

**LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO
DE *Cattleya walkeriana*: ALTERAÇÕES
ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

SAMANTHA LÉA DIGNART

2006

SAMANTHA LÉA DIGNART

**LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya walkeriana*:
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

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

Orientador

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

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

Dignart, Samantha Léa

Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*:
alterações anatômicas e fisiológicas / Samantha Léa Dignart. –
Lavras : UFLA, 2006.

130 p. : il.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Orquídea. 2. Cultivo in vitro. 3. Micropropagação. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93415

SAMANTHA LÉA DIGNART

**LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya walkeriana*:
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS**

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

APROVADA em 17 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Moacir Pasqual	UFLA
Prof. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva	UFLA
Pesquisador Dr. Leonardo Ferreira Dutra	EMBRAPA/Florestas

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Triúno, pela criação, salvação e santificação, pela incessante presença em minha vida, por todas as dádivas e pela oportunidade de contemplação e estudo de sua obra maravilhosa.

Aos meus pais, por o todo tipo de apoio, seja ele do tipo técnico ou emocional, por se disponibilizarem a mim em qualquer momento, para qualquer ajuda, pela efetiva participação neste trabalho e em toda a minha formação. Às minhas irmãs e sobrinho, por toda força.

Ao Fábio Henrique, pelo companheirismo força e determinação, por vencer junto comigo esta etapa e, principalmente, por estarmos juntos, mesmo quando distantes.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos. Ao setor de Fisiologia Vegetal e ao Departamento de Agricultura pela possibilidade de realização deste trabalho. À empresa Polysac[®] pela concessão das telas coloridas.

Ao meu orientador, Prof. Dr Evaristo Mauro de Castro pela atenção, pelos ensinamentos, apoio e amizade, pela ênfase no trabalho em equipe e auxílio mútuo, exemplos que me acompanharão por toda minha vida profissional. Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Moacir Pasqual, pelas idéias e pela possibilidade de realizar este trabalho.

A todos os membros da banca, por se disponibilizarem e ler este trabalho e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo.

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

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, por todos os ensinamentos e auxílios. Em especial, à professora co-orientadora Ângela Maria

pela simpatia e colaboração na utilização dos equipamentos, juntamente com o colega João Paulo Delfino.

Ao Professor Eduardo e à técnica Eloísa, do Departamento de Fitopatologia, pelo acompanhamento em todos os procedimentos no Laboratório de Microscopia de Precisão

Aos meus amigos e irmãos, Franciane Braga, Fernanda Soares e Cristiano Martinotto, por se fazerem tão especiais, por me ajudarem diretamente no trabalho, mas, principalmente, pelo carinho e pelos exemplos, e pela certeza de que estarão sempre comigo, mesmo a quilômetros de distância. À Fernanda Nery, que dividiu comigo essa fase, com troca de experiências e muito bom humor.

Às Meninas que dividiram comigo moradia e que sempre lutaram por um convívio agradável e tranquilo no Trem da Alegria: Gisele Martins, Nádia Biase, Andressa Ribeiro e Carla Orloski.

Às pessoas que me permitiram convívio familiar nesses dois anos, em especial, Márcia, Itamar e Muriel, minha gratidão; ao Evaristo Guerra, Deborah, Olívia, Júlia e Bruna, e a toda família da Dona Carminha.

Aos colegas técnicos e funcionários: Lena, Izonel, Tanhan, Claret, Antônio Carlos, Vantuil, Hirondina e Joel, por reunirem o trabalho com oportunidade de diversão, pelo auxílio e por serem tão prestativos.

Aos meus colegas, em Cuiabá que mesmo longe, mostraram que podem estar presentes e auxiliarem de várias formas: Juliana Alves, Cezar, René Arnoux, Kátia e Odair e Jeferson Dombroski.

A todas as pessoas que se empenharam em me ajudar e cooperaram de maneira direta ou indireta para que a realização deste trabalho fosse possível.

MUITO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
Capítulo 1 Luz e sacarose na micropropagação de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardn.: alterações anatômicas e fisiológicas	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
REFERENCIAL TEÓRICO	4
1 Floricultura e comercialização de orquídeas.....	4
2 <i>Cattleya walkeriana</i>	6
3 Propagação de orquídeas.....	9
4 Ambiente de cultivo.....	11
4.1 Influência da luz no cultivo <i>in vitro</i>	12
4.1.1 Intensidade e fontes de radiação.....	12
4.1.2 Qualidade de luz.....	14
4.2 Efeitos da sacarose na micropropagação.....	20
5 Características morfofisiológicas de plantas micropropagadas.....	22
6 Aclimatização.....	26
7 Custos de produção e alternativas de cultivo.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
Capítulo 2 Efeitos da luz natural e concentrações de sacarose no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardn. (Orchidaceae)	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
Características fitotécnicas.....	55
Teores de clorofilas.....	63

Características anatômicas.....	67
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
CAPÍTULO 3 Efeitos da alteração na qualidade de luz durante o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cattleya walkeriana</i> Gardn (Orchidaceae).....	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
INTRODUÇÃO.....	90
MATERIAL E MÉTODOS.....	92
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
Características fitotécnicas.....	99
Teores de clorofila.....	101
Características anatômicas.....	103
Aclimatização.....	114
CONCLUSÕES.....	119
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS.....	127

RESUMO

DIGNART, Samantha Léa. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** 2006. 130 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Cattleya walkeriana é uma orquídea de grande valor ornamental, mas de baixa taxa de propagação natural. A micropropagação é uma importante ferramenta para a reprodução dessa espécie. Por causa dos altos valores de produção por meio da micropropagação convencional, relacionados a perdas durante aclimatização e alto consumo de energia elétrica em salas de crescimento, objetivou-se, com este trabalho, o cultivo *in vitro* de forma alternativa. O material era constituído de plântulas germinadas *in vitro*. O cultivo foi feito por 90 dias. Num primeiro experimento, foram testados dois diferentes fatores: luz (em sala de crescimento convencional - SC, casa de vegetação protegida com sombrite 50% - CVP e na mesma casa de vegetação, mas sem proteção - CVSP) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Luz natural resultou em aumento no número de brotos em CVSP, na espessura foliar e na frequência e diâmetro dos estômatos; resultou também na diminuição do comprimento das plântulas e dos teores de clorofila. Omissão de sacarose resultou em menores teores de clorofila e morte das culturas em CVSP. Num segundo experimento, testou-se o efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre os frascos cultivados em casa de vegetação (CV) e SC. CV-vermelho resultou em maior espessura foliar, maior densidade estomática, menor relação DP/DE e maior capacidade de aclimatização. CV azul resultou em maior teor de clorofila total, mais cloroplastídeos por célula, menor densidade estomática e maior número de brotações axilares; em sala de crescimento, sombrite vermelho e azul tiveram respostas similares. Nesse ambiente, a intensidade de luz foi muito baixa, prejudicando o desenvolvimento. Com os resultados obtidos, é possível recomendar o uso da luz natural, sombreamento com telas vermelhas e azuis, e redução nas concentrações de sacarose no meio de cultura para a micropropagação de *C. walkeriana*. Esses procedimentos podem reduzir os custos de produção e melhorar a qualidade das plântulas produzidas.

¹ **Comitê Orientador:** Dr. Evaristo Mauro de Castro - UFLA.(Orientador), Dra Angela Maria Soares. Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Co-orientadores).

ABSTRACT

DIGNART, Samantha Léa. **Light and sucrose in micropropagation of *Cattleya walkeriana*: Anatomic and Physiologic changes.** 2006. 130 p. Dissertation (Master in Major in Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Cattleya walkeriana is an orchid of great decorative value. The use of micropropagation techniques are important issues in the reproduction of that species. The use of conventional techniques of micropropagation causes plantlet losses during the acclimatization process and also promotes a high energy consumption in growth rooms which finishes by increasing the production costs. The objective of this work was to test some alternative micropropagation techniques. The plantlets were previously sprouted *in vitro* and grew for 90 days. In the first experiment were tested: light (in usual growth room – GR; greenhouse shading 50% - GHS and greenhouse without shade – GHWS) and different sucrose concentrations (0; 15,0 and 30 g L⁻¹). Sunlight showed a higher number of lateral buds in GHWS, a large leaf thickness, increase in the number and diameter of the stomata; resulted also in a decrease of the plantlets length and chlorophyll content. The total sucrose exclusion resulted in smaller chlorophyll content and death of cultivated plantlets in GHWS. The second experiment tested the effect of colored nets (red and blue) above the flasks cultivated in growth room or greenhouse (GH). GH-red gave a larger leaf thickness, higher stomata density, lower DP/DE relation and better acclimatization performance. GH-blue showed higher chlorophyll content, more chloroplastid per cell, smaller stomata density and higher lateral buds number. In GR red and blue nets had practically the same performance on this environment, the light intensity was very low and it has a development damage of plantlets. With this results, we could say, that use of sunlight can be recommended with red and blue nets and sucrose concentrations reduction for *C. walkeriana* micropropagation. These procedures can reduce the production costs and increase the cultivated plantlets quality.

¹ **Guidance Committee:** Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Adviser), Dra Angela Maria Soares Dr. Moacir Pasqual – UFLA.

CAPÍTULO 1

**LUZ E SACAROSE NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Cattleya walkeriana*:
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E MORFOFISIOLÓGICAS**

1 INTRODUÇÃO GERAL

As orquídeas possuem grande potencial econômico e ornamental, contudo, sua multiplicação com características desejáveis é inviável economicamente, pelas vias naturais de propagação. A micropropagação surge como uma possibilidade de reprodução dessas plantas em escala comercial. No entanto, os custos de produção gerados por meio desta técnica tornam as mudas produzidas pouco competitivas, principalmente para pequenos produtores. Esses custos referem-se, entre outros fatores, a gastos com energia elétrica nos laboratórios e às baixas taxas de sobrevivência após transferência para ambiente *ex vitro*, devido às alterações morfofisiológicas de plântulas micropropagadas geradas pelo ambiente de cultivo. A necessidade de mão-de-obra especializada também eleva custos de produção.

A maioria dos trabalhos relacionados à cultura de tecidos é voltada para a elaboração de protocolos de cultivo, em especial na aplicação de reguladores de crescimento e concentração de nutrientes adicionados ao meio de cultura. No entanto, recentemente, parte da comunidade científica tem redirecionado o enfoque de suas pesquisas. É crescente a preocupação da qualidade das mudas produzidas, como forma de aperfeiçoar resultados positivos obtidos por meio destas técnicas. Diante disso, diversas pesquisas têm sido feitas na manipulação do ambiente de cultivo, tais como carboidrato no meio de cultivo e condições de luz das culturas

Sabe-se que o fator luz é fundamental para o desenvolvimento de plântulas *in vitro*. As características da luz influenciam aspectos morfofisiológicos e interferem na qualidade das plântulas durante aclimatização. A intensidade e a qualidade de luz alteram concentrações endógenas de reguladores de crescimento, atuam na síntese de pigmentos, espessura de tecidos, bem como na diferenciação e divisão celular. Com base nestes

conceitos, é possível manipular o ambiente de luz em busca de melhores formas de cultivo.

Uma alternativa para os altos custos gerados em sala de crescimento seria o cultivo de plântulas *in vitro* em ambiente externo, ou a entrada de luz solar nesses ambientes. Essa tecnologia não é muito difundida por não se conhecerem com clareza seus efeitos sobre as culturas, que são convencionalmente mantidas em intensidades de luz bem inferiores e com fotoperíodo controlado. A qualidade espectral também representa alternativas de manipulação do ambiente para a obtenção de melhores resultados de cultivo. Pouca atenção foi dada para este fator na cultura de tecidos e poucas bibliografias existem disponíveis sobre o assunto. Algumas características na morfogênese de plantas em diferentes espectros de luz, tais como alongamento de parte aérea, brotação e rizogênese, poderiam ser potencializados, podendo até substituir algumas fontes externas de reguladores de crescimento.

Um fator adicional que promove elevação nos custos de produção é o acréscimo de sacarose no meio de cultura como fonte de carboidrato, já que plântulas cultivadas desse modo desenvolvem características mixo ou heterotróficas, reduzindo a sobrevivência na aclimatização e elevando dessa forma, os custos. Por isso, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para reduzir essas concentrações ou mesmo testar outras formas de fornecimento de carbono, induzindo um grau maior de autotrofia desses tecidos.

Diante do exposto, percebe-se a crescente necessidade de estudos referentes ao ambiente de cultivo *in vitro*, a fim de otimizar o uso desta técnica no país. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o cultivo de *Cattleya walkeriana* em luz natural e alteração espectral com telas de náilon, bem como redução na concentração de sacarose, a fim de melhorar a qualidade das mudas produzidas pela aproximação com o ambiente natural e reduzir os custos de produção.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floricultura e comercialização de orquídeas

A floricultura é considerada, na atualidade, uma atividade econômica de grande relevância no agronegócio em âmbito nacional e internacional, devido, principalmente, à criação de um elevado número de empregos diretos e indiretos, bem como pelo valor de sua produção e comercialização (Cançado Junior et al., 2005). O comércio de flores no mundo vem movimentando algo em torno de 100 bilhões de dólares por ano, se for considerada toda a cadeia produtiva (Brasil, 2005; Castro, 1998). Alguns países, porém, destacam-se no mercado mundial de flores e plantas ornamentais: Holanda, Colômbia, Itália, Dinamarca, Israel, Bélgica, Espanha, Quênia, Costa Rica, África do Sul, Austrália e Equador. Segundo o Instituto de Economia Agrícola de São Paulo, a floricultura brasileira movimenta anualmente, mais de um bilhão de dólares, com perspectiva de crescimento anual de 20% (Castro, 1998).

Da produção nacional, somente 2% a 5% são destinados à exportação. Os principais países que importam do Brasil são os do Mercosul, Estados Unidos, Holanda, Alemanha, Japão (principal importador de orquídeas) e Itália (Kämpf, 1997). No ano de 1997, o ramo da floricultura no Brasil pôde exportar 11 milhões de dólares (Matsunaga, 1997); deste montante, as flores representaram 60% da receita, contra os 40% obtidos por outras plantas ornamentais. Apesar do crescimento, esses valores são ainda muito pequenos se comparados com alguns países exportadores, tais como a Colômbia (550 milhões) e Costa Rica (150 milhões), países onde a floricultura constitui uma base econômica sólida. Neste contexto, o Brasil apresenta diversidade e clima favoráveis ao desenvolvimento no ramo de plantas ornamentais, podendo também obter saldos significativos para a economia nacional.

Em 1999, com relação ao volume de vendas dentro do país, o faturamento do setor foi de 322 milhões de reais (Ibraflor, 2005). Deste montante, o estado de Minas Gerais deteve uma participação de 3,7% do volume de comercialização no Brasil (Cançado Junior et al., 2005).

Segundo Landgraf & Paiva (2005), o cenário da floricultura no estado de Minas Gerais é promissor. Todas as regiões do Estado apresentam produção de plantas ornamentais, incluindo as orquídeas, porém, cada uma na sua especialidade, dependendo do clima e da localização para a comercialização.

Para o Brasil, ainda não existem dados oficiais sobre produção e exportação de orquídeas (Ventura, 2002). Segundo Faria (2000), o mercado dessas flores, apesar de promissor, é ainda pouco explorado, já que o mercado comprador é cada vez mais exigente em qualidade e novidades, bem como em sofisticação. No exterior, as orquídeas são consideradas um dos mercados mais dinâmicos no setor de floricultura, movimentando 20 bilhões de dólares todos os anos.

Um significativo impulso no cultivo de orquídeas com fins comerciais só ocorreu a partir do século XX, devido às possibilidades decorrentes do aperfeiçoamento de algumas técnicas de multiplicação, já que, até essa época, muito pouco era conhecido sobre os processos de reprodução dessas plantas (Arditti & Ernst, 1992). De acordo com Bañeras (1997), os países que se apresentam como maiores produtores de orquídeas representantes dos gêneros *Dendrobium*, *Oncidium*, *Mokaras*, *Cymbidium* e *Phalaenopsis* são Tailândia, Singapura, Malásia, Nova Zelândia, Japão, Holanda e Alemanha, e, para os gêneros *Cattleya*, *Laelia*, *Brassavola* e *Sophronitis*, ainda não foram identificados os maiores produtores.

A melhoria e a consolidação da participação brasileira no mercado mundial dependem de maior dedicação à pesquisa, formação especializada de profissionais para possibilitar aumento na produtividade, aumentando, assim, a

capacidade de exportação, de acordo com a demanda exigida pelos países importadores e de maior integração de toda a cadeia produtora de flores e plantas ornamentais.

2.2 *Cattleya walkeriana*

A espécie em estudo pertence à classe Monocotiledoneae e à família Orchidaceae (Paula & Silva, 2001). As plantas da família Orchidaceae são consideradas as mais evoluídas do reino vegetal (Paula & Silva, 2001) e, durante o processo evolutivo, adotaram diversas formas de adaptação aos diferentes ambientes. Elas podem ser epífitas, terrestres, saprófitas ou litofíticas. A maioria das espécies tropicais e subtropicais possui hábitos epifíticos (Black, 1984).

As orquídeas distribuem-se em quase todas as regiões do mundo, com exceção dos pólos e deserto, compreendendo o maior número de espécies entre todos os vegetais. Segundo Singh (1992), elas possuem cerca de 35.000 espécies distribuídas em 1.800 gêneros (Watanabe, 2002) e mais de 100.000 híbridos (Sheehan & Sheehan, 1994).

