de cultivo *in vitro*, num fatorial de 2x2x2: (2 ambientes: SC e CV) x (2 sistemas de vedação do recipiente de cultivo) x (2 fases da micropropagação). As plantas a pleno sol e as plantas matrizes foram tratamentos adicionais, como testemunhas. O esquema experimental pode ser observado na Figura 1.

O programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 2003) foi utilizado para a realização das análises de variância e dos testes para a comparação dos contrastes entre médias. As médias foram comparadas pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

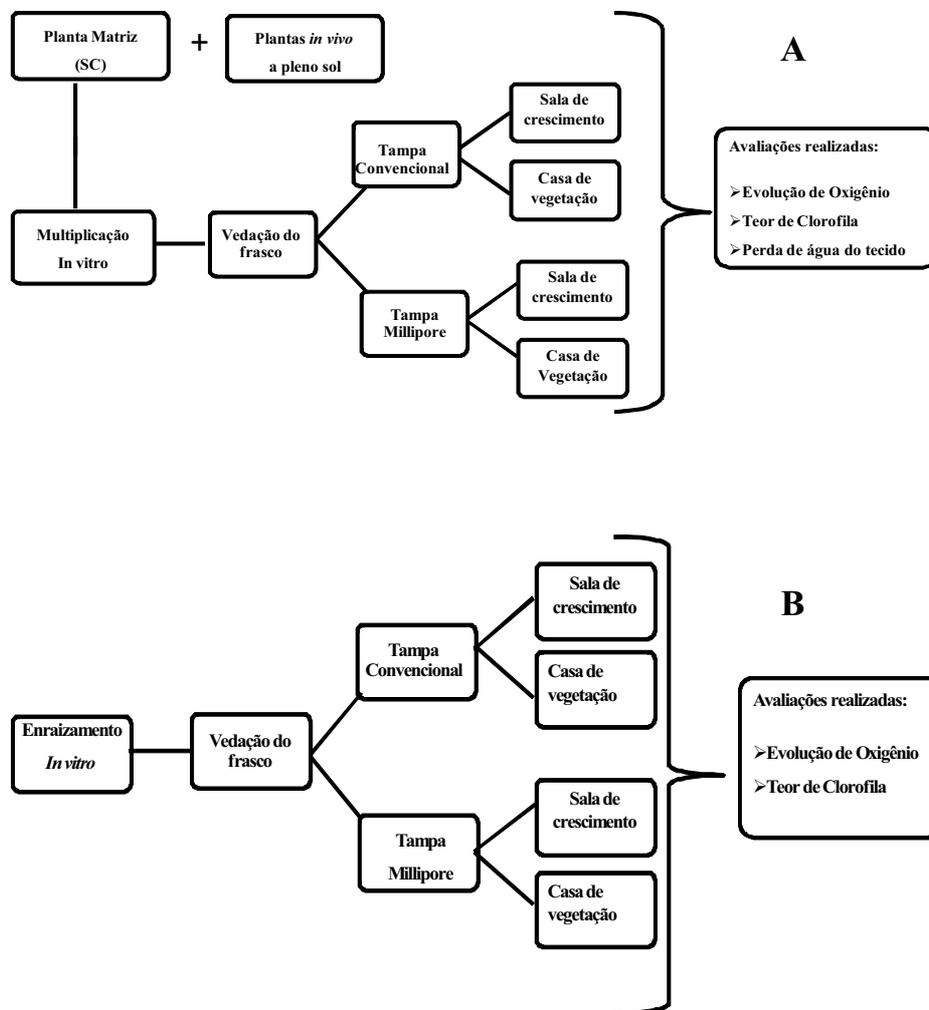


FIGURA 1 Esquema experimental das duas fases da micropropagação de *Annona glabra* L.: (A) multiplicação, (B) enraizamento. LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Evolução de O₂ fotossintético

O potencial fotossintético, expresso pela taxa de evolução de oxigênio, das brotações submetidas aos ambientes de casa de vegetação e sala de crescimento e aos dois sistemas de vedação, foi avaliado no final das fases de multiplicação e enraizamento.