O gênero *Cattleya* é originário das Américas Central e do Sul, formado de aproximadamente 70 espécies naturais, sem contar uma infinidade de híbridos produzidos (Castro, 2003). As flores de *Cattleya* apresentam particularidades pronunciadas (Figura 1) que desempenham papéis importantes na polinização como atrativo a seus agentes particulares (Dressler, 1993). Em razão da estrutura de suas flores, elas podem ser ligadas a muitos outros gêneros que se assemelham em aparência e se inter cruzam formando híbridos intergenéricos (Black, 1984). Por essa grande capacidade de combinação genética e a exuberância de suas flores, é que as orquídeas do gênero *Cattleya* têm sido as orquídeas mais comercializadas na atualidade, o que lhe confere considerável importância econômica (Zanenga-Godoy & Costa; 2003).



FIGURA 1 Flor de *Cattleya walkeriana*. Fonte: www.sanorchids.com/

A descrição de *Cattleya walkeriana* foi feita em 1843, por George Gardner (Mendes, 1996). Ela pertence à subfamília Epidendroidae, tribo Epidendreae, subtribo Laelinae (Rossi, 2004). É uma espécie de floração abundante, originária dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Em ambiente natural, são encontradas em árvores ou formações rochosas. No geral, são plantas com pseudobulbos curtos e elipsoidais, quase sempre unifolioladas, com a folha bruscamente arredondada e de aspecto coriáceo e rígido, com comprimento variável que, muitas vezes, atinge o dobro do pseudobulbo (Lucchesi, 2004; Mendes, 1996). Normalmente, as hastes produzem até duas flores, mas, em casos excepcionais, podem produzir três ou mais, quando se sobrepõem em pseudobulbos especiais, sem folhas. A floração ocorre desde o

final do mês de março até o mês de junho (Lucchesi, 2004). É uma espécie bem adaptada a ambientes com alta luminosidade, não sendo favorável o cultivo em umidades elevadas e ambientes muito sombreados (Mendes 1996).

Anatomicamente, *Cattleya walkeriana* apresenta, em ambiente natural, folhas com epiderme uniestratificada em ambas as faces. A membrana cuticular apresenta-se espessada de maneira uniforme, sendo lisa ou levemente ondulada, sem ornamentação. A espécie é hipoestomática, sendo que os estômatos ocorrem no mesmo nível das demais células epidérmicas. Os estômatos estão dispostos de maneira aleatória, isolados, sendo observados padrões anomocíticos, tetracíticos e ciclocíticos. Tanto na face adaxial como na abaxial da lâmina foliar, pode ser observada uma hipoderme constituída por células maiores que as epidérmicas; na superfície abaxial, essa hipoderme pode apresentar entre um e três estratos celulares. O mesofilo é bifacial compacto, sendo o parênquima paliçádico, que possui de cinco a seis estratos, considerado atípico, com barras de espessamento em suas células. Já o parênquima lacunoso é constituído por um número variável de camadas celulares, entre sete e oito, com células de formato diversificado. Em todo o mesofilo ocorrem idioblastos com ráfides de oxalato de cálcio, que são envoltos por uma bainha mucilaginosa (Zanenga-Godoy & Costa, 2003).

As células do parênquima clorofiliano que rodeiam o feixe vascular, geralmente, dispõem-se de maneira radial. Os feixes vasculares dispõem-se paralelamente em relação ao eixo longitudinal da lâmina foliar, o que caracteriza o chamado padrão paralelógeno. O número de feixes é maior na região mediana da lâmina foliar e só os de maior calibre atingem a região distal da lâmina. Os feixes de maior e médio porte são acompanhados por uma bainha de células esclerenquimáticas (Zanenga-Godoy & Costa, 2003).

2.3 Propagação de orquídeas

Embora o cultivo de orquídeas e bromélias, desde o início do século XIX, tenha contribuído para tornar o Brasil conhecido internacionalmente por suas plantas exóticas, devido à dificuldade de propagação que apresentam, as orquídeas para comercialização foram obtidas, quase sempre do extrativismo predatório das matas tropicais (Kämpf, 1997). O cerrado, considerado uma das 25 áreas de maior diversidade do mundo, e de onde se origina a espécie em estudo, vem sendo explorado sem que as preocupações ambientais sejam consideradas prioritárias (Myers et al., 2000). Por esse motivo, torna-se crescente a necessidade do desenvolvimento de técnicas de produção de orquídeas que sejam viáveis, e eficientes para fins comerciais, que apresentem como vantagem tanto a preservação das espécies nativas *in situ* como a obtenção de grande quantidade de mudas que sejam altamente desejáveis.

Durante muitos anos, acreditou-se que as sementes de orquídeas não eram viáveis, sendo a multiplicação destas plantas feita somente por meio de gemas ou estruturas semelhantes a gemas, as quais, por meio de uma série de metamorfoses, originariam plantas adultas (Kerbaui & Handro, 1980). As sementes são muito pequenas e, geralmente, necessitam de substrato infectado por fungo simbionte, tornando a germinação um processo inviável em larga escala para as plantas desta família. Por meio de técnicas atuais de germinação *in vitro* as orquídeas já podem ser propagadas pela via seminífera, um processo que, apesar de muito utilizado para multiplicação de algumas espécies por meio da autofecundação, propicia elevada taxa de segregação gênica à medida que novas variedades, espécies ou gêneros vão sendo acrescentados aos cruzamentos, resultando numa população distinta da planta matriz (Arditti & Ernst, 1992).

A manutenção das características genéticas nos descendentes de plantas matrizes de certas espécies, variedades e híbridos somente é possível por meio

da propagação vegetativa (Arditti & Ernst, 1992). O método de propagação vegetativa artificial, por meio da separação de rebentos, neste contexto, é uma alternativa para a manutenção de plantas com características especiais ou raras, entretanto, apresenta a desvantagem de ser um processo muito lento. Associado a este fator, muitas espécies e variedades podem ser atacadas por fitoparasitas, serem submetidas a condições físicas inadequadas ou não suportarem a separação em mudas, colocando, dessa forma, a sobrevivência de tal material selecionado em risco.

A micropropagação é uma alternativa de reprodução *in vitro* que vem aumentando significativamente para produção comercial de orquídeas. A propagação *in vitro* tem sido utilizada para diversas orquidáceas resultando em uma população numerosa de plantas homogêneas com características desejáveis.

Embora a propagação *in vitro* de orquídeas seja uma técnica de amplo domínio mundial, no Brasil, seu uso ainda poderia ser otimizado. Variedades únicas disponíveis em alguns orquidários poderiam ser mais intensamente multiplicadas, garantindo aumento de sua população, de modo a viabilizar sua exportação e, conseqüentemente, mais divisas para o país em curto prazo (Carvalho, 2002). Segundo Tombolato & Costa (1998), existem cerca de 36 laboratórios particulares de propagação clonal de plantas ornamentais no Brasil, dos quais apenas onze têm as orquídeas como as principais espécies cultivadas. Além disso, poucas instituições públicas desenvolvem pesquisa com propagação *in vitro* de orquídeas no Brasil. A maioria dos laboratórios existentes é particular ou estão conveniados a empresas privadas. Dessa forma, vários protocolos de propagação vegetativa *in vitro* de determinadas espécies são restritos a tais empresas.

Aliado à falta de informação e de qualificação técnica para cultivo *in vitro*, os elevados custos de produção ainda constituem-se em mais um entrave

para a ampla utilização da cultura de tecidos como alternativa na produção de mudas.

2.4 Ambiente de cultivo

Apesar das vantagens que apresenta, a micropropagação pode ocasionar diversas limitações de cultivo, devido a variações que ocorrem nas plântulas por causa do ambiente *in vitro*. Essas variações afetam a morfogênese dos explantes, levando, algumas vezes, a conseqüências negativas no crescimento e desenvolvimento das culturas, comprometendo, assim, a obtenção de taxas de estabelecimento, multiplicação e aclimatização satisfatórias. Frequentemente brotos obtidos por meio deste tipo de cultivo apresentam pequenas taxas de crescimento, variações em tamanho, forma e estágio de desenvolvimento (Kozai et al., 1995).

O ambiente *in vitro* é caracterizado pelo cultivo em frascos estéreis que, pelas vedações convencionais, permitem trocas gasosas baixíssimas com o ambiente, que apresentam umidade relativa excessiva (em torno de 98%), alta concentração de etileno e baixa concentração de CO₂ (que decresce de 3.000 a 9.000 µmol observados no escuro, para 100 µmol durante o fotoperíodo) (Erig & Schuch, 2005). As culturas são ainda mantidas em baixa luminosidade (entre 15-75 µmol.m⁻²s⁻¹), além da sacarose constituir a maior fonte de energia metabólica utilizada por essas plântulas, acrescidas em concentrações de 2% a 3% no meio de cultura (Arigita et al., 2002; Kodyn & Zapata-Arias, 1998; Zobayed et al., 1999). Essas condições, em conjunto, segundo Preece & Sutter (1991), contribuem para a formação de um fenótipo quase sempre incapaz de sobreviver a condições ambientais fora da atmosfera do frasco.

2.4.1 Influência da luz no cultivo *in vitro*

O crescimento e o desenvolvimento das plantas dependem da presença de luz para que essas realizem processos vitais, tais como fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo, sendo a luz um dos fatores que exercem maiores efeitos nos processos morfogênicos que ocorrem *in vitro*. Sua intensidade, qualidade e duração afetam particularmente o processo fotossintético e os processos mediados pelo fitocromo, tendo o fototropismo pouca influência *in vitro* (George, 1993; Handro & Floh, 1990; Kozai et al., 1991; Kodyn & Zapata-Arias, 1998). Em muitos casos, nem mesmo o efeito da luz na fotossíntese é considerado fundamental no cultivo *in vitro*, a menos que se deseje forçar autotrofia nos tecidos cultivados (George, 1993), portanto, considera-se a principal importância da luz no cultivo *in vitro* a sua relação com a fotomorfogênese.

2.4.1.1 Intensidade e fontes de radiação

A intensidade luminosa necessária para a cultura de vários órgãos e tecidos diferem entre estágios da micropropagação, tipo de explante e as diferentes espécies vegetais (Economou & Read, 1987). O aumento da intensidade no estágio de enraizamento em relação às fases de estabelecimento e multiplicação pode incrementar a sobrevivência das plântulas transplantadas ao ambiente externo (George & Sherrington, 1984). Essas intensidades são muito inferiores àquelas observadas para plântulas fotossintetizando em ambientes naturais. Uma das formas de facilitar o processo de aclimatização das plântulas cultivadas *in vitro* seria aumentar a intensidade luminosa, que promoveria a fotossíntese e melhoraria as relações hídricas (Zhou et al., 2005). Ibaraki & Nozaki (2005) afirmam, ainda, que, se nos objetivos do cultivo, houver a necessidade de se desenvolver capacidade fotossintética nos tecidos, um dos

fatores mais importantes que devem ser considerados é o ambiente de luz, especialmente a intensidade.

Debiase et al. (2003) relataram que gemas iniciais de bananeira expostas a diferentes intensidades de radiação apresentaram diferentes padrões morfogênicos, comprovando que padrões de intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) aplicada nas culturas em salas de crescimento, são fatores determinantes de diferenças observadas no desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*. Para Economou & Read (1987), a intensidade luminosa, além de influenciar no crescimento e na proliferação de brotos, pode afetar também, diretamente, a formação de raízes, podendo, quando em excesso, reduzir sua formação. A intensidade de luz pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar certas características, tais como espessura da folha, diferenciação do mesofilo, desenvolvimento vascular, divisão celular e desenvolvimento dos estômatos (Lee et al., 1988).

Lee et al. (1985) descobriram que, ao contrário do que afirmavam muitos autores, a intensidade luminosa influencia de forma pronunciada a fotossíntese *in vitro*. Segundo esses autores, afeta também a concentração de clorofila e a ultraestrutura dos cloroplastídeos em *Liquidambar styraciflua*. Além disso, a elevação nos níveis de luz produziu folhas mais espessas com diferenciação do tecido paliçádico no mesofilo. A anatomia dessas plântulas apresentou-se mais próxima àquela de folhas de mudas em aclimatização do que do material cultivado *in vitro* sob baixa irradiância. Decorrem também da baixa irradiância, uma redução no desenvolvimento cuticular, extensos espaços intercelulares no mesofilo (Wetzstein & Sommer, 1982) e diferentes configurações de estômatos que apresentam reduzida funcionalidade (Wetzstein & Sommer, 1983).

Kodym & Zapata-Arias (1998) e Kodym et al. (2001) estudaram as vantagens potenciais da utilização de luz solar sobre a luz artificial para o

cultivo *in vitro* de bananeiras, testando efeitos de fotoperíodo e intensidade luminosa nas taxas de multiplicação e qualidade das plântulas. Eles observaram que as maiores taxas de multiplicação foram obtidas em condições de luz solar.

A utilização da luz natural apresenta inúmeras vantagens sobre sistema de iluminação tradicional, no que se refere às alterações morfofisiológicas das plantas. Entre elas, destacam-se um aumento no crescimento das plântulas micropropagadas, a melhoria das características fisiológicas, devido às condições ambientais de cultivo serem mais semelhantes àquelas naturais de desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, a ocorrência de redução do estresse da planta durante o transplântio para ambiente *ex vitro* (Erig & Schuch, 2005).

2.4.1.2 Qualidade de luz

Para a determinação do padrão de crescimento, os vegetais utilizam a sinalização da qualidade de luz (Almeida & Mundstock, 2001), crescendo sob uma região limitada do espectro visível e exibindo morfologia e fisiologia determinadas pelas variações neste espectro (Eskins & Beremand, 1990).

Embora diversos autores tenham confirmado efeitos morfológicos e fisiológicos da qualidade de luz nas plantas, as respostas variam de acordo com a espécie estudada (Schuerger et al., 1997; Antonopolou et al., 2004).

A qualidade espectral pode afetar estruturas anatômicas das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, fazendo com que as plantas exibam um alto grau de plasticidade fisiológica e anatômica para mudanças na qualidade de luz (Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997; Sims & Percy, 1992).

Alterações espectrais da luz têm efeitos já bem estudados em processos como germinação de sementes, inibição do alongamento do hipocótilo, expansão dos cotilédones e das folhas, enverdecimento e biossíntese de pigmentos,

alongamento do caule e indução do florescimento (Saitou et al., 2004; Taiz & Zieger, 2004; Tsegay et al., 2005; Weller, 2000).

Alguns autores têm reportado também que a qualidade espectral pode alterar a concentração de hormônios e carboidratos dentro das plantas (Almeida & Mundstock, 2001). O alongamento de parte aérea e brotações laterais podem ser afetados em diferentes faixas do espectro pela alteração na concentração de auxinas e giberelinas das plantas (Muir & Zhu, 1983; Silva & Debergh, 1997; Smith, 1982). Estudos sobre os efeitos da luz e de hormônios vegetais no comportamento estomático ampliaram o entendimento do metabolismo das células-guarda em suas atividades de transporte de membranas (Eckert & Kaldenhoff, 2001).

A dependência das plantas à luz é um processo complexo envolvendo a ação combinada de muitos sistemas fotorreceptores que controlam estágios variados no desenvolvimento (Shahak, 2005; Shamir et al., 2001) por meio de tradução de sinais (Niemi et al., 2005). Esses fotorreceptores são moléculas que transferem a excitação eletrônica causada pela luz em sinal celular. Por meio de uma série de traduções de sinal original que contém informações sobre a luz ambiente, altera o metabolismo celular e influencia o desenvolvimento pelo estímulo de rotas fotossensoriais distintas (Almeida & Mundstock, 2001; Eckert & Kaldenhoff, 2000; Niemi et al., 2005). Muitas respostas à luz são ocasionadas por receptores ainda desconhecidos (Frankhauser & Chory, 1997).

São conhecidas três classes de fotorreceptores consideradas principais: criptocromos e fototropinas, que absorvem luz nas regiões do azul (390-500 nm) e ultravioleta (320-390 nm) e os fitocromos, que absorvem, principalmente, as regiões do vermelho (600-700 nm) e vermelho distante (700 a 750 nm) do espectro (Frankhauser & Chori, 1997; Kagawa et al., 1992; Niemi et al., 2005; Saitou et al., 2004). Os mecanismos pelos quais tais fotorreceptores regulam as respostas nas plantas são, ainda, em grande parte, desconhecidos. Existem

evidências de que, em muitas respostas fotomorfogênicas, mais de um receptor esteja envolvido (Shamir et al., 2001).

A luz vermelha influencia o desenvolvimento das plantas, principalmente pelas alterações nas razões vermelho/vermelho distante (V:VD) absorvidas pelas formas interconversíveis do fitocromo. Altas razões V:VD podem estimular respostas de alongamento do caule, florescimento e alterações na condutância estomática (Schuenger et al., 1997; Smith, 1992). Menores espessuras foliares sob condições de sombreamento têm sido atribuídas a um aumento na razão V:VD (Barreiro et al., 1992; Kasperbauer & Peasler, 1973; Schuenger et al., 1997), contudo, essa redução também pode ser o resultado de uma redução na radiação azul (Pushnick et al., 1987) ou de um decréscimo da RFA total (Sims & Percy, 1992; Schuenger et al., 1997; Smith, 1982).

Baixas relações entre V:VD são detectadas pelos fitocromos como indicadores de alta densidade ou competição pela luz. Essa percepção inicia uma resposta que consiste num alongamento do caule e pecíolo e um florescimento precoce, permitindo, assim, o desenvolvimento dessas plantas de forma apropriada ao seu ambiente (Almeida & Mundstock, 2001; Ballaré et al., 1992; Maloof et al., 2000). Silva & Debergh (1997) observaram um alongamento de parte aérea em plântulas de *Azorina vidalii* (Wats) cultivadas *in vitro* quando essas foram mantidas sob radiação vermelha. O mesmo resultado foi observado para *Disanthus* cultivado *in vitro* (Marks & Simpson, 1999).

A dominância apical é também influenciada pelas razões V:VD da radiação incidente (Almeida & Mundstock, 2001; Ballaré et al., 1992), contudo, os mecanismos pelos quais isso ocorre são ainda desconhecidos (Martin 1987; Almeida & Mundstock, 2001). Muitos autores têm sugerido que o fitocromo regula o transporte de reguladores de crescimento, incluindo as auxinas (Niemi et al., 2005; Tian & Reed, 2001). Marks & Simpson (1999) afirmam que o alongamento da parte aérea e dominância apical, respostas comuns à luz

vermelha, devem-se a um processo mediado pelo fitocromo por meio do controle de enzimas, tal que a auxina pode ser conservada em culturas iluminadas com luz vermelha, mas pode ser degradada em culturas mantidas sob luz azul.

Existem evidências de que outros hormônios de plantas também sejam modulados diretamente pela luz e pela ação do fitocromo (Marks & Simpson, 1999). Entre esses reguladores, é possível citar a giberelina e os brassinosteróides, ambos conhecidos por influenciarem o alongamento celular e, posteriormente, afetar a divisão das células (Taiz & Zieger, 2004).

Rajapske et al. (1999) desenvolveram coberturas plásticas que absorviam luz nas regiões do vermelho e vermelho distante do espectro e observaram, com isso, um alongamento do caule sob radiação vermelha e uma supressão do alongamento na região do vermelho-distante. Estes resultados, segundo os autores, sugeriram que os efeitos foram mediados por giberelinas, já que a conversão de giberelina na forma inativa para a forma ativa é inibida pela luz vermelha e promovida pelo vermelho-distante, sendo este processo controlado pelo fitocromo (Niemi et al., 2005; Rajapske et al., 1999).

A luz vermelha é importante para o desenvolvimento do aparato fotossintético das plantas e pode aumentar o acúmulo de amido em muitas espécies por inibição da translocação de fotoassimilados para fora das folhas, aumentando a concentração de carboidratos dentro dessas (Saebo et al., 1995). Dale (1988) afirma, ainda, que o fitocromo pode estar envolvido no controle de genes ligados à fotossíntese, codificando a síntese de clorofilas *a* e *b*, pequenas subunidades da rubisco, entre outros aparatos do maquinário fotossintético.

Outro grupo de fotorreceptores importante para o desenvolvimento das plantas são os receptores de luz azul. Um grande número de respostas à luz azul tem sido documentado em plantas, incluindo a taxa de inibição no crescimento do hipocótilo, fototropismo, indução de expressão gênica (Frankhauser & Chory,

1997; Motersen & Stromme, 1987; Silva & Debergh, 1997). Além disso, a luz azul é importante em processos como a síntese de pigmentos, enzimas, o desenvolvimento de cloroplastídeos, abertura e fechamento de estômatos, ativação do ritmo circadiano da fotossíntese e de muitos processos fotomorfogênicos (Eckert & Koldenhoff, 2000; Pushnick et al., 1987; Schuenger et al., 1997). Saebo et al. (1995) observaram que a espessura foliar, conteúdo de clorofilas, desenvolvimento dos cloroplastos e taxas fotossintéticas foram maiores em *Betula pendula* cultivadas sob radiação azul e menores sob a luz vermelha. Esses autores concluíram que a luz azul afeta a fotossíntese tanto pela composição do aparato fotossintético como pela translocação de carboidratos do cloroplasto.

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

Em algumas espécies, a luz azul aumenta a área foliar como por exemplo, em *Betula pendula* (Saebo et al., 1995), enquanto em outras, o efeito desta radiação é de redução, conforme observado para crisântemo (Mortensen & Stromme, 1987).

Estudos da qualidade de luz na micropropagação são ainda escassos e não estão muito claros os efeitos do espectro e níveis de irradiância no crescimento de plântulas durante o cultivo *in vitro* (Marks & Simpson, 1999). Isso porque diversos autores têm concentrado seus estudos no aumento do desempenho individual de alguns clones pela modificação da luz, combinando esta modificação, contudo, com outros fatores de cultivo que controlam o crescimento *in vitro* (Bressan et al., 1982).

Salas de crescimento geralmente são equipadas com lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas. A

irradiância fornecida primariamente na sala de crescimento afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações fotomorfogênicas (Marks & Simpson, 1999).

Marks & Simpson (1999) concluíram que com a variação na qualidade espectral, é possível manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies de uma maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura.

A complexidade e a variabilidade da radiação natural de um lado, e as reações de múltiplas respostas das plantas ao ambiente, de outro, tornam difícil prever como determinada manipulação da radiação natural afetará uma resposta particular específica da planta (Shamir et al., 2001). A faixa e o tipo de resposta ótimos podem ser diferentes para plantas especialistas que são adaptadas a diferentes ambientes de luz (Maloof et al., 2000).

A manipulação espectral da radiação natural tem sido utilizada em casas de vegetação através de filtros líquidos coloridos mantidos dentro de placas de vidro (Rajapske, 1999) e de coberturas de náilon coloridas (Grinberger et al., 2005; Reshef, 2005; Shahak, 2005; Shamir et al., 2001).

Não foram encontrados estudos da utilização de alteração espectral da luz solar na micropropagação, no entanto, o uso de telas de cobertura coloridas na horticultura ornamental pode oferecer inúmeras vantagens. Este tipo de controle pode habilitar as culturas para um ajuste de suas características de forma desejável. Esta tecnologia promove estímulos diferenciais de respostas fisiológicas de maneira direcionada. O objetivo deste direcionamento é determinado pelo valor comercial de cada espécie, incluindo a produtividade, qualidade do produto, taxas de maturação e de multiplicação, entre outras (Shahak, 2005).

Tradicionalmente, as respostas fisiológicas são obtidas por meio da aplicação de reguladores de crescimento, entre outros químicos e de práticas tais

como a poda periódica, que requer habilidade do operador. As coberturas coloridas representam uma alternativa, reduzindo o uso de reguladores de crescimento nas culturas (Shahak, 2005).

Shamir (2005) afirma que tela vermelha produz um crescimento forte e vigoroso do ramo principal das plantas e que essas plantas são maiores, enquanto que telas azuis ocasionam redução no crescimento.

Em cultivo de alface, Gringberger et al. (2005) observaram que coberturas vermelhas resultaram em maior produtividade e peso médio das plantas, quando comparadas às mantidas em cobertura azul. Reshef (2005) afirma que manjerição cultivado sob telados vermelhos com 50% de sombreamento resultou em maior rendimento e qualidade, e que a cor de cada telado não influencia na taxa de sombreamento.

Shamir et al. (2001) observaram que, em *Pittosporum variegatum*, ocorreu um alongamento significativo e um maior número de brotações de ramos sob tela vermelha; já em cobertura azul, ocorreu um número de brotações muito baixo, uma inibição na taxa de alongamento, uma redução no número de nós e no comprimento de internós. Não houve diferença para o conteúdo de clorofila em função das diferentes coberturas.

Gringberger et al. (2005) afirmam que, apesar das técnicas de alteração espectral pelo uso de coberturas coloridas serem promissoras no desenvolvimento das plantas, em diferentes culturas, a relação entre os diferentes tratamentos também pode ser diferenciada. Estes autores recomendam o teste com coberturas coloridas em espécies distintas de plantas conforme o interesse.

2.4.2 Efeitos da sacarose na micropropagação

As plantas cultivadas *in vitro*, em função das condições ambientais desfavoráveis para a realização de fotossíntese, mostram-se com metabolismo de

carbono predominantemente hetero ou mixotrófico, sendo a sacarose no meio de cultura a principal ou única fonte de carbono e energia para seu crescimento e desenvolvimento (Deccetti, 2004). Embora sua importância seja considerada primária para a organogênese *in vitro*, consistindo em substrato de crescimento e influenciando o ciclo celular, bem como processos de diferenciação (Vaz et al., 1998), o uso de elevadas concentrações no meio de cultura tem sido considerado uma das principais causas da redução das taxas fotossintéticas *in vitro* (Langford & Wainwright, 1987).

O carboidrato prontamente disponível na forma de sacarose nos meios de cultura tem efeito sobre a multiplicação e o crescimento das plântulas micropropagadas, sendo as concentrações mais freqüentemente utilizadas entre 2% a 4% (p/v). Abaixo dessa faixa, pode ocorrer clorose das folhas cultivadas e acima dessas concentrações, podem ocorrer problemas de excessivo potencial osmótico do meio, o que pode ocasionar deteriorização das culturas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Um incremento no custo de produção é o acréscimo de sacarose no meio de cultura, não por seu custo no mercado, mas porque que se observa, nessas condições, uma maior propensão de crescimento de fungos e bactérias no meio de cultura, ocasionando morte dos explantes e interferindo no potencial osmótico e na capacidade fotossintética dos tecidos cultivados *in vitro* (Prakash et al., 2004; Serret et al., 1997). Além disso, a presença da sacarose não permite às plântulas um desenvolvimento autotrófico, provocando uma redução no crescimento das mesmas e, em alguns casos, altas taxas de mortalidade durante a fase de aclimatização. Dessa forma, ao se omitir a sacarose do meio de cultura, poderiam ocorrer benefícios às plântulas não somente pela promoção de uma condição autotrófica, como pela redução da perda de plântulas devido a contaminações microbiológicas no meio de cultura (Kozai, 1991).

A redução da fotossíntese na presença de sacarose no meio de cultivo pode também inibir a formação da clorofila, prejudicando o crescimento autotrófico (George, 1993; George & Sherrington, 1984). A inibição da fotossíntese por 'feedback' é um processo de regulação fisiológica bem conhecido, no qual o acúmulo de açúcares na folha reprime a transcrição de muitos genes envolvidos no processo fotossintético (Sinhá & Roittsch, 2002; Taiz & Zieger, 2004). Muitos autores têm demonstrado que o cultivo de plantas sob altas concentrações de sacarose, em torno de 20 a 30 g.L⁻¹, geram um acúmulo de açúcares solúveis na folha, especialmente de grãos de amido no cloroplastídeo, que ocasionam a inibição da síntese de rubisco e clorofila, impedindo também a regeneração do substrato RuBP pela deficiência em fosfato inorgânico no estroma do cloroplastídeo reduzindo, conseqüentemente, as taxas fotossintéticas (Adelberg et al., 1999; Capellades et al., 1991; Chenevard et al., 1997; Jackson, 1999; Kanechi et al., 1998).

Atribui-se, como principal fator de vulnerabilidade e baixa sobrevivência de plantas micropropagadas quando transplantadas, o pobre desenvolvimento das folhas *in vitro* (Lee et al., 1985; Nguyen et al., 1998). Segundo Marin & Gella (1988), a perda de vigor das plântulas no momento da transferência deve-se à dependência que elas têm de fonte externa de carboidratos e à dificuldade de passar desta condição para uma condição autotrófica.

2.5 Características morfofisiológicas de plantas micropropagadas

O ambiente em que a espécie se desenvolve possui fatores que podem influenciar a estrutura anatômica e fisiológica das plantas.

Alterações em plântulas cultivadas *in vitro versus* ambiente natural correlacionam, de certa forma, diferenças entre folhas de sombra e folhas de sol (Smith et al., 1986). As adaptações das plantas às condições da radiação do

ambiente ocorrem, principalmente, durante o crescimento e diferenciação do órgão assimilador, diretamente das gemas, resultando, dessa forma, na definição das características morfológicas, histológicas, ultraestruturais e bioquímicas das folhas (Larcher 2000; Menezes et al., 2003).

As folhas de sombra, que podem ser comparadas àquelas que se desenvolvem *in vitro* devido a baixas intensidades luminosas, geralmente possuem menor espessura foliar. Essas folhas têm mais clorofila por centro de reação e a razão clorofila *a:b* é mais baixa (Taiz & Zieger, 2004), alcançando mais rapidamente o ponto de saturação à luz (Larcher, 2000). Desse modo, embora tanto folhas de sol como folhas de sombra tenham taxas fotossintetizantes similares em baixas intensidades luminosas, as folhas de sombra não são adaptadas a altas luminosidades e, conseqüentemente, têm taxas fotossintetizantes máximas consideravelmente menores nessas condições (Raven et al., 2001).

As folhas de sol, que se comparam, neste caso, àquelas cultivadas em ambiente natural, têm mais rubisco e um *pool* de componentes do ciclo da xantofila maior do que as folhas de sombra (Taiz & Zieger, 2004). Além disso, essas são menores e mais espessas. Seu sistema vascular é mais extenso e as paredes das células epidérmicas mais espessas. A razão entre a área superficial interna do mesofilo e a área da lâmina foliar é muito maior nesse tipo de folha (Raven et al., 2001). Elas estão aptas a utilizarem melhor altas intensidades de radiação, graças à elevada capacidade de transporte do sistema eletrônico e, dessa forma, conseguem maiores ganhos fotossintéticos (Larcher, 2000).

Por causa das condições do ambiente *in vitro* e das alterações que este causa, ficam comprometidos processos como fotossíntese transpiração e absorção de água e nutrientes, que são inibidos e respiração, que se torna elevada no escuro. Devido a esses processos, ocorre um crescimento pobre de brotos e plantas durante o cultivo, bem como desordens morfológicas e

fisiológicas significativas, que podem, em muitos casos, até serem consideradas irreversíveis, em células, tecidos e órgãos (Chenevard et al., 1997). Tais alterações, geralmente, reduzem a capacidade de plantas micropropagadas sobreviverem quando transplantadas para ambiente natural, pois, nesse segundo ambiente, a planta deve ser capaz de suprir sua necessidade de energia e carbono por meio da fotossíntese. A planta precisa também ser capaz de controlar eficientemente os processos de transpiração e absorção de água para manter um balanço hídrico favorável ao desenvolvimento (Zobayed et al., 1999).

Freqüentemente, observam-se, em plantas oriundas do cultivo *in vitro*, alterações, como parte aérea muito pequena, menor quantidade de cera epicuticular nas folhas (Sutter & Langhans, 1979; Sutter, 1983), tecidos com resistência mecânica reduzida e com maior quantidade de água, estômatos pouco funcionais, folhas finas e pequenas, com poucos tricomas e baixa atividade autotrófica. Alguns autores atribuem ao estresse hídrico a principal causa do “choque” das plantas no momento da aclimatização (Brainerd & Fuchigami, 1981). Os principais fatores envolvidos na promoção de perda d’água pelas plantas transplantadas seriam a alta umidade relativa dentro do frasco e a baixa irradiância, que provocam alterações significativas na estrutura e no funcionamento dos tecidos, que levam à incapacidade dessas plantas controlarem perda de água (Fuchigami et al., 1981; Khan et al., 2003; Preece & Sutter, 1991). Além disso, o autor ressalta que plantas destes ambientes podem apresentar uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea, o que dificulta absorção de água do substrato pela planta, aumentando ainda mais o estresse hídrico no evento da aclimatização (Pierik, 1989). Brainerd et al. (1981) descobriram que folhas de ameixeira cultivadas *in vitro* sofreram injúrias por estresse hídrico quando foram transplantadas. Com isso, os autores ressaltaram a importância de estudos que enfocassem a perda d’água por meio

dos estômatos e cutícula, relacionando-os com transpiração dessas plântulas, antes, durante e após o transplântio.

Diversos autores têm demonstrado que, sob condições de cultivo *in vitro*, há uma tendência para maior frequência de estômatos por unidade de área superficial da folha. Sciutti & Morini (1995) observaram uma tendência de maior densidade estomática em maiores umidades relativas dentro dos frascos de cultivo durante o enraizamento de ameixeira. Essa alta densidade influenciou na rápida dessecação dos tecidos quando estes foram transferidos para o ambiente externo. Para *Rosa multiflora*, Capellades et al. (1990) descobriram que, na fase de multiplicação, maiores umidades sob menores irradiâncias resultaram em densidades estomáticas significativamente maiores do que as plântulas cultivadas em maiores irradiâncias e as plântulas em fase de aclimatização. Wetzstein & Sommer (1983) observaram efeito semelhante para *Lyquidambar styraciflua*.

Smith et al. (1986), comparando a anatomia de *Betula platyphylla* de material *in vitro*, plantas em câmara de crescimento e casa de vegetação, observaram que, em secções transversais, as células paliçádicas representavam uma espessura significativamente maior para plântulas cultivadas em casa de vegetação e câmara de crescimento; se comparadas ao material *in vitro*, as nervuras principais de folhas *in vitro* também ocupavam menor área que para as outras condições testadas.