Os resultados deste estudo mostram que o ambiente de cultivo e o tipo de vedação dos frascos alteram de forma significativa o desempenho fotossintético de plantas de *Annona glaba* L. para o ambiente sala de crescimento (Figura 2A). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) no potencial fotossintético quando são comparados os dois sistemas de vedação dos recipientes. No ambiente casa de vegetação, o sistema de vedação que permite a ventilação natural proporcionou maior capacidade fotossintética do que o sistema de vedação convencional. Dentre os dois ambientes avaliados, na fase de multiplicação, os maiores valores da taxa de evolução de oxigênio foram observados no ambiente casa de vegetação ($P<0,05$).

Em geral, a intensidade da luz na faixa de 400 a 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ melhora a atividade fotossintética (Desjardins, 1995). Irradiâncias superiores àquelas necessárias para saturar a fotossíntese podem causar fotoinibição da fotossíntese.

O potencial fotossintético das plantas *in vivo* utilizadas como matrizes e mantidas em condição de sala de crescimento foi semelhante ao observado para as plantas cultivadas *in vitro* sob as mesmas condições ambientais ($P>0,05$). Já as plantas mantidas em ambiente natural, a pleno sol, apresentaram potencial fotossintético semelhante ao observado para as plantas *in vitro* cultivadas em casa de vegetação, utilizando sistema de vedação convencional.

As brotações *in vitro* na fase de enraizamento (Figura 2B) apresentaram diferentes respostas fotossintéticas às condições de cultivos testadas. No

ambiente casa de vegetação com vedação da tampa Millipore, as taxas fotossintéticas atingiram $25,6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto, sob vedação convencional em ambiente sala de crescimento, as taxas máximas foram de $14,1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Maiores taxas fotossintéticas são evidenciadas no ambiente casa de vegetação, tanto na fase de multiplicação como na fase de enraizamento das brotações de *Annona glabra* L.

Resultados semelhantes foram reportados por Deccetti et al. (2008), trabalhando com a mesma espécie de Annonácea, sob diferentes níveis de irradiância.

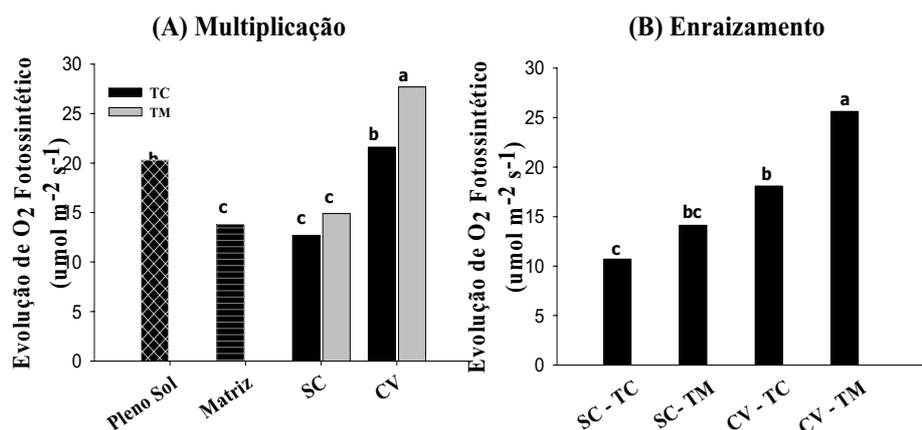


FIGURA 2 Taxas de evolução do O₂ fotossintético das brotações de *Annona glabra* L. ao término da multiplicação (A) e do enraizamento (B) *in vitro* sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC), casa de vegetação (CV) e de plantas *in vivo* em ambiente natural (pleno sol e matriz mantida em (SC) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Millipore (TM), medido a $1.400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os resultados indicam que, nas brotações cultivadas em sala de crescimento, as taxas fotossintéticas, independente do tipo de vedação, foram inferiores nas duas fases da micropropagação, quando comparadas as taxas fotossintéticas das plantas em casa de vegetação. Porém, quando se considera a taxa fotossintética máxima sob vedação Millipore, em casa de vegetação, podem ser observadas taxas superiores. Nas condições comumente utilizadas na multiplicação e no enraizamento da *Annona glabra* L., sob cultivo em sala de crescimento, podem ser observadas variações não significativas na capacidade fotossintética das brotações em ambas as fases da micropropagação.