Donnelly & Vidaver (1984), comparando anatomia foliar de framboesa (*Rufus idaeus*) durante as fases de enraizamento *in vitro* e aclimatização, e de plantas de crescimento em campo, descobriram que folhas de condições *in vitro* eram menores, mais finas, com células do mesofilo menos compactas e com maiores espaços intercelulares do que as plantas controle. A ultraestrutura celular também é afetada pelas condições impostas pela micropropagação. Lee et al. (1985) afirmam que os cloroplastos de folhas cultivadas *in vitro*

geralmente são maiores e têm níveis mais elevados de clorofila. Possuem também grãos de amido menores nos cloroplastídeos e mais grana por cloroplasto do que folhas em ambiente natural.

2.6 Aclimatização

Por apresentarem baixa taxa de crescimento *in vitro*, bem como uma reduzida capacidade fotossintética devido ao desenvolvimento heterotrófico, além de um controle de perda e absorção de água deficiente, plantas micropropagadas são extremamente frágeis e vulneráveis, e, quando são transferidas para o ambiente externo, necessitam de um período de aclimatização, que as torne aptas à sobrevivência *ex vitro* (Lee et al., 1985).

As folhas de plantas cultivadas *in vitro* tornam-se modificadas para uma forma de crescimento heterotrófica; desse modo, por muitas vezes, podem não ser fotossinteticamente competentes quando transferidas para um ambiente sem suprimento de carboidratos, com umidade mais moderada e uma maior incidência luminosa, que são fatores que caracterizam um ambiente *ex vitro*. Dessa forma, são criadas dificuldades na aclimatização, podendo algumas plantas até serem incapazes de realizar fotossíntese para obterem um balanço positivo de carbono (Pasqual, 2001).

O período de aclimatização de uma plântula tem por objetivo corrigir as alterações e anormalidades ocasionadas durante a fase de desenvolvimento *in vitro*. Esse período, geralmente, dura de uma a quatro semanas (Smith et al., 1986), podendo ser variável, dependendo da espécie submetida à aclimatização e às técnicas utilizadas neste processo. Nesta fase, induz-se a transferência do metabolismo heterotrófico para o autotrófico por meio de alterações lentas que possibilitem à planta desenvolver maior controle sobre a perda e absorção de água. Esse processo se dá por meio de um aumento gradativo na irradiância e no decréscimo controlado da umidade (Preece & Sutter, 1991; Rocha, 2005).

Dentre os trabalhos que descrevem protocolos de micropropagação, existem relativamente poucos que detalhem o procedimento de transplante e aclimatização, descrevendo as dificuldades e propondo soluções encontradas para os problemas observados nesta fase. Embora existam algumas regras gerais (manutenção da umidade relativa alta, e temperatura amena), a experiência individual, a familiarização com a cultura, a escala de trabalho e as facilidades disponíveis são os principais fatores determinantes para a otimização desta fase (Grattapaglia & Machado, 1998).

A manutenção de alta umidade relativa do ar, seguida por sua redução gradual após o período crítico, auxilia no desenvolvimento de ceras epicuticulares e na capacidade de resposta de abertura e fechamento dos estômatos (Sciutti & Morini, 1995). Brainerd & Fuchigami (1981) aumentaram a sobrevivência simplesmente abrindo as tampas dos frascos, ainda em sala de cultura, durante 4 a 5 dias antes do transplante. Esta pré-aclimatização resultou em uma adaptação mais rápida dos estômatos do que em plantas diretamente transplantadas para a casa de vegetação.

Grattapaglia & Machado (1998) sugerem que, após a retirada das plantas do recipiente de micropropagação, elas sejam cobertas por polipropileno transparente com a finalidade de se criar uma câmara saturada de umidade. Ao final de cada semana, faz-se uma abertura, em uma das extremidades do saco, de forma a incrementar as trocas de água e gases, até que se retire completamente a cobertura, promovendo, dessa forma, a progressiva rustificação das plantas.

Com relação ao incremento na irradiância, plantas cultivadas *in vitro* possuem baixo ponto de saturação de luz e, quando são transferidas para o ambiente externo, onde são expostas a níveis mais altos de irradiância, essas folhas demonstram sintomas de estresse por fotoinibição ou, mesmo, foto-oxidação (Carvalho & Amâncio, 2002). Por esses motivos, o aumento da irradiância também deve ser gradual.

No período de aclimatização, novas folhas geralmente são formadas para muitas espécies cultivadas *in vitro*, as quais possuem características intermediárias entre folhas em condições de campo e folhas com características de cultivo *in vitro*. Por possuírem essas propriedades, elas são denominadas folhas de transição e possuem maior capacidade anatômica para transpor a passagem da heterotrofia para a autotrofia do que as folhas formadas *in vitro* (Rocha, 2005). A quantidade de folhas de transição depende da quantidade de gemas formadas *in vitro*.

Uma condição de estresse é inevitável na fase de transplântio. Em plântulas de *Rehmannia glutinosa* cultivadas de maneira mixotrófica ou autotrófica, tanto umas como as outras sofreram danos durante o processo de aclimatização, contudo, sob autotrofia este estresse foi reduzido e isso pode levar a uma maior taxa de sobrevivência, por melhor capacidade de recuperação desse estresse imposto (Seon et al., 2000).

2.7 Custos de produção e alternativas de cultivo

Apesar da micropropagação ser amplamente difundida e apresentar vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação, seu emprego em escala comercial, para algumas espécies, é mais oneroso que as vias tradicionais de propagação (Ahloowalia & Prakash, 2004b; Erig & Schuch, 2005; Savangikar, 2004). Para contornar esta situação, é crescente a preocupação de produtores e pesquisadores com o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo, que consiste na adoção de práticas e uso de equipamentos com a finalidade de reduzir o custo unitário de um micropropágulo. Tanto países em desenvolvimento como países desenvolvidos necessitam dessas tecnologias para possibilitar uma redução progressiva nos custos de produção (Savangikar, 2004).

Muitos dos fatores relacionados ao custo de produção das plantas micropropagadas, de maneira direta ou indireta, estão associados à natureza

heterotrófica ou mixotrófica de crescimento das plantas na micropropagação convencional (Kozai & Kubota, 2001). Explantes cultivados sob este 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 a maquinaria fotossintética opere normalmente (Arigita et al., 2002).

As plantas podem se adaptar a uma ampla variedade de condições por alterações em seu metabolismo e estruturas que permitem sua sobrevivência em ambientes severos. Contudo, uma vez que essas plântulas se adaptem a uma série de condições, a readaptação a novas condições é bastante difícil e lenta. Plantas formadas em cultura de tecidos e adaptadas a baixas intensidades de luz são geralmente frágeis e podem se tornar vitrificadas, levando a um fraco desenvolvimento sob condições de campo (Ahloowalia & Savangikar, 2004).

Assim, no momento da aclimatização, as plântulas micropropagadas estão sujeitas a um forte estresse ambiental, podendo ocorrer morte de um grande número de material vegetal gerado e cultivado *in vitro*. Dessa forma, perde-se muito do investimento para sobrevivência das plântulas e o custo das não sobreviventes é repassado ao produtor. Por isso, tem-se aumentado o interesse em fornecer condições *in vitro* de desenvolvimento de autotrofia pelas culturas, melhorando qualidade das plântulas, bem como seu desempenho durante aclimatização. Prakash et al. (2004) afirmam que plantas com cloroplastos funcionais podem ser cultivadas *in vitro* em meios sem sacarose, se houver o fornecimento de um ambiente adequado para que seja possível o desenvolvimento da fotossíntese.

Outros gastos incluídos no valor das plântulas comercializadas devem-se ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regimes de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são

normalmente incubadas (Kodyn & Zapata-Arias, 1998; Standaert & Metsenare, 1991).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), a energia elétrica é um dos principais custos embutidos em uma planta micropropagada. Segundo Ahloowalia & Savangikar (2004), uma grande parte da eletricidade consumida em cultura de tecidos é utilizada para autoclavagem, iluminação de salas de crescimento, filtragem de ar em câmaras de fluxo laminar e condicionadores de ar. Em países em desenvolvimento, o custo da energia elétrica pode representar até 60% dos custos de produção. Por isso, esses autores ressaltam que a redução nos custos de energia elétrica no laboratório é essencial para baixar os custos de produção de plântulas micropropagadas.

A fonte primária de iluminação nas salas de crescimento é vinda, normalmente, de lâmpadas montadas na própria prateleira onde são mantidos os frascos de cultivo. A iluminação artificial em salas de crescimento é um dos métodos mais onerosos e ineficientes na tecnologia de cultura de tecidos, de acordo com Ahloowalia & Prakash, (2004a). Esse tipo de iluminação gera calor, devendo este ser dissipado, sendo utilizados aparelhos de ar condicionado adicionando nova carga energética ao sistema de cultivo.

O cultivo sob luz natural proporciona, portanto, a diminuição dos custos com iluminação e reduz gastos com reparos e manutenção, além de possibilitar a utilização de instalações simplificadas, reduzindo os custos até mesmo das construções (Kodyn & Zapata-Arias, 1998).

Esta técnica de substituição de fonte de luz é ainda muito questionada devido à escassez de informações sobre os efeitos que a luz natural causa nas culturas. Uma preocupação nesse sentido é o aumento e oscilação de temperatura dentro dos frascos de cultivo. Contudo, Ahloowalia & Savangikar (2004) afirmam que muitas plântulas cultivadas *in vitro* são capazes de tolerar altas flutuações de temperatura e se adaptam melhor a condições de campo

quando aclimatizadas do que aquelas que são cultivadas sempre sob a mesma temperatura. Esses autores ressaltam, ainda, que o fato de se manterem culturas em temperaturas reguladas pelo uso de condicionadores de ar eleva o custo, mas, não contribui necessariamente para uma melhoria na qualidade das plântulas.

A sacarose eleva o custo da micropropagação por aumentar a probabilidade de contaminação dos meios de cultura (Serret et al., 1997) e a perda de culturas por contaminação também aumenta os custos de produção (Ahloowalia & Prakash, 2004a). Por isso, Prakash (2004) afirma que, em cultivo autotrófico, com omissão de sacarose, ocorre redução dos custos de produção pela utilização de frascos de cultura maiores contendo meios de cultivo com formulações mais simples e com baixa incidência de contaminação. Além disso, plantas cultivadas autotroficamente possuem qualidade superior, necessitando de período de aclimatização reduzido.

A micropropagação autotrófica (sem sacarose), com o uso da luz natural, apresenta grande potencial para auxiliar na redução dos custos de produção de mudas micropropagadas, diretamente, por meio da redução do gasto com energia elétrica e, de maneira indireta, melhorando a qualidade das mudas, reduzindo a perda de plantas durante a aclimatização e reduzindo a contaminação microbiana. Entretanto, pesquisas com o intuito de utilizar a luz natural neste tipo de cultivo são praticamente inexistentes, apesar de haverem fortes razões para sua pesquisa e implementação no Brasil, principalmente pela grande disponibilidade de luz natural ao longo do ano e pela necessidade de novas tecnologias para o setor de produção de mudas (Erig & Schuch, 2005).

3 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, n. 2, p. 95-104, 1999.

AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J. Incorporation of low cost options. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004a. p. 86-86.

AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J. Physical components of tissue culture technology. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004b. p. 17-28.

AHLOOWALIA, B. S.; SAVANGIKAR, V. A. Low costs options for energy and labour. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004. p. 41-45.

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

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

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of Orchids**. New York: John Wiley, 1992. 682 p.

ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 166-173, May 2002.

BAÑERAS, J. C. Tecnologia em floricultura tropical. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 5-9, 1997.

BALLARÉ, C. L.; SANCHEZ, R. A.; SCOPEL, A. L.; SANCHEZ, R.A.; RADOSEVICH, S.R. Morphogenetic processes in the agricultural environment. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 56, n. 5, p. 777-778, Nov. 1992.

BARREIRO, R.; GUIAMET, J. J.; BELTRANO, J.; MONTALDI, E. R. Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red:far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 1, p. 97-101, May 1992.

BLACK, P. Mackenzie. **Orquídeas** Rio de Janeiro: Ao livro Técnico/SA 1984. 128 p.

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

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J.; 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, Apr. 1981.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa de desenvolvimento de flores e plantas ornamentais – PROFLORES**. Brasília, 2003. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 23 maio 2005

BRESSAN, P. H.; KIM, Y-J; HYNDMAN, S. E.; HASEWAGA, P. M.; BRESSAN, R. A. Factors affecting *in vitro* propagation of rose. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v. 107, n. 6, p. 979-990, Nov. 1982.

CANÇADO JUNIOR, F. L.; PAIVA, B. M.; ESTANISLAU, M. L. L. Perspectivas para exportação de flores e plantas ornamentais. **Informe Agorpecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 96-102, 2005.

CAPELLADES, M.; FOUNTARNAU, 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, Jan. 1990.

CAPELLADES, M.; LEMEUR, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 21-26, Apr. 1991

CARVALHO, V. S. **Morfogênese *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya***. 2002. 197 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG.

CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Antioxidant defense system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 1, p. 33-40, Jan. 2002

CASTRO, C. S. Cattleyas e suas espécies: um estudo constante. **O Mundo das Orquídeas**. São Paulo, n 31, p. 12-17, 2003.

CASTRO, C. E. F. Os atores da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 4, n. 1/2, p. 1-46, 1998.

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

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J. S.; ALLEMAND, C. J. Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* n°23 X *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, n. 1/4, p. 207-217, Mar. 1997.

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

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

DEBIASE, C.; ZAFFARI, G. R.; GUERRA, M. P. Effect of Photosynthetically active radiation on the *in vitro* initial development of banana cultures. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 175-176, abr./jun. 2003.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf Anatomy of Red Raspberry Transferred from Culture to Soil. **Journal of the American Society for**

Horticultural Science, Alexandria, v. 109,n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

DRESSLER, R. L. **Philogeny and classification of the Orchid family**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1993. 314 p.

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

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

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul./ago. 2005.

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

FARIA, R. Orquídeas feitiço em flor – Paixão seletiva. **Revista Globo Rural**, São Paulo, v. 15, n. 179, p. 34-43, out. 2000. Disponível em: <<http://globorural.glo.com/barra>>. Acesso em: 12 maio 2005.

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

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. 2. ed. London: Exegetics, 1993. 574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Englend: Exegetics, 1984. p. 223-227.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação**

genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

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

HANDRO, W.; FLOH, E. E. S. A Organização de um Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas** Brasília: EMBRAPA CNPq, 1990. 433 p.

IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, n.1, p. 111-113, Jan. 2005.

IBRAFLOR. **Produção brasileira de flores**. 2005. Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/IBRAFLOR.PDF>> . Acesso em: 02 out. 2005.

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

KAGAWA, T. S.; SUETSUGU, N.; OIKAWA, K.; ISHIGURO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; OKADA, K.; WADA, M. *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homologue controlling the chloroplast high-light avoidance response. **Science**, Washington, v. 291, n. 5511, p. 2128-2141, Mar. 2001.

KÄMPF, A. N. A floricultura brasileira em números. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 1/2, p. 1-7, 1997.

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 American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, Mar. 1998.

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

KERBAUY, G. B.; HANDRO, W. Estudo do desenvolvimento *in vitro* de embriões de orquídeas In: ENCONTRO NACIONAL DE ORQUIDÓFILOS E ORQUIDÓLOGOS, 1., 1980, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Editora expressão e Cultura, 1980. p. 145-152.

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.

KODYN, A.; HOLLENTHONER, S.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Costs 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, Mar./Apr. 2001.

KODYN, A. ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1998

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

KOZAI, T.; WATANABE, K.; JEON, B. R. Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 1-9, Oct. 1995.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 1116, p. 525-537, Dec. 2001.

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

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

LANGFORD, P. J.; WAINWRIGHT, M. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 60, n. 6, p. 633-640, Dec. 1987.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa artes e Textos, 2000.

531 p.

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum Flux Density Effects on the anatomy and Surface Morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum Leaves, **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

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

LUCCHESI, C. A pequena perfumada. **Como Cultivar Orquídeas**, São Paulo, n. 10, p. 18-25, 2004.

MALOOF, J. N.; BOREVITZ, J. O.; WEIGEL, D. CHORY, J. Natural variation in phytochrome signaling. **Cell in Development and Biology**, London, v. 11, n. 6, p. 523-530, Dec. 2000. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 21 set. 2005.

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

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

MARTIN, G. C. Apical dominance. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 824-833, Oct. 1987.

MATSUNAGA, M. A indústria da flor no mundo e o comércio internacional do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura e Ornamentais**, Campinas v. 3, n. 2, p. 1-4, 1997.

MENDES, M. A. Conversa sobre a *Cattleya walkeriana*. **Boletim CAOB**, v. 24, 1996. Disponível online em: <<http://www.acw.arvore.com.br>>. Acesso em: 12 maio 2005.

MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. A. M. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. A.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. p. 303-324.

MOREIRA DA SILVA, M. H.; DEBERGH, P. C. The effect of light quality on the morphogenesis of *in vitro* cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 187-193, 1997.

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

MUIR, R. M.; ZHU, L. Effects of light in the control of growth by auxin and its inhibitor(s) in the sunflower. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 57, n. 4, p. 407-410, Apr. 1983.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, D J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

NGUYEN, Q. T; KOZAI, T.; NIU, G.; NGUYEN, U. V. Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO₂ concentrations and light intensities. **Plant Cell, Tissue and Organ Cultures**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 133-139, 1998.

NIEMI, K.; JULKUNEN-TIITTO, R.; TEGELBERG, R.; HAGGMAN, H. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine *in vitro*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 1, p. 123-128, Jan. 2005.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos - introdução**: fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 197 p. (Curso de pós-graduação “Lato sensu” a distância: Cultura de tecidos Vegetais: Tecnologias e Aplicações).