DaMatta et al. (2007) relataram que, independentemente da irradiância, plantas de cafeeiro exibem capacidade fotossintética potencial relativamente elevada ($30-40 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para os dados ora apresentados, as brotações cultivadas em sala de crescimento, sob sistema de vedação convencional, apresentaram taxa fotossintética de $12,7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto, sob mesmo sistema de vedação, em casa de vegetação, a taxa foi de $21,6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Com a utilização de tampas Millipore, verificaram-se as taxas fotossintéticas de $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $14,9 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nos ambientes casa de vegetação e sala de crescimento, ao final da fase de multiplicação, respectivamente.

Portanto, o uso de vedação dos frascos com tampa Millipore promove o aumento na disponibilidade de CO_2 no interior do recipiente de cultivo. Sugere-se que a baixa disponibilidade de CO_2 no interior do recipiente pode contribuir para o desenvolvimento da fotoinibição, pela diminuição do ponto de saturação da fotossíntese pela luz (Decchetti, 2004) e, assim, a redução nas taxas fotossintéticas (Dimassi-Theriou & Bossabalidis, 1997).

Alguns trabalhos realizados sob condições de radiação mostram a ocorrência de fotoinibição, como relatado por Eickmeier et al. (1993), trabalhando com *Selaginella lepidophylla*, sob intensidades de luz de $2.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.s^{-1}$. Decchetti (2004) relata ocorrência de fotoinibição durante a fase de

multiplicação em plantas de *Annona glabra* L. cultivadas sob nível elevado de irradiância e sistema de vedação convencional. Registre-se que, sob sistema de ventilação natural (tampas Millipore), as taxas fotossintéticas atingem valores superiores à taxa fotossintética das brotações sob condição de cultivo convencional (Deccetti, 2004).

Ao término da fase de enraizamento, as brotações produzidas sob ambiente sala de crescimento e sistema de vedação convencional apresentam taxa fotossintética de $10,7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e, no mesmo ambiente com vedação Millipore, a taxa fotossintética foi de $14,12 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 2B). Esses valores são inferiores aos tratamentos submetidos à casa de vegetação. Essa redução da fotossíntese pode ser atribuída à fotoinibição ou ao aparato fotossintético ineficiente, característico do hábito heterotrófico das plântulas micropropagadas. De acordo com Inoue et al. (1998), as plântulas de *Eucalyptus tereticornis* sm. cultivadas com sacarose exibiram uma fotossíntese significativamente menor que aquelas cultivadas na ausência desse carboidrato.

De maneira geral, sob sistema de cultivo natural (casa de vegetação), as taxas fotossintéticas foram superiores em relação ao sistema convencional (sala de crescimento), inclusive sob vedação com tampa Millipore. Nessas condições, ao final do enraizamento, verificaram-se as taxas fotossintéticas de $18,07 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $26,6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com vedação convencional e com tampa Millipore, respectivamente. Deccetti (2004) também demonstrou que, no sistema de ventilação natural (tampa Millipore), foram observados aumentos na taxa fotossintética nos níveis de irradiâncias testados, no cultivo *in vitro* de *Annona glabra*, sugerindo maior habilidade fotossintética na fase de enraizamento. Registre-se que maiores níveis de irradiância durante o cultivo *in vitro* podem proporcionar maior capacidade fotossintética às brotações, especialmente quando há maior disponibilidade de CO_2 no recipiente de cultivo (Deccetti et al., 2008).

Em algumas espécies cultivadas *in vitro* tem sido demonstrado que o aumento da concentração de CO₂ no interior do recipiente aumenta a fotossíntese e torna as plantas fotossinteticamente mais adaptadas às condições de maior luminosidade. Entre elas, destacam-se o morangueiro (Arai et al., 1991); a Batata (Park et al., 2004); a Videira (Santos, 2007) e em cana-de-açúcar (Crespo, 2007). Niu et al. (1998) também obtiveram maiores taxas fotossintéticas em plantas de *Solanum tuberosum* e *Lycopersicon esculentum* Mill. com o aumento na disponibilidade de luz e CO₂ sob cultivo fotomixotrófico.

Os resultados demonstraram que, durante as fases de multiplicação e enraizamento, a capacidade fotossintética das brotações cultivadas em casa de vegetação aumenta e as brotações respondem positivamente ao ambiente de cultivo com a utilização da tampa Millipore como vedação dos frascos. Sugere-se que o aumento na disponibilidade de luz e CO₂ resulta em plantas com maior habilidade fotossintética.

De maneira geral, o aumento na taxa fotossintética foi verificado, principalmente, na fase de multiplicação. Nessas condições, as brotações podem ter expressado completamente a sua capacidade fotossintética, principalmente com o uso da vedação com tampa Millipore, visto que favoreceram o processo fotossintético pelo aumento das trocas gasosas e disponibilidade de CO₂. Esse fato também foi observado por Deccetti (2004) em brotações expostas a maiores níveis de irradiância.

Cassol et al. (2007) observaram que a taxa fotossintética bruta, expressa como a taxa de evolução do oxigênio, variaram em *Mentha piperita* L. em função da intensidade luminosa. Esse fato pode ter contribuído para uma melhor resposta do aparelho fotossintetizante das brotações produzidas em casa de vegetação à temperatura de 35 °C. Medina et al. (2002) obtiveram aumento de aproximadamente 40% na taxa de fotossíntese de mudas de laranja 'Natal'

nas horas mais quentes do dia com o uso de telas aluminizadas refletoras da luz solar.

De acordo com Deccetti et al. (2008), menores níveis de irradiância mantêm o aparato fotossintético menos adaptado ao aumento nos níveis de irradiância para as plantas de araticunzeiro cultivadas *in vitro* em sala de crescimento. Todavia, a redução gradual das fontes de carboidrato do meio durante o cultivo *in vitro* maximiza a fotossíntese *in vitro* pelo uso de sistemas de ventilação natural e cultivo em ambiente semelhante às condições naturais (casa de vegetação).

5.2 Teores de clorofila

Avaliando-se os teores de clorofilas nas folhas para os tratamentos, foram observadas interações significativas para os fatores ambiente e tipo de vedação dos frascos, nas concentrações de clorofila *a*, *b* e total.

Os maiores teores de clorofila ao final da fase de multiplicação foram observados em brotações sob vedação Millipore e em casa de vegetação. De maneira geral, o conteúdo de clorofila das brotações sob essas condições ambientais é semelhante aos valores observados para as plantas *in vivo* (Tabela 1).

TABELA 1 Teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (*a* + *b*) e razão clorofila *a/b* em plantas *Annona glabra* L. desenvolvidas durante o período de multiplicação e enraizamento sob influência dos ambientes: sala de crescimento (SC), casa de vegetação (CV) e de plantas *in vivo* em ambiente natural (matriz (CV) e pleno sol) e dos tipos de vedações dos frascos: tampa convencional (TC) e tampa Millipore (TM). LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