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de orquídeas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 63 p.

PIERIK, R. L. M. . **In vitro culture of higher plants**. Dordrech: Martinus Nijhoff, 1989. 344 p.

PRAKASH, S.; HOQUE, M. I.; BRINKS, T. Culture media and containers. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004. p. 29-40.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and Application**. Dordrecht. The Netherlands:

Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 72-93.

PUSHNICK, J. C.; MILLER, G. W.; BROWN, J. C.; DAVIS, T. D.; BARNES, A. M. Influences of ultra-violet (UV)-blue light radiation on the growth of cotton. II. Photosynthesis, leaf anatomy, and iron reduction. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, n. 17, p. 2283-2297, 1987.

RAJAPSKE, N. C.; YOUNG, R. E.; McMAHON, M. J.; OI, R. Plant height control by photoselective filters: current status and future prospects. **Hortechonology**, Alexandria, v. 9, p. 618-624. 1999.

RAVEN P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

RESHEF, G. **Basil culture under diferent shading nets, summer 2001**. 2005. Disponível em: <<http://www.polysack.com>>. Acesso em: 29 set. 2005.

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

ROSSI, L. **Considerações sobre *Cattleya walkeriana***. Disponível online em: <<http://www.acw.arvore.com.br/artconsidcwgardener.html>>. Acesso em: 12 maio 2005.

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

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

SAVANGIKAR, V. A. Role of low cost options in tissue culture. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries**. Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004. p. 11-15.

SCHUERGER, A. C.; BROWN, C. S.; STRYJEWSKI, E. C. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting

diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 3, p. 273-282, Mar. 1997.

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, Mar. 1995.

SEON, J. H.; CUI, Y. Y; PAEK, K. Y Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmania glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 135-142, 2000.

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

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

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

SHAMIR, M. O.; GUSSAKOVSKY, E. E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA, R.; GILLER, Y. E. SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticulturæ Science for Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, May 2001.

SHEENAN, T. J.; SHEENAN, M. **An illustrated survey of orchid genera**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 221 p.

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

SINGH, F. Micropropagation of orchids: *Spathoglottis plicata* and *Epidendrum radicans*. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. London: Springer-Verlag, 1992. p. 223-245.

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

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

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

SMITH, H. Light quality, photoperception, and plant strategy. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 481-518, 1982.

STANDAERT, D. E.; METSENAERE REA Economic considerations. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed). **Micropropagation**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 131-140.

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

SUTTER, E. G. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 1, p. 74-77, Jan. 1983.

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

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

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. 72 p. (Boletim Técnico, n. 174).

TSEGAY, B. A.; OLSEN, J. E.; JUNTILLA, O. Effect of red and far-red light on inhibition of hypocotyls elongation in ecotypes of *Betula pendula* Roth.

American Journal of Biotechnology, v. 4, n. 1, p. 50-56, 2005. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>. Acesso em 24 set. 2005.

VAZ, A. P. A.; KERBAUY, G. B.; RIBEIRO, R. C. L. F. Changes in soluble carbohydrate and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catsetum fimbriatum* (Orchidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 105-111, 1998.

VENTURA, Gizela Machado. **Propagação *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya***. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo: AOSP, 2002. 296 p.

WELLER, J. L.; SCHREUDER, M. E. L.; SMITH, H.; KOORNNEEF, M.; KENDRICK, R. E. Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 345-346, Nov. 2000.

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

WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 475-780, May 1983.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botanica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 101-118, jan./abr. 2003.

ZHOU, Y. H.; GUO, D. P.; ZHU, Z. J.; QIAN, Q. Q. Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 105-108, Apr. 2005.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Cauliflower shoot culture: effects of types of ventilation on growth and physiology. **Plant Science**, Clare, v. 141, n. 2, p. 209-217, Feb. 1999.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA LUZ NATURAL E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Cattleya walkeriana* GARDN. (ORCHIDACEAE)

RESUMO

DIGNART, Samantha Léa. **Efeitos da luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* Gardn (Orchidaceae)**. 2005. 40 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. ¹

Cattleya walkeriana é uma das mais apreciadas orquídeas do mundo, possuindo grande valor ornamental. A micropropagação é uma importante ferramenta para reprodução dessa espécie. Por causa dos altos valores de produção por meio da micropropagação convencional, relacionados a perdas durante aclimatização e alto consumo de energia elétrica em salas de crescimento, objetivou-se, com este trabalho, o cultivo *in vitro* de forma alternativa. Foram testados dois diferentes fatores, sendo eles luz (em sala de crescimento convencional - SC, casa de vegetação protegida com sombrite 50% sobre os frascos - CVP e, na mesma casa de vegetação, mas sem proteção - CVSP) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). O material era constituído de plântulas germinadas *in vitro* sob condições convencionais de cultivo, em sala de crescimento e em meio MS, sendo cultivadas por 90 dias. Luz natural resultou em aumento no número de brotações laterais (CVSP), na espessura foliar e na frequência e diâmetro dos estômatos; resultou também na diminuição do comprimento das plântulas e dos teores de clorofila. As concentrações extremas de sacarose (0,0 g L⁻¹ e 30,0 g L⁻¹) resultaram em maior brotação. Omissão de sacarose resultou em menores teores de clorofila e declínio gradual da cultura em CVSP. Com os resultados obtidos, é possível afirmar que o ambiente de cultivo altera as respostas de plântulas cultivadas *in vitro* e pode-se recomendar o uso da luz natural e redução nas concentrações de sacarose no meio de cultura para a micropropagação de *Cattleya walkeriana* observando-se a fase da propagação e os objetivos da mesma. Esses procedimentos podem melhorar a qualidade das mudas produzidas e reduzir os custos de produção.

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

ABSTRACT

DIGNART, Samantha Léa. **Sunlight and sucrose concentration effects during *in vitro* culture of *Cattleya walkeriana* Gardn. (Orchidaceae).** 2005. 40 p. Dissertation (Master in Major in Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Cattleya walkeriana have a great decorative value and is one of the most appreciated orchids in the world. The use of micropropagation techniques are important issues in the reproduction of that specie. Although the use of conventional techniques of micropropagation causes plantlet losses during the acclimatization process and also promotes a high energy consumption in growth room which finishes by increasing the production costs. The objective of this work was to test some alternative micropropagation techniques for this specie by using different light conditions (usual growth room - GR, greenhouse with 50% of shading – GHS and greenhouse without shade - GHWS) and different sucrose concentrations (0, 15 e 30 g L⁻¹). The plantlets were previously germinated *in vitro* using usual MS medium and growth room than, they are grown for 90 days. The plants showed a higher number of sprouts, a larger leaf thickness and an increase in the number and on the diameter of the stomata when grown under natural light in GHWS. However, this condition caused a decrease in the plantlet height and in the chlorophyll content. Sucrose concentration of 0,0 or 30,0 g L⁻¹ resulted in better sprout. The total sucrose exclusion resulted in smaller chlorophyll content. The results indicate that the physiological behavior of plantlets grown *in vitro* can be modified by the environment and it can be suggested that the use of natural light and half of sucrose concentrations could benefit the micropropagation of *Cattleya walkeriana* regarding the propagation stage and its objectives. These procedures can reduce the production costs and increase the cultivated plantlets quality.

¹ **Guidance Committee:** Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Adviser), Dra Angela Maria Soares Dr. Moacir Pasqual – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A técnica de cultura de tecidos, na qual se insere a micropropagação, tem sido amplamente difundida nas últimas décadas e, para algumas espécies, tais como *Cattleya walkeriana*, torna-se a maneira mais eficiente de multiplicação para fins comerciais, devido às características particulares desta espécie. Contudo, o uso da micropropagação é ainda restrito em países em desenvolvimento devido aos altos custos de produção.

Os custos advindos da micropropagação referem-se, principalmente, a gastos com manutenção de salas de crescimento e perdas de plântulas micropropagadas, durante a aclimatização, atribuídas à incapacidade de adaptação dessas plantas ao ambiente *ex vitro* devido às características que desenvolveram em ambiente de cultivo *in vitro*. Isso se deve, entre outros fatores, à baixa irradiância das salas de crescimento, à alta umidade relativa dentro dos frascos de cultivo, a baixas concentrações de CO₂ durante o fotoperíodo, altas concentrações de etileno devido aos sistemas de vedação e à sacarose adicionada como fonte de carbono aos meios de cultura.

Esses aspectos do ambiente resultam em baixas taxas fotossintéticas, crescimento reduzido, bem como alterações na anatomia, relacionadas principalmente, à espessura e à diferenciação dos tecidos, frequência e morfologia estomática e à funcionalidade dos estômatos, que é geralmente reduzida.

Uma alternativa para a redução dos altos custos de produção pode ser a utilização de luz natural durante o cultivo, com o objetivo de reduzir gastos com salas de crescimento, bem como melhorar as características das plântulas cultivadas, otimizando, assim, a fase de aclimatização.

A redução de sacarose também tem sido testada em diversas pesquisas como forma de melhorar a capacidade fotossintética dos tecidos cultivados *in vitro* e reduzir perdas atribuídas à contaminação microbiana. A sacarose utilizada como fonte de carbono induz as culturas a um desenvolvimento hetero ou mixotrófico e, no momento do transplante, as plantas são incapazes de sintetizar seu próprio carboidrato.

Neste contexto, objetivou-se, com o presente trabalho, uma forma alternativa de micropropagação de *Cattleya walkeriana*, utilizando-se luz natural e diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura, visando melhoria na qualidade das plantas e possibilitando uma redução nos custos de produção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura, durante o período de dezembro de 2004 a março de 2005.

O material vegetal utilizado consistiu de plântulas de orquídeas da espécie *Cattleya walkeriana* Gardn., oriundas de sementes germinadas *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. As sementes foram mantidas em sala de crescimento a 25±2°C com radiação de 52,5 W.m⁻².s⁻¹ e 16 horas de fotoperíodo, até germinarem e atingirem o tamanho de aproximadamente 0,3 a 1,0 cm de comprimento de parte aérea, contendo entre uma e três raízes.

2.1 Meio de cultura

Durante o experimento, as plântulas foram cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), considerado mais efetivo no crescimento de plântulas de *Cattleya* segundo Dignart (2003). O meio foi acrescido com ágar na concentração de 6 g L⁻¹. A sacarose foi acrescentada em três diferentes concentrações, consistindo em um fator a ser estudado, que são: 0,0; 15,0 e 30,0 g L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos.

2.2 Ambiente de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Agricultura da UFLA, sendo os frascos fechados com tampas de polipropileno e vedados com plástico do tipo parafilme e cobertos adicionalmente com saquinhos plásticos (Figura 1). O material foi colocado diretamente sobre as

bancadas, ou sob proteção adicional de sombrite com 50% de retenção da radiação (Figura 1), que caracterizaram diferentes tratamentos. Foram cultivadas também plântulas em frascos mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, com intensidade de $52,5 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes, para servirem como tratamento controle.

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 o cultivo sob luz natural (com ou sem proteção de sombrite).



FIGURA 1. Visão geral das plântulas mantidas em casa de vegetação.

A caracterização do comportamento diurno da radiação solar e da temperatura do ar foi feita através de medidas dessas variáveis em dias típicos

durante o período de cultivo (28/12/2004, dia claro; 11/01/2005, dia nublado) As avaliações foram feitas utilizando-se sensores de radiação (LI-200SA, Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA) acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Li-cor. Neb), sendo os dados registrados a cada meia hora durante 12 horas (das 7:00h às 18:00) As médias obtidas em cada microambiente para radiação nas datas avaliadas estão mostradas na Tabela 1.

Tabela1 Radiação solar ($\text{MJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) e temperatura do média do ar ($^{\circ}\text{C}$) observadas nos microambientes em casa de vegetação.

	Ambiente com sombrite		Ambiente sem sombrite	
	Radiação	Temperatura	Radiação	Temperatura
28/12/2004	1,48	28,07	3,30	29,08
11/01/2005	0,82	25,92	2,02	26,78

2.3 Variáveis avaliadas

Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis:

2.3.1 Características fitotécnicas - número de brotos, folhas e raízes por plântula, comprimento da parte aérea e comprimento médio das raízes;

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

2.3.3 Características anatômicas - ao término do experimento, seguindo-se a coleta de dados fitotécnicos, as plântulas selecionadas foram fixadas em álcool etílico 70% até a realização das análises. Para as análises, foram coletadas folhas na posição 2, contando-se a partir do ápice (Figura 2).

Os cortes paradérmicos foram efetuados manualmente no terço médio foliar, na superfície abaxial das folhas. Para os cortes transversais, utilizou-se

um micrótomo de mesa, sendo também realizados na região do terço mediano das folhas.



FIGURA 2: Posição da folha de *Cattleya walkeriana* selecionada para as avaliações anatômicas.

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

Para cada tratamento foram avaliadas 5 folhas, tendo, para cada folha, sido efetuadas cinco avaliações em campos diferentes. Utilizou-se uma ocular micrometrada acoplada a um microscópio de luz. As variáveis analisadas para as seções transversais foram: espessura das epidermes das faces superior e inferior, espessura do mesofilo e espessura total do limbo foliar. As lâminas das seções paradérmicas foram preparadas com corante safranina em glicerina 1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram: densidade estomática (n° de estômatos por mm^{-2}), e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A frequência

estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961). Para cada corte, foram avaliados cinco campos.

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

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3X3, totalizando 9 tratamentos, com 12 repetições. Cada repetição foi composta por um frasco contendo quatro plântulas. Não foram observadas perdas significativas por contaminação, causadas pelo cultivo em casa de vegetação.

Os fatores analisados foram o ambiente de incubação, definido por “luz”, representado por sala de crescimento convencional, casa de vegetação sem proteção e casa de vegetação com sombrite 50%, e as concentrações de sacarose no meio de cultura, sendo testadas três concentrações: 0,0, 15,0 e 30,0 g L⁻¹.

Aos 90 dias de cultivo, os dados coletados foram submetidos a testes de homogeneidade de variâncias e normalidade; tendo sido comprovados estes parâmetros, foram então submetidos à análise de variância. As variáveis que apresentaram coeficiente de variação acima de 20% tiveram seus dados transformados em $\log.x + 1$ (para teores de clorofila) e \sqrt{x} (para dados fitotécnicos). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Toda a análise foi realizada utilizando-se o programa estatístico SAEG[®].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características fitotécnicas

Os dados apresentaram homogeneidade de variâncias e normalidade, e, por isso, foram submetidos à análise de variância; tendo sido atestada significância a 5% de probabilidade, procedeu-se ao teste de médias. Para as avaliações fitotécnicas não observou-se interação entre os fatores de ambiente de cultivo e concentração de sacarose no meio de cultura.

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

TABELA 2. Parâmetros fitotécnicos observados para plântulas em diferentes ambientes com diferentes intensidades e fontes de radiação.

LUZ	NF	CPA	NR	CR	NB
Sala de crescimento	12,69 a *	2,00 a	4,31 a	1,35 a	2,73 a
Sombrite 50%	11,99 a	1,69 b	4,26 a	1,18 a	2,14 b
Sem sombrite	11,17 a	1,37 c	4,34 a	1,24 a	2,75 a

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. NF= número de folhas; CPA= comprimento de parte aérea (cm); NR= número de raízes; CR= comprimento médio de raízes (cm); NB= número de brotações

O número de brotações foi maior para plântulas mantidas em sala de crescimento e em casa de vegetação sem a proteção de sombrite, em detrimento das brotações observadas para casa de vegetação, onde os frascos foram mantidos sob sombreamento adicional. Kodyn & Zapata-Arias (1998) afirmam que, além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Esses autores observaram que o número de brotos por explante de bananeira foi maior em casa de vegetação, sob luz natural, e em sala

de crescimento, também recebendo luz natural através de uma janela, do que sob o cultivo convencional com iluminação artificial.

Uma provável explicação para a elevação nas taxas de multiplicação em luz natural seria que a intensidade luminosa elevada poderia estar reduzindo as concentrações de auxinas endógenas das gemas por meio de fotoxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção às citocininas (Radmann et al., 2001; Soontouchainaksaeng et al., 2001).

Os tratamentos de luz não influenciaram nem o número de raízes por plântulas e nem o comprimento das mesmas. Resultados similares foram obtidos por Magalhães Junior & Peters (1991) que, fornecendo diferentes intensidades de luz em brotos de ameixeira cultivados *in vitro*, não observaram diferenças significativas no enraizamento. Radmann et al. (2001) também afirmam que, para *Gypsophila paniculata*, as intensidades luminosas utilizadas na fase de multiplicação não afetaram o posterior enraizamento dos brotos. Leite et al. (2000), contudo, relatam que uma maior intensidade luminosa teve efeitos significativos no número de raízes emitidas por brotação, na ordem de 25%. Foi observado que, para bananeira, as raízes formadas em ambiente de luz natural eram mais fortes e vigorosas do que as formadas em uma câmara de crescimento, sob condições de luz artificial (Kodym & Zapata-Arias, 1998). Seko & Nishimura (1996) também não observaram diferenças na massa seca de raízes quando aumentaram a intensidade luminosa e o fotoperíodo nos ambientes de cultivo utilizados para arroz.