| Teor de clorofila (mg g ⁻¹ MF)* | | | | | | | | |
|--|-----------|-------|-----------|-------|----------------|-------|------------|-------|
| Sistema de vedação | Clorofila | | Clorofila | | Total | | <i>a/b</i> | |
| | <i>a</i> | | <i>b</i> | | <i>(a + b)</i> | | | |
| Multiplicação | | | | | | | | |
| | SC | CV | SC | CV | SC | CV | SC | CV |
| TC | 0,72a | 0,74b | 0,38b | 0,52b | 1,10a | 1,26b | 1,90a | 1,90a |
| TM | 0,60a | 1,73a | 0,31b | 1,04a | 0,91a | 2,77a | 2,12a | 1,66a |
| Enraizamento | | | | | | | | |
| TC | 1,89a | 1,55b | 0,70a | 0,63b | 2,59a | 2,18b | 2,70a | 2,46a |
| TM | 1,65b | 2,20a | 0,68a | 0,84a | 2,33b | 3,04a | 2,43b | 2,62a |
| <i>In vivo</i> | | | | | | | | |
| Matriz (CV) | 2,79a | | 1,32b | | 4,11a | | 2,12a | |
| Pleno Sol | 1,73b | | 1,03b | | 2,76b | | 1,68a | |

Os valores representam a média de cinco repetições. Em cada fase da propagação e para cada sistema de vedação do frasco, as médias dentro da coluna, seguidas pelas mesmas letras, não diferem entre si, pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A síntese de clorofilas parece ser reduzida em condições *in vitro*. Já em plantas *in vivo* verificaram-se maiores teores de clorofilas *a*, *b* e total, especialmente as plantas matrizes, mantidas em sala de crescimento, que apresentam valores significativamente maiores ($P < 0,05$) que as plantas a pleno sol.

As menores concentrações de clorofila *a* foram observadas em ambiente sala de crescimento, fato observado em ambas as fases da micropropagação. As concentrações de clorofila *a* nesse ambiente não diferiram significativamente nos dois tipos de vedações testadas na fase de multiplicação. Plantas cultivadas *in vitro* em casa de vegetação resultaram em maior média com uso de tampa Millipore na vedação dos frascos.

Para a clorofila *b*, observou-se que os tratamentos com vedação convencional resultaram em menores valores e os demais tratamentos foram similares nas fases de multiplicação e no enraizamento. De maneira contrária, Braga (2006) relata que plântulas de crisântemo cultivadas em sala de crescimento apresentaram maiores teores clorofila *b*. Provavelmente, a diminuição da quantidade de clorofila *b* em relação à clorofila *a* estaria relacionada à menor proporção de Fotossistema II, que é mais rico em clorofila *b* que *a*, em relação ao Fotossistema I.

Diversos autores (Dignart, 2006; Nakazono et al., 2001) têm relatado que não encontraram diferenças significativas para os teores de clorofila *b* em plantas cultivadas sob sombreamento.

A concentração de clorofila total nas folhas sob condições de cultivo em sala de crescimento constitui uma resposta freqüentemente observada, visto que, sob essa condição, a planta investe mais assimilados no complexo proteína-clorofila do aparelho fotossintético para otimizar a captação de luz (Amâncio et al., 1999). Geralmente, a clorofila e os carotenóides tendem a aumentar sua

concentração, com a redução da intensidade luminosa (Ferraz & Silva, 2001; Fontes & Silva, 2001).

Os resultados obtidos para as plantas cultivadas sob vedação Millipore e luz natural, em casa de vegetação, comprovam o melhor desempenho fotossintético observado para essas plantas. Os maiores teores de clorofilas observados para esse tratamento, em relação aos outros cultivos *in vitro*, podem indicar um rápido consumo da sacarose do meio de cultura, o que permite uma maior biossíntese de clorofila ao final da fase de multiplicação.

Registre-se que diversos autores (Adelberg et al., 1999; Kanechi et al., 1998; Chenevard et al., 1997) têm relatado que a presença da sacarose no meio de cultura tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese.

A relação clorofila *a/b* não apresentou diferença entre os tratamentos, na fase de multiplicação, apesar da diferença observada nos teores de clorofila *a*, *b* e total (Tabela 1).

Apesar de alguns estudos indicarem que, na condição *in vitro*, pode ocorrer um decréscimo do conteúdo de clorofilas, tal não se verificou para *Annona glabra* L., no enraizamento das brotações. Foram observados teores de clorofila similares, em alguns casos até superior, às condições de cultivo *in vivo*. Contudo, a utilização de tampas Millipore na vedação dos frascos sob ambiente de casa de vegetação pode ter levado a um aumento da síntese clorofiliana nestas condições de cultivo.

Na fase de enraizamento, verificam-se diferenças estatísticas na relação clorofila *a/b*, para os ambientes e no sistema de vedação dos frascos. A relação de clorofila *a/b* na fase de enraizamento foi maior em sala de crescimento com a vedação convencional dos frascos. Já os menores valores foram obtidos nos tratamentos em casa de vegetação, não diferindo estatisticamente entre as vedações dos frascos (Tabela 1). Esses resultados concordam com Deccetti

(2004), que obteve maiores teores de clorofila *a*, *b* e total nas folhas durante a fase de enraizamento, quando comparadas à fase de multiplicação.

Plantas mantidas sob vedação com tampa Millipore apresentaram variações nos teores de clorofila relativamente superiores, nesta fase, em relação à fase de multiplicação, com valores próximos a 3,04 mg g⁻¹.

Os teores de clorofila *b* na fase de enraizamento mostraram-se superiores comparados à fase de multiplicação. Scalon et al. (2002) afirmam que o aumento da clorofila *b* nas folhas é uma característica importante porque a clorofila *b* capta energia de outros comprimentos de onda e a transfere para a clorofila *a* que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese e representa um mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa.

Os teores de clorofila total das plantas *in vitro* são similares aos relatados por Oliveira (2006), Decchetti (2004) e Santana (2003). Os valores observados são consideravelmente altos, demonstrando que os teores de clorofila não seriam limitantes ao funcionamento do aparato fotossintético *in vitro*. Dessa forma, as condições impostas pela cultura *in vitro* parecem não afetar a síntese e o conteúdo de clorofila em *Annona glabra* L.

5.3 Perda de água do tecido foliar

A perda de água dos tecidos foliares após a retirada das plantas dos recipientes de cultivo, ao final da fase de multiplicação, mostra a influência do sistema de vedação e do ambiente de cultivo (Figura 3).

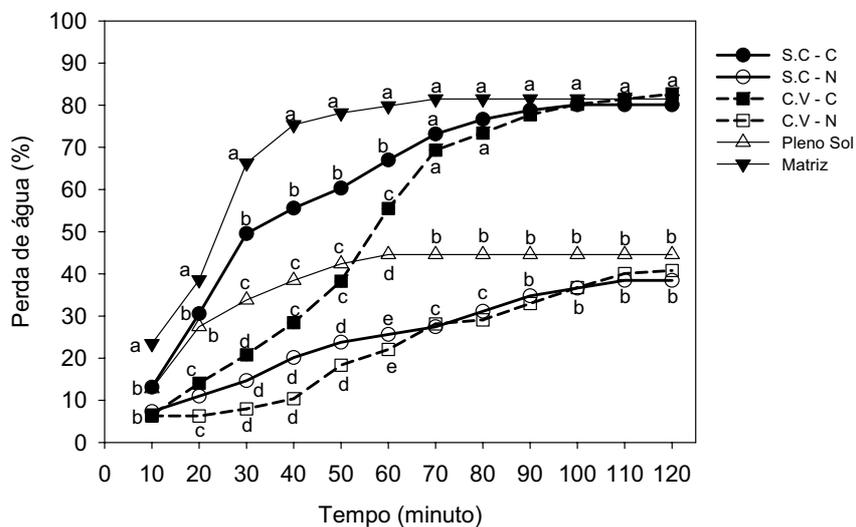


FIGURA 3 Porcentagem de perda de água durante 120 minutos de exposição à umidade relativa de 50-60% das folhas de *Annona glabra* L. desenvolvidas sob sistema convencional (C) ou ventilação natural (N) e em sala de crescimento (SC) e casa de vegetação (CV) e de plantas in vivo em ambiente natural (pleno sol) ou sala de crescimento (matriz). Cada ponto representa a média de 4 repetições. Em cada tempo de determinação, as diferentes letras indicam diferença significativa, a 5% de probabilidade, pelo teste F. LCTP, UFLA, Lavras, MG, 2008.