O enraizamento *in vitro* depende de uma série de fatores. Para alguns casos, a intensidade luminosa aumenta a taxa de enraizamento e a qualidade de raízes; em outros, não afeta e, em algumas espécies, é necessário manter os brotos por certo tempo no escuro, para que haja indução de raízes. Por isso, o genótipo é um fator primordial a ser considerado no processo de enraizamento *in vitro*. Plântulas de orquídeas são, por sua própria constituição, de fácil

enraizamento, não necessitando de uma fase específica na micropropagação, como ocorre para a maioria das espécies cultivadas por meio desta técnica. Por sua determinação genética particular, pode-se afirmar que o ambiente luminoso de cultivo não afeta o enraizamento *in vitro* de forma substancial, não se constituindo um entrave em aplicações de cultivo em luz natural.

Para número de folhas, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No cultivo de *Phaius tankervilleae* e *Vanda coerulea*, duas orquídeas, sob diferentes intensidades luminosas, Soontouchainaksaeng et al. (2001) observaram que maior intensidade de luz também não afetou de maneira significativa o número de folhas. Kodym et al. (2001), utilizando iluminação natural através de clarabóias instaladas no telhado, também não observaram diferenças significativas para quase nenhuma variável analisada. Esses autores consideram seus resultados vantajosos, já que os custos de produção foram reduzidos de maneira significativa. Estes resultados evidenciam a possibilidade de recomendar o uso de fontes naturais de radiação para o cultivo *in vitro* da espécie em questão.

O comprimento da parte aérea das plantas foi maior em sala de crescimento, seguido de plântulas cultivadas em casa de vegetação com e sem sombrite, respectivamente (Tabela 2). Resultados similares foram encontrados por Radmann et al. (2001) para *Gypsophila paniculata*, uma planta ornamental que respondeu com uma taxa de crescimento maior no tratamento de menor intensidade luminosa. Os autores explicam que, apesar de serem observados maiores comprimentos de brotos, esses brotos apresentam-se mais finos e flexíveis que àqueles oriundos de maiores intensidades luminosas. Ressaltam, ainda, que o maior crescimento dos brotos pode ser o resultado do processo de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente, ocasionando um maior crescimento dos entrenós com caules mais finos. Em plântulas de batata cultivadas *in vitro*, ocorreu uma supressão no alongamento de entrenós para

intensidade luminosa de $140 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, comparada à intensidade de $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kozai et al., 1995).

No presente estudo, foi possível observar que as partes aéreas de plântulas cultivadas em sala de crescimento também apresentavam aspecto menos rígido que as cultivadas em casa de vegetação, com ou sem sombreamento adicional. No cultivo de melão *in vitro*, sob diferentes ambientes com distintas intensidades luminosas, observou-se que as plântulas cultivadas em casa de vegetação produziram brotos menores que as cultivadas em salas de crescimento, porém, sua qualidade foi superior (Adelberg et al., 1999).

O crescimento das plantas é controlado por uma série de hormônios de crescimento, tais como a auxina, que é sensível a elevadas intensidades de luz; as citocininas, que atuam junto às próprias auxinas na divisão celular em cultura de tecidos e giberelinas, que controlam o alongamento dos brotos. As concentrações de giberelinas, bem como a altura das plantas, aumentam progressivamente quando a intensidade de luz diminui (Soontouchainaksaeng et al., 2001). Portanto, o balanço hormonal poderia estar influenciando o comprimento dos brotos, não havendo, contudo, necessariamente, uma relação positiva entre os maiores comprimentos de parte aérea e qualidade de plântulas.

Sutter (1988) afirma que plântulas com características suculentas estão mais propensas a sofrerem danos durante a aclimatização, principalmente no que se refere a estresse hídrico. As folhas de plântulas cultivadas em sala de crescimento neste experimento eram visivelmente mais suculentas que aquelas cultivadas em casa de vegetação. Além disso, Kodym et al. (2001) ressaltam ainda, a qualidade vantajosa de plântulas sob o cultivo de luz natural, que apresentam brotos mais firmes, altamente turgescerentes e com maior área foliar. Com isso, estima-se uma melhor aclimatização.

Kozai et al. (1995) afirmam que uma técnica promissora para se alcançar a supressão de alongamento, para melhor aclimatização, é a

manipulação da iluminação durante o período de cultivo, observando-se para tal, os efeitos desta iluminação no que se refere à qualidade e intensidade de luz, bem como do fotoperíodo. Esses autores evidenciam uma melhor qualidade das plântulas produzidas quando se detém o alongamento das mesmas.

Embora a luz seja um importante fator na micropropagação, pesquisas sobre o efeito de intensidade de luz natural no crescimento das plantas, particularmente de orquídeas, são escassos. A intensidade e a duração da luz em quantidades satisfatórias podem fornecer melhores resultados. A escassez de estudos para a determinação de intensidades luminosas adequadas para algumas espécies deve-se, principalmente, ao fato de ser difícil a obtenção das intensidades luminosas ideais para o desenvolvimento dessas plantas (Soontouchainaksaeng et al., 2001). Neste contexto, consideram-se importantes os resultados obtidos por meio deste estudo, já que as plântulas testadas responderam relativamente bem aos tratamentos com luz natural. Desse modo, torna-se possível uma considerável redução nos custos de produção *in vitro* para esta espécie em particular, sendo observada cada fase da micropropagação, implicando a melhor condição de luz em cada uma delas.

Os resultados obtidos na utilização de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura sobre as variáveis: número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento de parte aérea e comprimento médio das raízes estão apresentados na Tabela 3.

Em diferentes concentrações de sacarose, obtiveram-se resultados similares para número de folhas nas concentrações de 15,0 e 30,0 gL⁻¹, enquanto que uma média inferior foi observada para meio sem adição de sacarose. O mesmo resultado foi observado para o número de brotações e comprimento de parte aérea. Com base nesses resultados é possível afirmar que, no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, podem ser utilizadas tanto a concentração convencional de sacarose (30 g L⁻¹) como a metade desta.

Chu & Ribeiro (2002) observaram que o número de folhas produzidas por gemas cultivadas *in vitro* de diferentes espécies de *Dioscorea* apresentou correlação positiva com a concentração de sacarose, sendo os melhores resultados obtidos em concentrações de 3% a 5%. Serret et al. (1997), da mesma forma, observaram que, durante o estágio de multiplicação de *Gardenia jasminoides*, as altas concentrações de sacarose no meio de cultura tiveram efeito positivo no peso final das plântulas. Apesar disso, plântulas nesta condição desenvolveram menor capacidade autotrófica.

TABELA 3 Parâmetros fitotécnicos observados para plântulas cultivadas em diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura.

Concentração de Sacarose	NF	CPA.	NR	CR.	NB
Sem sacarose	8,83 b*	1,57 b	2,92 c	1,31 a	1,72 b
15 g L ⁻¹ de sacarose	13,16 a	1,78 a	4,14 b	1,26 a	2,88 a
30 g L ⁻¹ de sacarose	13,85 a	1,71ab	5,86 a	1,19 a	3,02 a

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. NF= número de folhas; CPA= comprimento de parte aérea (cm); NR= número de raízes; CR= comprimento de raízes (cm); NB = número de brotações.

Kozai *et al.* (1991) afirmam que, na presença de fontes externas de carbono para os explantes, as plântulas não desenvolvem autotrofia, podendo causar crescimento reduzido das mesmas, bem como resultar em morte durante a aclimatização. Isso porque o acúmulo de açúcares nas folhas inibe a fotossíntese. Uma sugestão é que o acúmulo de carboidratos nas folhas pode prejudicar a produção ou consumo de ATP/NADPH no processo de fotossíntese (Neales & Incoll, 1968). Langford & Wainwright (1987) observaram ainda, que um aumento nos níveis de sacarose no meio de cultivo resultam em diminuição de CO₂ fixado, o que deve-se a um efeito prejudicial na regeneração de RuBP, que é o substrato para a carboxilação durante o ciclo de Krebs. Essa deficiência

decorre do fato de que o acúmulo de açúcares solúveis na folha promove redução de fosfato disponível no estroma do cloroplasto (Azcón-Bieto, 1983). Dimassi-Theriou & Bosabalidis (1996), que não observaram diferenças nas taxas fotossintéticas de plântulas de kiwi (*Actinia deliciosa*) cultivadas em meio WPM com ou sem sacarose, afirmam que a redução deste carboidrato no meio de cultivo pode ser aplicada neste caso.

Existem, no entanto, diversos autores contrários à idéia de redução de sacarose durante a micropropagação. Eles afirmam que os mecanismos pelos quais a concentração de carboidrato influencia na aclimatização não são muito claros, portanto, manter os níveis de sacarose em torno de 3% na fase que antecede a aclimatização é recomendável, pois, desse modo, a planta acumularia reservas de energia para sobreviver melhor ao ambiente (Capellades et al., 1990; Wainwright & Scrace 1989). George & Sherrington (1984) afirmam que há necessidade de se adicionar carboidrato ao meio de cultivo, pois as plântulas exibem taxas fotossintéticas muito pequenas.

O número de raízes observadas foi menor para as menores concentrações de sacarose. Observou-se diferença significativa entre os tratamentos, tendo as maiores médias sido observadas para a concentração de 30 g L⁻¹, seguida por 15g L⁻¹. O número médio de raízes foi inferior para o tratamento no qual as plântulas foram submetidas a frascos com meio de cultura sem sacarose. A sacarose não influenciou o comprimento das raízes (Tabela 3).

Leite et al. (2000) encontraram uma porcentagem de enraizamento para plântulas de pereira com comportamento quadrático significativo relacionado ao aumento das concentrações de sacarose. Zhou et al. (2005) descobriram que em dois ambientes de cultivo, sendo um deles sob DFFFA de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com 3% de sacarose e o outro com DFFFA de 350 a 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 0,5% de sacarose adicionada ao meio, não houve diferenças estatísticas, apesar de ter sido observada tendência de melhor enraizamento para altas concentrações de

sacarose, independente da intensidade da luz. Grattapaglia & Machado (1988) afirmam que a disponibilidade de uma fonte de energia é indispensável para que ocorra a rizogênese e ressaltam que a concentração de sacarose no meio de cultura deve ser mantida entre 2% a 3%.

Não foram observadas diferenças estatísticas em qualquer concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura para quantidade de brotos por explante, contudo, quando este carboidrato foi omitido do meio, a brotação por plântula foi prejudicada. Serret et al. (1997) encontraram que as porcentagens de brotações de *Gardenia jasminoides* a partir de cultivo autotrófico ou mixotrófico foram similares, apesar de as brotações autotróficas normalmente apresentarem folhas maiores e internós mais longos. Khan et al. (2002) não atestaram aumento no comprimento médio de brotos, número de segmentos nodais regenerados por explante e coeficiente de multiplicação de *Eucalyptus tereticosrnis* ao se retirar sacarose do meio de cultivo.

As concentrações mais apropriadas de sacarose que devem ser adicionadas ao meio de cultivo variam com a espécie a ser cultivada, com o ambiente no qual serão mantidos os frascos, com o estágio da micropropagação e com a possibilidade de se fornecer outras formas de carbono aos explantes. Neste estudo, a eliminação da sacarose não foi apropriada, devido à inviabilidade de fornecimento de carbono por outras fontes dentro dos frascos de cultivo. Ao término do experimento, plântulas cultivadas em meio de cultura sem adição de sacarose e mantidas em casa de vegetação sem sombreamento já declinavam e poucas repetições ainda sobreviviam.

Achou-se conveniente, com base nos resultados obtidos neste experimento, recomendar menores concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultivo na fase de crescimento das plântulas, pois essas não apresentaram diferenças prejudiciais ao desenvolvimento nem em sala de crescimento e nem em casa de vegetação. Além do mais, representa novas

tendências de cultivo *in vitro*, a promoção de ambientes que forcem mais as plântulas ou explantes a desenvolverem características mais próximas àquelas de plantas em condições de ambiente *ex vitro*.

3.2 Teores de clorofila

Avaliando-se os teores de clorofilas nas folhas para cada tratamento, foram observadas interações significativas para os fatores luz e sacarose nas concentrações de clorofila *a*, *b* e clorofila total.

Maiores teores de clorofila *a* foram obtidos em sala de crescimento com adição de 30g L⁻¹ de sacarose. As menores concentrações foram observadas em casa de vegetação sem sombrite e sem sacarose (Tabela 4), no qual, ao término do período experimental, os tecidos já se encontravam em intensa clorose.

TABELA 4. Teores de clorofila *a* (µg.g⁻¹) em folhas de *Cattleya walkeriana* (Gardn.) cultivadas em diferentes ambientes de luz e concentrações de sacarose.

LUZ	Concentração de sacarose			Médias para luz
	0,0 g.L ⁻¹	15,0 g.L ⁻¹	30,0 g.L ⁻¹	
Sala de crescimento	90,07Aa*	108,17Aa	122,37Aa	106,87 ^a
C.V sombrite 50%	49,89Bb	105,52Aa	117,18Aa	90,86B
C.V sem proteção	36,31Bc	70,77Ab	64,55Ab	57,21C
Médias para sacarose	58,76b	94,82 ^a	101,37a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

Deccetti (2004) afirma que o cultivo *in vitro* inibe, em determinado grau, a síntese de clorofila. Diversos trabalhos têm reportado que, para muitas espécies, a presença de sacarose no meio de cultivo tem sido considerada a principal causa da redução nos teores de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese, e baixos níveis de sacarose no meio de cultura foram correlacionados com um potencial elevado de produção de carboidrato pelas vias

fotossintéticas (Adelberg et al., 1999; Chenevard et al., 1997; Deng & Donnelly, 1993; Kanechi et al., 1998; Lee et al., 1985). Neste trabalho, as concentrações de sacarose testadas não reduziram a síntese de clorofila.

Para clorofila *b*, observou-se que as concentrações de sacarose testadas não diferiram significativamente em sala de crescimento. Casa de vegetação com sombrite resultou em maior média para meio de cultura com 30 g L⁻¹ sacarose. Em casa de vegetação sem sombrite, não houve diferença significativa para plantas cultivadas em 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, no entanto, quando este carboidrato foi omitido do meio, observou-se redução significativa nos teores de clorofila *b* (Tabela 5).

TABELA 5 Teores de clorofila *b* (µg.g⁻¹) em folhas de *Cattleya walkeriana* (Gardn.) observados para cultivo em diferentes ambientes de luz e concentrações de sacarose.

LUZ	Concentração de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	47,20Aa*	59,98Aa	68,32Aa	58,50A
C.V sombrite 50%	27,77Ba	44,45Ba	87,40 Aa	53,21A
C.V sem proteção	12,84Bb	50,54Aa	32,91Ab	32,10B
Médias para sacarose	29,27b	51,65a	62,87a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

Teores de clorofila total (Tabela 6) foram maiores em sala de crescimento com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio. Para o fator sacarose, não foram observadas diferenças significativas, para as concentrações de 15 ou 30g.L⁻¹ em nenhum dos ambientes de luz. No entanto, na ausência de sacarose foram observados menores teores em casa de vegetação, tanto com sombrite como sem. A concentração de 15 g L⁻¹ não diferiu nos diferentes tratamentos de luz e 0,0 e 30 g L⁻¹ resultaram em menores concentrações em casa de vegetação

sem sombrite. Resultados similares aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por Decchetti (2004), que observou redução no teor de clorofila total, sob maiores intensidades de luz em cultivo de *Annona glabra*.

TABELA 6. Teores de clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) nas folhas de *Cattleya walkeriana* (Gardn.) observados para cultivo em diferentes concentrações de sacarose e intensidades de luz.

LUZ	Concentração de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	137,23Aa*	168,10Aa	190,63Aa	165,32A
C.V sombrite 50%	77,65Bb	149,93Aa	204,51Aa	144,03A
C.V sem proteção	49,14Bc	121,27Aa	97,44Ab	89,28B
Médias para sacarose	88,01b	146,43a	164,19a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

Padrões similares de alterações nos teores de clorofila total, bem como na ausência de um efeito totalmente claro nas condições de cultivo sobre a razão de clorofila *a:b*, já têm sido descritos em outros trabalhos, como para *Gardenia jasminoides* (Serret et al., 1997), que se desenvolvem *in vitro* sob diferentes regimes de luz. Lee et al. (1985) não obtiveram diferenças estatísticas significativas para a razão entre clorofila *a:b*, em diferentes níveis de luz, em folhas de *Liquidambar styraciflua*.

Kaul & Sabharwal (1971), em cultura de calos de tabaco *in vitro*, concluíram que a síntese de clorofila foi inibida na presença de sacarose em torno de 6% a 8%, mas, quando essa concentração foi adicionada ao meio de cultura na concentração de 2%, que é uma concentração mais próxima àquelas usadas neste experimento (1,5% ou 3%), em quatro semanas, os calos já apresentavam concentrações elevadas de clorofila.

Como pôde ser observado, os resultados obtidos neste experimento foram similares aos de diversos autores, em que intensidades luminosas mais

baixas conduzem a uma maior produção de clorofila total. Em altas intensidades luminosas, pode-se considerar que venham a ocorrer efeitos de fotoxidação, bem como de fotoinibição. A fotoinibição tem sido observada quando plantas são expostas a diversas condições ambientais, como altos níveis de irradiância ou quando são submetidas a baixas concentrações de CO₂. Sabe-se que, no cultivo *in vitro*, as concentrações de CO₂ são baixas. Além do mais, as plântulas originalmente germinaram e tiveram crescimento inicial em intensidades luminosas menores que as que foram submetidas durante o experimento.