Observa-se que as plantas cultivadas em recipientes com vedação convencional, independente do ambiente, sofreram uma dessecação mais acentuada nos primeiros minutos de avaliação em relação às plantas cultivadas com sistema de ventilação natural, sendo as diferenças progressivamente acentuadas com o aumento no tempo de exposição.

Ao final da avaliação, a perda total de água foliar das plantas cultivadas sob sistema convencional foi de cerca de 80%, igual ao observado para as plantas *in vivo* cultivadas na sala de crescimento ($P < 0,05$). Para as plantas cultivadas sob ventilação natural (tampa Millipore) e aquelas cultivadas *in vivo* a pleno sol, a perda de água não ultrapassa os 30% ao final do período de

determinação, o que representa menos da metade da quantidade de água perdida no mesmo período pelas plantas que se desenvolveram sob sistema convencional ou as plantas matrizes. Resultados semelhantes foram reportados por Deccetti et al. (2008), que verificaram uma variação de 66% a 89% de perdas de água do tecido foliar nas plantas, após o término do enraizamento *in vitro* sob sistema convencional e 13% a 33% de perda de água do tecido naquelas cultivadas *in vitro* sob ventilação natural.

De acordo com os resultados, foi possível observar que as plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram menor velocidade inicial de perda de água, em relação às plantas cultivadas em sala de crescimento que, independente do sistema de vedação dos recipientes, perdem água mais rapidamente, no início do período de avaliação. Esses resultados podem indicar uma maior resistência à perda de água das plantas cultivadas em casa de vegetação.

Resultados mais eficientes foram obtidos na casa de vegetação, utilizando tampas com membrana Millipore. As plantas produzidas com esse tratamento otimizaram a capacidade para controlar as perdas de água, comparadas às dos demais tratamentos. Além disso, outras vantagens associadas a essas condições de cultivo incluem rustificação antecipada das plântulas *in vitro*, melhoria das características fisiológicas da planta (devido ao fato de as condições ambientais de cultivo serem mais naturais) e a redução do estresse da planta durante a aclimatização (aumentando a percentagem de sobrevivência das mudas) (Pasqual et al., 2008).

A influência da utilização de umidades mais baixas do que as convencionais sobre a capacidade da planta de controlar a perda de água também tem sido descrita em outras espécies cultivadas *in vitro*, como *Prunus cerasifera* (Sciutti & Morini, 1995) e *Malus domestica* (Brainerd & Fuchigami, 1981). O aumento na intensidade luminosa e a redução na umidade relativa do ar durante

o cultivo *in vitro* induzem as mesmas modificações anatômicas observadas nas plantas durante o período de aclimatização na casa de vegetação, como o aumento na deposição de cera epicuticular e a redução no tamanho e na frequência dos estômatos Capellades et al. (1990).

O fechamento dos estômatos, como tentativa de manter o conteúdo hídrico favorável nos tecidos por maior tempo possível, é uma das primeiras linhas de defesa contra a dessecação. O fechamento estomático, porém, restringe a troca de gases entre o interior da folha e a atmosfera, reduzindo a assimilação de CO₂ por meio da fotossíntese (Larcher, 2000; Deccetii, 2004).

O aumento na capacidade de controle da perda de água pode ser de extrema importância para prevenir a dessecação das plantas de *Annona glabra* L. durante a aclimatização e garantir a sua sobrevivência após a transferência para o ambiente natural.

6 CONCLUSÕES

O ambiente de cultivo afeta as características fotossintéticas, os teores de clorofilas foliares e o conteúdo de água em plantas de *Annona glabra* L., demonstrando a grande plasticidade desta espécie, quando submetida a diferentes condições de cultivo.