Stancato et al. (2002) encontraram, para uma orquídea epífita, oriunda de hibridação (*Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe), em ambiente *in vivo* que a maior intensidade de luz testada resultou em aspecto de clorose nas folhas, e sugeriram que possa ter ocorrido limitação dos mecanismos de fotoproteção, incluindo um desequilíbrio entre biossíntese e degradação de pigmentos acessórios e dissipação de calor na folha. Para melhores resultados, a germinação poderia ser efetuada desde o princípio em altas intensidades de luz ou a passagem de condições de menor para maior irradiância poderia ser feita de maneira mais gradual.

A omissão de sacarose ao meio de cultura nas maiores intensidades de luz resultou em menores teores de clorofila devido ao avançado estágio de degradação e clorose que podiam ser observados visualmente nestas plântulas ao término do período de cultivo. As concentrações de sacarose de 15,0 g L⁻¹ e 30,0 g L⁻¹ não diferiram significativamente entre si, exceto que clorofila *b* teve média inferior em casa de vegetação com sombrite na concentração de 15 g L⁻¹ em relação a 30,0 g L⁻¹, contrariando diversos autores que afirmam que a sacarose inibe a síntese de clorofila. Para esta espécie, a concentração de 30 g L⁻¹ não pode ser considerada inibitória.

3.3 Características anatômicas

Várias diferenças anatômicas foram constatadas nos tecidos foliares de plântulas cultivadas sob luz artificial e natural, principalmente com relação às espessuras totais das folhas observadas, como consequência da espessura de cada tecido analisado (epidermes adaxial e abaxial e, principalmente, o mesofilo). Foram identificadas também diferenças marcantes nas densidades estomáticas e dimensões dos estômatos de folhas mantidas nos diferentes tratamentos.

3.3.1 Avaliações das seções paradérmicas das folhas

Constatou-se, neste estudo, que as folhas de *C. walkeriana* são do tipo hipoestomática, sendo observados estômatos dos tipos anomocítico, tetracítico e ciclocítico (Figura 6), conforme já descrito por Zanenga-Godoy & Costa (2003), para *Cattleya walkeriana*, em ambiente natural.

Houve interações significativas entre os fatores luz e sacarose para as variáveis de densidade estomática e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. Maiores densidades foram encontradas para os tratamentos em casa de vegetação com e sem sombrite, quando a sacarose foi omitida do meio. Na concentração de 15 g.L⁻¹, a intensidade de luz não teve efeitos sobre a densidade estomática e, com 30 g.L⁻¹, o ambiente que resultou em maior número de estômatos/mm² foi casa de vegetação sem sombrite (Tabela 7).

Cutter (1971) descreve que, apesar da variabilidade estomática ser um fenômeno relacionado principalmente à umidade relativa dentro dos frascos, a intensidade luminosa pode ter implicações neste processo. Desse modo, de acordo com os resultados apresentados, é possível notar que as maiores densidades estão geralmente associadas à alta irradiância. Isso demonstra que plântulas *in vitro* têm a mesma tendência de plantas em ambientes naturais, que possuem geralmente mais estômatos por mm⁻² sob maiores intensidades de luz.

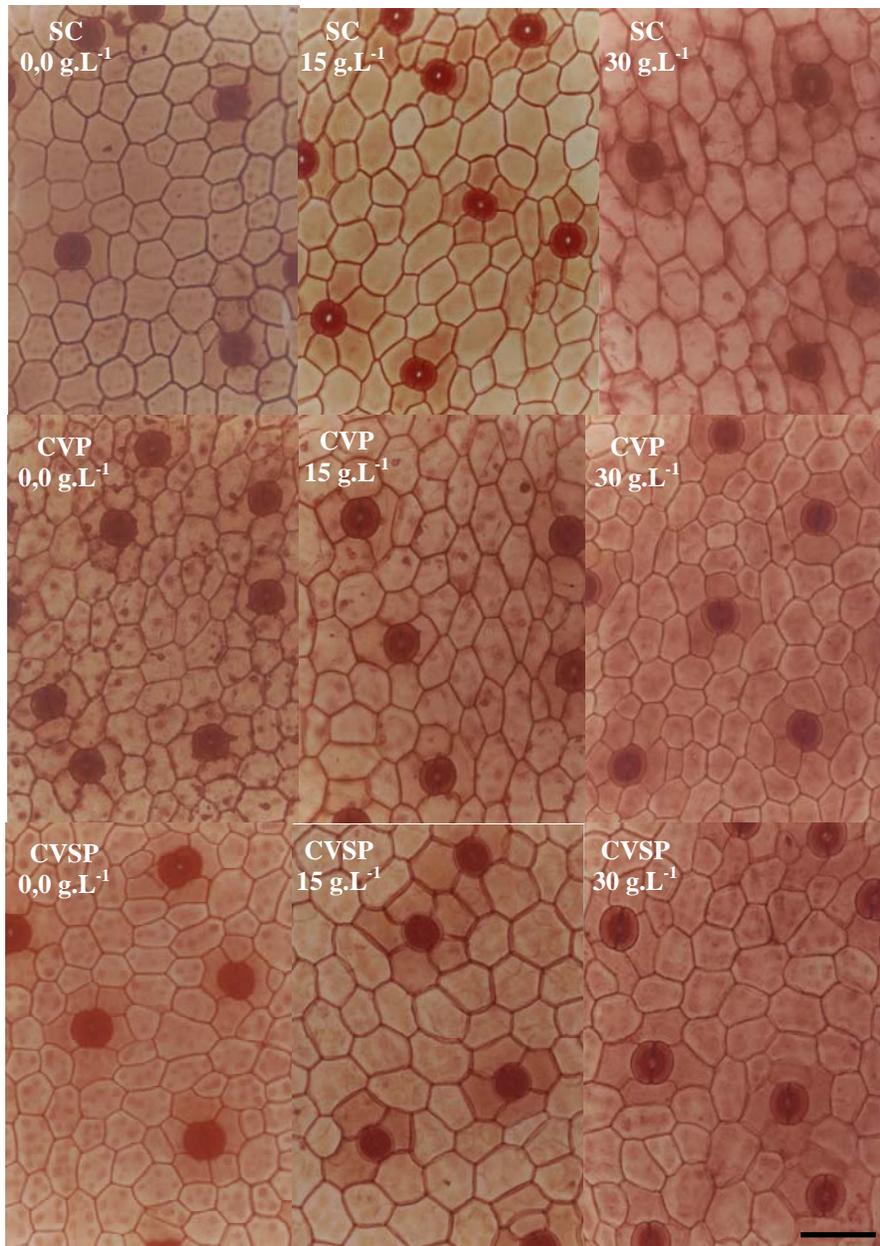


FIGURA 6: Seções paradérmicas na superfície abaxial de folhas de *C. walkeriana*. SC= sala de crescimento; CVP=casa de vegetação protegida; CVSP= casa de vegetação sem proteção; 0,0; 15 e 30 g L⁻¹ – concentrações de sacarose no meio de cultura. Barra=50µm.

TABELA 7 Densidade estomática (estômatos /mm²) nas folhas de *Cattleya walkeriana* observada para cultivo em diferentes concentrações de sacarose e intensidades de luz.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	89,39Ab*	85,84Aa	72,82Ab	82,68A
C.V sombrite 50%	111,29Aa	90,58Aa	87,62Ab	96,49A
C.V sem proteção	92,35Aab	95,90Aa	111,29Aa	99,85A
Médias para sacarose	97,68a	90,77a	90,58a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

Diversos autores têm relatado aumento na densidade estomática de folhas oriundas do cultivo *in vitro* sobre aquelas observadas em ambiente natural. Esses fatores estão associados, principalmente, à umidade relativa no interior do recipiente (Brainerd & Fuchigami, 1981; Khan et al., 2002; Lee et al., 1988; Sciutti & Morini, 1995). Em ambiente natural, Zanenga-Godoy & Costa (2003) encontraram médias de densidade estomática para *Cattleya walkeriana* de 38,87, comparadas com as médias de 82,68 em sala de crescimento; 96,49 em casa de vegetação com sombreamento e 99,85 em casa de vegetação sem proteção, que foram obtidas no presente estudo.

Contudo, sabe-se que a análise da densidade estomática, por si só, não é um parâmetro confiável para afirmar adaptabilidade anatômica de espécies cultivadas *in vitro* à aclimatização (Rocha, 2005). A alta densidade, associada à baixa capacidade de regulação estomática, tem sido considerada a principal causa da rápida dessecação das plântulas no evento da transferência para o ambiente *ex vitro* (Capellades et al., 1990; Sciutti & Morini, 1995).

Um bom indicativo de funcionalidade estomática é o formato das células guarda em conjunto e um bom parâmetro de avaliação é a relação entre diâmetro polar e diâmetro equatorial dos estômatos. De acordo com Khan et al. (2002), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma

arredondada, freqüentemente, é associada a estômatos que não apresentam funcionamento normal. Segundo Rocha (2005), quanto maior for a relação diâmetro polar/diâmetro equatorial (DP/DE), mais elipsóide é o formato do estômato, portanto, maior funcionalidade ele deve apresentar.

Wardle et al. (1983) verificaram que as plântulas de *Liquidambar styraciflua* em fase de aclimatização continham estômatos elipsóides, deprimidos em relação à superfície foliar e em menor densidade que nas folhas de plântulas oriundas do cultivo *in vitro*. Da mesma maneira, Sciutti & Morini (1995) descobriram que estômatos de ameixeira cultivados *in vitro* sob intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 100% de umidade relativa eram mais esféricos do que aqueles mantidos em intensidade de 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em 100 ou 75% de umidade relativa.

Diferentes concentrações de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) não resultaram em diferenças no diâmetro equatorial para diferentes ambientes de luz, mas, quando este carboidrato foi omitido do meio, verificou-se maior valor em casa de vegetação com sombrite (Tabela 8).

TABELA 8 Diâmetro equatorial (μm) dos estômatos nas folhas de *Cattleya walkeriana* observados para cultivo em diferentes concentrações de sacarose e intensidades de luz.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	27,02Aab*	28,93Aa	29,63Aa	28,52A
C.V sombrite 50%	29,45Aa	27,31Aa	28,29Aa	28,35A
C.V sem proteção	26,08Ab	28,35Aa	27,39Aa	27,28A
Médias para sacarose	27,52a	28,19a	28,44a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

Nos ambientes de sala de crescimento e casa de vegetação sem sombrite, as concentrações de sacarose testadas não resultaram em diferenças

significativas no diâmetro polar dos estômatos. Em casa de vegetação com sombrite, a omissão de sacarose resultou em maior média desta variável (Tabela 9). Esses dados podem revelar uma tendência em se obter maior funcionalidade estomática com a diminuição da sacarose no meio de cultivo, bem como pelo aumento da radiação.

TABELA 9 Diâmetro polar (μm) dos estômatos nas folhas de *Cattleya walkeriana* observados para cultivo em diferentes concentrações de sacarose e intensidades de luz.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g.L ⁻¹	15,0 g.L ⁻¹	30,0 g.L ⁻¹	
Sala de crescimento	28,28Aab*	25,97Ab	25,81Ab	26,69B
C.V sombrite 50%	32,08Aa	29,63ABa	27,58Bab	29,76A
C.V sem proteção	29,27Aab	30,85Aa	29,97Aa	30,03A
Médias para sacarose	29,87a	28,82ab	27,79b	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

3.3.2 Avaliações das seções transversais

Neste estudo, as epidermes de *Cattleya walkeriana* são uniestratificadas em ambas as faces da folha e o mesofilo possui parênquima clorofiliano com células de formato semelhante (Figura 7). Estes resultados são divergentes dos apresentados por Zanenga-Godoy & Costa (2003) para quatro espécies do gênero *Cattleya*, incluindo a *C. walkeriana*. Esses autores relatam, ainda, que o mesofilo é do tipo bifacial compacto, com presença de hipoderme.

Na análise de variância feita para espessura da epiderme abaxial, em função da luz, da sacarose e da interação entre esses fatores, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos na região do feixe vascular principal, e os resultados obtidos estão ilustrados nas Tabelas 10 e 11. A luz teve um efeito significativo de redução na espessura da epiderme adaxial, para o tratamento mantido em casa de vegetação sem sombrite (Tabela 10) e o

fator sacarose também influenciou na espessura deste tecido, tendo meio sem adição de carboidrato resultado em maior espessura. As concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose não resultaram em diferenças significativas entre os tratamentos, contudo, notou-se uma tendência de uma redução na espessura, com aumento das concentrações (Tabela 11). Rocha, (2005), testou as concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ no meio de cultura e também não obteve diferenças significativas para este fator com folhas de bananeira.

TABELA 10: Médias de espessura das epidermes (E) abaxial e adaxial (µm) observados para os tratamentos em diferentes ambientes com diferentes intensidades de luz.

Ambiente	E. Adaxial	E. Abaxial
Sala de crescimento	66,69 a	23,73 a
Casa de vegetação com sombrite	63,05 a	23,06 a
Casa de vegetação sem sombrite	56,79 b	21,09 a

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

TABELA 11 Médias de espessura das epidermes (E) abaxial e adaxial (µm) observados para os tratamentos de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura

Sacarose	E. Adaxial	E. Abaxial
Sem sacarose	65,79 a	23,82 a
15 g.L ⁻¹	62,45 ab	21,68 a
30 g.L ⁻¹	58,29 b	21,90 a

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

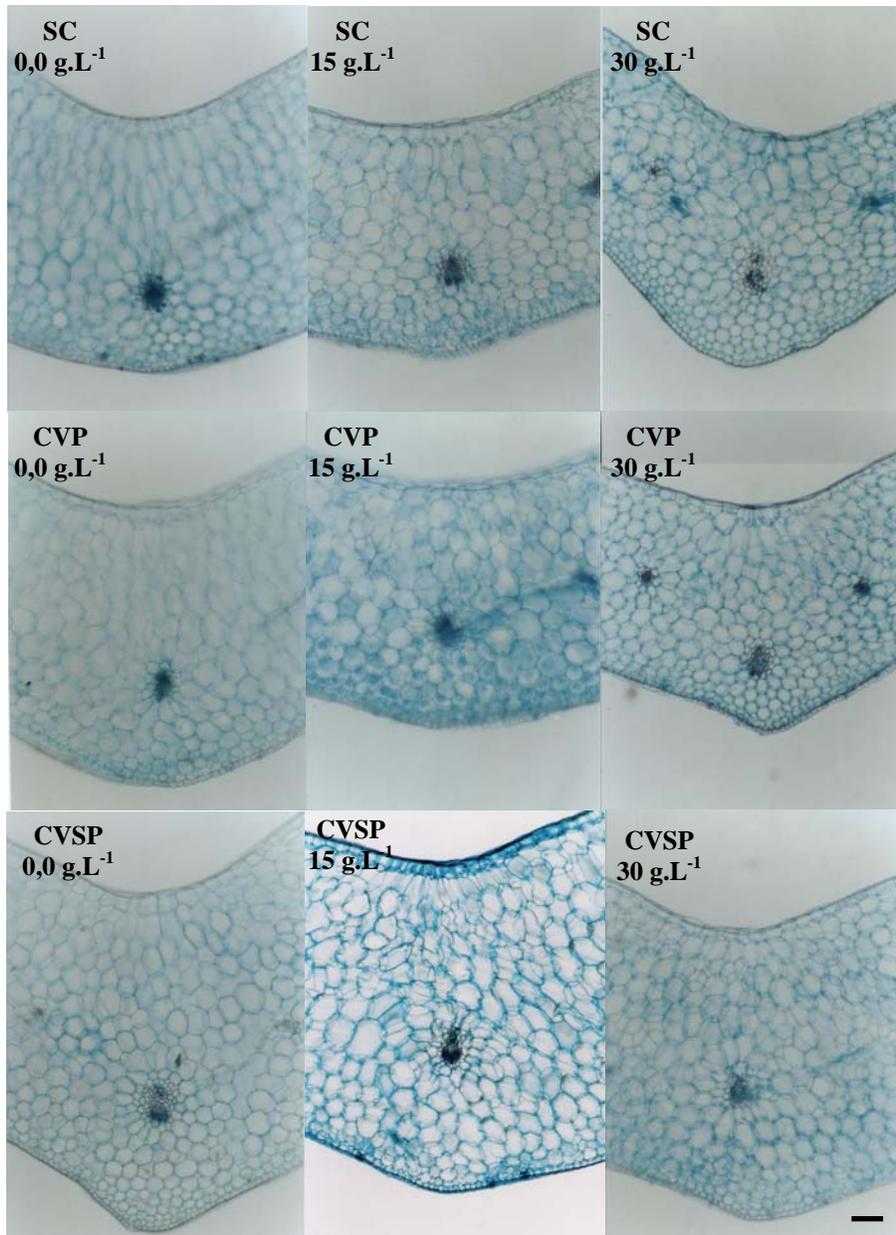


FIGURA 7: Seções transversais na região mediana de folhas de *C. walkeriana*. SC= sala de crescimento; CVP=casa de vegetação protegida; CVSP=casa de vegetação sem proteção; 0,0; 15 e 30g.L⁻¹ – concentrações de sacarose no meio de cultura. Barra=100µm.