Melhor desempenho das plantas, em termos de eficiência fotossintética, ocorre em condições naturais de cultivos, formando mudas de melhor padrão e qualidade. A perda de água diminui nas folhas que se desenvolvem sob ventilação natural, principalmente aliada à alta irradiância em casa de vegetação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELBERG, J.; FUJIWARA, K.; KIRDMANEE, C.; KOZAI, T. Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 57, p. 95-104, 1999.
- AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J.P.; CHAVES, M.M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, p. 31-37, 1999.
- ARAI, S.; ASAO, H.; KOBATAKE, H. The effect of CO₂ enrichment on the growth and quality of strawberry plantlets regenerated from a shoot-tip culture. **Bulletin of the Nara Agricultural Experiment Station**, Japan, v. 22, n.1, p. 9-16, 1991.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C.S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 173-175, 1981.

BRAGA, F.T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Rage):** características anatômicas e fisiológicas. 2006. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, 1990.

CASSOL, D.; FALQUETO, A.R.; BACARIN, M.A. Fotossíntese em *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* sob sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, Supl. 2, p. 576-578, 2007.

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

CRESPO, L.E.C. **Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas:** um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes, RJ.

DAMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; BARROS, R.S.; MAESTRI, M. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

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

DECCETTI, S.F.C.; SOARES, A.M.; PAIVA, R.; CASTRO, E.M. de. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v. 117, n. 4, p. 341-344, 2008.

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

DESJARDINS, Y. Photosynthesis *in vitro* - on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 393, p. 45-61, 1995.

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

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

DUBÉ, S.; VIDAVER, W. Photosynthetic competence of plantlets grown in vitro: an automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, n. 3, p. 409-416, 2006.

EICKMEIER, W.G.; CASPER, C.; OSMOND, C.B. Chlorophyll fluorescence in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev.) spring during high-light and desiccation stress, and evidence for zeaxanthin-associated photoprotection. **Planta**, Berlin, v. 189, n. 1, p. 30-38, 1993.

FERRAZ, K.K.F.; SILVA, D.M. Avaliação ecofisiológica do crescimento inicial de espécies florestais usadas na recuperação de áreas degradadas – II. *Calliandra calothyrsus* Meisn. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus, BA. **Resumos...** Ilhéus: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2001. 1 CD-ROM.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003.

FONTES, R.V.; SILVA, D.M. Avaliação ecofisiológica do crescimento inicial de *Piptadenia adiantoides* (Spreng.) Macbr., espécie florestal usada na recuperação de áreas degradadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus, BA. **Resumos...** Ilhéus: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2001. 1 CD-ROM.

INOUE, M.T.; GRAÇA, M.E.C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* sm. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 36, p. 71-77, 1998.

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

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, p. 141-145, 1999.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, 2000. 531 p.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; SOUZA, R.P. Photosynthesis response of citrus grown under reflective aluminized polypropylene shading nets. **Scientia Horticulturae**, Holanda, v. 96, n. 2, p. 115-125, 2002.

NAKAZONO, E.M.; COSTA, M.C. da.; FUTATSUGI, K.; PAULILO, M.T.S. Early growth of *Euterpe edulis* Mart. in different light environments. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 173-179, 2001.

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

OLIVEIRA, L.M. de. **Citocininas nos processos anatômicos, citológicos e fisiológicos durante o cultivo *in vitro* e aclimatização de *Annona glabra* L.** 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, H.S.; PARK, Y.M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hiperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 199-205, 2004.

PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de; SILVA, A.B. da; ROCHA, H.S. **Uso da luz solar na micropropagação de frutíferas**. Fortaleza, CE. 2005. Disponível em: <<http://www.abctp.ufla.br/ABCTP%20Not%EDcias/ABCTP49.pdf>> Acesso em: 20 jun. 2008.

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

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. 237 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, R.P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro***. 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SCALON, S. de P.Q.; MUSSURY, R.M.; RIGONI, M.R.; VERALDO, F. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2002.

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

TALAVERA, C.; CONTRERAS, F.; ESPADAS, F.; FUENTES, G.; SANTAMARÍA, J.M. Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 3, p. 287-292, 2005.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 155-165, 2002.