O mesofilo foi mais espesso nas maiores intensidades luminosas (Tabela 12). A sacarose, em interação com a luz, resultou em diferenças significativas, sendo, que em sala de crescimento, a tendência foi a de que o mesofilo se apresentasse menos espesso nas maiores concentrações de sacarose, seguindo o mesmo padrão obtido para as epidermes. A espessura total do limbo foliar seguiu o mesmo padrão dos resultados obtidos para a espessura do mesofilo (Tabela 13).

TABELA 12 Espessura do mesofilo (μm) de *Cattleya walkeriana* na região mediana da folha em diferentes intensidades de luz e concentrações de sacarose.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	823,42Aa	651,57ABa	536,21Ba	670,39 B
C.V sombrite 50%	701,14Aab	685,30Aa	663,38Aab	683,22 AB
C.V sem proteção	735,38Aa	812,92Aa	843,92Ab	797,40 A
Médias para sacarose	753,31a	716,59a	681,17a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

TABELA 13: Espessura total do limbo foliar (μm) de *Cattleya walkeriana* na região mediana da folha, em diferentes intensidades de luz e concentrações de sacarose.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de Crescimento	917,13Aa	740,11ABa	625,22Bb	760,82B
C.V sombrite 50%	786,85Aab	770,17Aa	747,65Aab	768,22AB
C.V Sem Proteção	824,78Aa	891,91Aa	915,08Aa	877,25A
Médias para sacarose	842,92a	800,73a	762,63a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

Lee et al. (1988) atribuíram a altas intensidades de luz o aumento no tamanho das células do mesofilo, a maior espessura da folha, bem como compactação celular mais pronunciada, em folhas cultivadas de *Liquidambar*. Os autores afirmam, ainda, que baixas intensidades luminosas reduzem a divisão celular, resultando em reduzida área foliar, produzindo folhas mais delgadas.

Observou-se tendência de redução nas espessuras dos tecidos foliares no ambiente de sala de crescimento, apesar de essas diferenças não terem sido significativas. Resultados similares foram observados em *Gardenia jasminoides*, em que menores concentrações de sacarose resultaram em maiores espessuras foliares (Serret & Trillas, 2000). Contudo, é importante ressaltar que o cultivo *in vitro* na ausência de sacarose pode restringir a atividade fotossintética pela baixa concentração de CO₂ dentro dos frascos, sendo necessário o fornecimento adicional deste.

O aspecto dos tecidos observados nesta região da folha está ilustrado na Figura 8. A intensidade de luz, isoladamente, também não afetou a espessura das epidermes, porém, em interação com as concentrações de sacarose, a epiderme adaxial foi mais espessa em sala de crescimento quando a sacarose foi omitida do meio, comparadas às outras concentrações de sacarose neste mesmo ambiente. Além disso, em meio sem sacarose, maiores espessuras foram obtidas em sala de crescimento, quando comparadas às plântulas mantidas em casa de vegetação (Tabela 14).

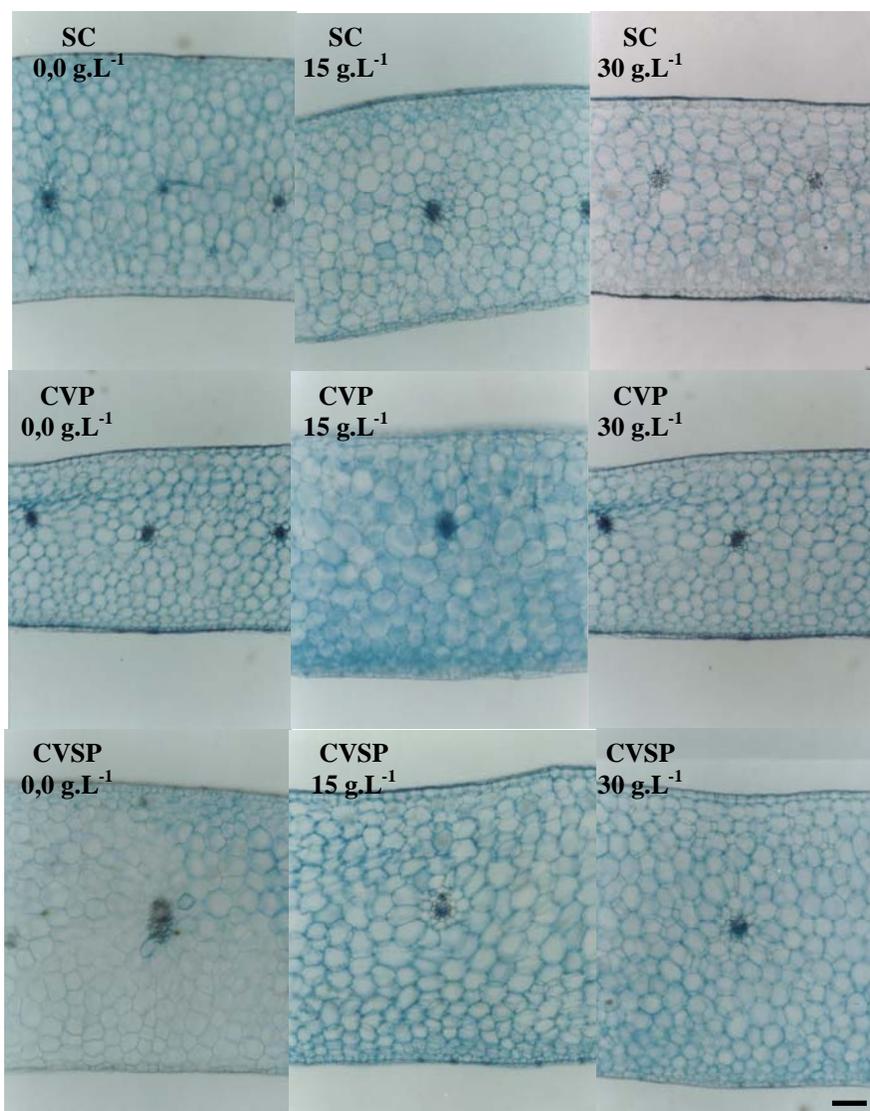


FIGURA 8: Seções transversais na região do terceiro feixe vascular de folhas de *C. walkeriana*. SC= sala de crescimento; CVP= casa de vegetação protegida; CVSP=casa de vegetação sem proteção; 0,0; 15 e 30 g L⁻¹ – concentrações de sacarose no meio de cultura. Barra=100 µm.

TABELA 14 Espessura da epiderme adaxial (μm) de *Cattleya walkeriana* na região do terceiro feixe da folha, em diferentes intensidades de luz e concentrações de sacarose.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	47,04Aa	36,75Ba	35,49Ba	39,76A
C.V sombrite 50%	37,29Ab	36,75Aa	36,15Aa	36,84A
C.V sem proteção	38,73Ab	38,04Aa	36,75Aa	36,76A
Médias para sacarose	40,02a	37,18a	36,13a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

A espessura da epiderme abaxial não variou significativamente em qualquer tratamento de luz, sacarose ou interação entre esses fatores. Em sala de crescimento, a média observada foi de 27,10 μm ; de 26,12 μm em casa de vegetação com sombrite e de 24,34 μm em casa de vegetação sem sombrite. Meio sem adição de sacarose resultou em espessura média de 25,67 μm ; meio com 15 g L⁻¹ resultou em 25,60 e meio com 30 g L⁻¹ de sacarose, resultou em média de 26,29 μm .

A espessura do mesofilo foi maior em plântulas cultivadas em casa de vegetação sem sombrite e foi afetada pelos fatores luz e sacarose em interação, como pode ser observado na Tabela 15. A espessura total do limbo foliar só apresentou diferenças estatisticamente significativas para os fatores em interação, contudo, pode-se observar, pelos dados apresentados na Tabela 16, uma tendência de maiores espessuras em maiores luminosidades.

Resultados similares aos obtidos neste experimento têm sido obtidos por outros autores. Dimassi-Theriou & Bosabalides (1996), testando diferentes concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de kiwi (*Actinia deliciosa*), verificaram que, quando a sacarose foi omitida do meio de cultura, sob radiação de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a lâmina foliar apareceu composta por mesofilo relativamente delgado, com epiderme uniestratificada em ambas as superfícies

foliares. Em meio de cultura também sem adição de sacarose, mantido em intensidade luminosa de $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, os autores observaram alterações significativas na estrutura anatômica, comparada ao tratamento de baixa irradiância, tendo ocorrido aumento no tamanho das células do mesofilo.

TABELA 15 Espessura do mesofilo (μm) de *Cattleya walkeriana* na região do terceiro feixe vascular da folha, em diferentes intensidades de luz e concentrações de sacarose.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	765,68Aa	578,88Bb	486,48Bb	610,35B
C.V sombrite 50%	641,99Aab	664,51Aa	549,79Ab	618,76AB
C.V sem proteção	551,79 Bb	549,99Aa	784,43Aa	695,40A
Médias para sacarose	653,16a	664,46a	606,89a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

TABELA 16 Espessura total do limbo foliar (μm) de *Cattleya walkeriana* na região do terceiro feixe vascular da folha, em diferentes intensidades de luz e concentrações de sacarose.

Luz	Concentrações de sacarose			Médias para luz
	0,0 g L ⁻¹	15,0 g L ⁻¹	30,0 g L ⁻¹	
Sala de crescimento	840,77Aa	641,04Bb	549,81Bb	677,20A
C.V sombrite 50%	702,95Aab	727,36Aab	614,52Ab	681,61A
C.V sem proteção	612,81Bb	813,32Aa	843,62Aa	756,58A
Médias para sacarose	718,84a	727,24a	669,32a	

*Letras maiúsculas correspondem a linhas e minúsculas a colunas. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. CV=casa de vegetação.

A concentração de sacarose não afetou a espessura dos tecidos em casa de vegetação com sombrite. Resultados similares foram obtidos por Calvete et al. (2002) em estudos com anatomia do morangueiro. No entanto, casa de vegetação sem telado resultou em menores espessuras do limbo quando a

sacarose foi omitida do meio de cultura. Já em sala de crescimento, a maior média foi obtida neste tratamento de sacarose.

Os resultados obtidos neste experimento, tais como espessamento foliar em maiores intensidades de luz, evidenciam a plasticidade foliar de *Cattleya walkeriana* ao ambiente. Essa capacidade de alteração tem sido observada para diversas espécies estudadas em cultura de tecidos (Deccetti; 2004; Dimassitheriou & Bosabalidis, 1996; Donnelly & Vidaver, 1984; Khan et al., 2002; Rocha, 2005; Serret et al., 1997; Serret & Trillas, 2000). As alterações promovidas pelo ambiente podem tornar a folha mais semelhante àquela encontrada em ambiente natural, podendo evidenciar maior capacidade fotossintética, por meio de maior diferenciação dos tecidos clorofilianos.

4 CONCLUSÕES

O ambiente de cultivo e a concentração de sacarose promovem alterações anatômicas e fisiológicas em *Cattleya walkeriana*, durante o cultivo *in vitro*.

É possível o uso de luz natural e de redução nas concentrações de sacarose no meio de cultura, durante a micropropagação de *C. walkeriana*.

As recomendações devem ser feitas observando-se a fase e os objetivos do cultivo *in vitro*.

A remoção total de sacarose no meio de cultura não é recomendada em casos como este, pois, não há fornecimento de outra fonte de carboidrato para os explantes.

A concentração de 15 g L⁻¹ pode ser usada sem efeitos prejudiciais.

5 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, n. 2, p. 95-104, 1999.

ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, Berlin, v. 150, n. 2, p. 225-263, Jan. 1980.

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

AZCÓN-BIETO, J. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, p. 681-686, 1983.

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

CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, dez. 2002.

CAPELLADES, M.; FOUNTARNAU, 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, Jan. 1990.

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J. S.; ALLEMAND, C. J. Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* n°23 X *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, n. 1/4, p. 207-217, 1997.

CHU, E. P.; RIBEIRO, R. C. L. F. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 241-249, Sept. 2002.

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

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

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

DIGNART, S. L. **Propagação *in vitro* de *Cattleya nobilior* Rchbf (Orchidaceae)** Monografia de conclusão de curso. Cuiabá – MT, 2003. 55 p.

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, n. 2, p. 127-134, 1996.

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

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Exegetics, 1984. p. 223-227.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. p. 183-260.

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 American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 2, p. 176-181, Mar. 1998.

KAUL, K.; SABHARWAL, P. S. Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, n. 5, p. 691-695, May 1971.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN,

V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 141-146, Nov. 2002.

KODYM, A.; HOLLENTHONER, S.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Costs 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, Mar./Apr. 2001.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grand Naine1) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1998.

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

KOZAI, T.; WATANABE, K.; JEON, B. R. Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 1-9, Oct. 1995.

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

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

LANGFORD, P. J.; WAINWRIGHT, M. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 60, n. 6, p. 633-640, Dec. 1987.

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

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum Flux Density Effects on

the anatomy and Surface Morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum Leaves, **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento “*in vitro*” do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência e Agrotécologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-357, abr./jun. 2000.

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

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NEALES, T. F.; INCOLL, L. D. The control of leaf photosynthetic rate by the level of assimilate concentration in the leaf: a review of the hypothesis. **Botanical Review**, New York, v. 34, n. 2, p. 107-125, 1968

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, jul./set. 2001.

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

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

SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants growth *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 257-264, Sept. 1996.

SERRET, M. D.; TRILLAS, M. I. Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* ellis leaflets cultured *in vitro*. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.

161, n. 2, p. 281-289, Mar. 2000.

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

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

STANCATO, G. C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. S. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 229-235, abr./jun. 2002.

SUTTER, E. G. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 1, p. 74-77, Jan. 1983.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.

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

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do Planalto Central Brasileiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 101-118, jan./abr. 2003.

ZHOU, Y. H.; GUO, D. P.; ZHU, Z. J.; QIAN, Q. Q. Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 105-108, Apr. 2005.

CAPÍTULO 3

CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE *Cattleya walkeriana* SUBMETIDAS A ALTERAÇÕES ESPECTRAIS DURANTE O CULTIVO *IN VITRO*

RESUMO

DIGNART, Samantha Léa. **Características morfoanatômicas e fisiológicas de *Cattleya walkeriana* submetidas a alterações espectrais durante o cultivo *in vitro***. 2005. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. ¹

O ambiente de cultivo promove alterações morfofisiológicas significativas nos tecidos propagados por meio desta técnica. A qualidade espectral pode alterar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores de luz, principalmente na região do vermelho e azul no espectro. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o efeito da alteração espectral em aspectos anatômicos morfológicos e fisiológicos de *C. walkeriana in vitro*. O cultivo foi feito durante 90 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados, pelo teste de Tukey, a 5%. Testou-se o efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre os frascos cultivados em casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC). CV-vermelho resultou em maior espessura foliar, maior densidade estomática, menor relação DP/DE e maior capacidade de aclimatização. CV-azul resultou em maior teor de clorofila total, mais cloroplastídeos por célula, menor densidade estomática e maior número de brotações laterais; em sala de crescimento, sombrite vermelho resultou em padrões bem parecidos de respostas com sombrite azul, tendo sido constatado que, nesse ambiente, a intensidade de luz incidente foi muito baixa, prejudicando o desenvolvimento da cultura. Com os resultados obtidos, é possível afirmar que a manipulação espectral da radiação durante a micropropagação de *Cattleya walkeriana* promove alterações na cultura e é possível recomendar seu uso em ambiente de luz natural, observando-se a fase da propagação e os objetivos da mesma. Esses procedimentos podem reduzir os custos de produção e melhorar a qualidade das plântulas produzidas.

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

ABSTRACT

DIGNART, Samantha Léa. **Anatomical and physiologic characteristics of *Cattleya walkeriana* submitted to spectral alterations during *in vitro* culture.** 2005. 47 p. Dissertation (Master in Major in Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The culture environment promotes morphological and physiological changes in propagated tissues by this technique. The spectral quality can promote changes in morphological and physiological plant responses through several processes mediated by photoreceptors mainly in red and blue band of spectra. The objective of this work was to evaluate the spectral change effect in anatomical and physiological aspects of *Cattleya walkeriana* during *in vitro* culture. Plantlets are grown for 90 days. Data were submitted to variance analyses and compared by Tukey's test in 5%. Net colored shade were tested (red and blue) above the flasks grown in greenhouse (GH) and Growth room (GR). GH-red gave a larger leaf thickness, higher stomata density, lower DP/DE relation and better acclimatization performance. GH-blue showed higher chlorophyll content, more chloroplastid per cell, smaller stomata density and higher lateral buds number. In GR red and blue nets had practically the same performance concluding that on this environment, the light intensity was very low and its has a development damage of plantlets. With this results, we could say, that spectral manipulation of light during *Cattleya walkeriana* micropropagation promotes changes, and its possible to recommend the use in greenhouse regarding de micropropagation phase and your objectives. These procedures can reduce the production costs and increase the cultivated plantlets quality

¹ **Guidance Committee:** Dr. Evaristo Mauro de Castro – UFLA (Adviser), Dra Angela Maria Soares Dr. Moacir Pasqual – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O fornecimento de energia luminosa para o cultivo *in vitro* é fundamental, sendo considerada mais importante para fotomorfogênese do que para qualquer outro evento mediado pela luz, tais como fotossíntese e fototropismo. Tradicionalmente, as salas de crescimento são equipadas com lâmpadas fluorescentes brancas que fornecem radiação em todas as faixas do espectro.

A qualidade espectral da luz é importante no crescimento e desenvolvimento de plantas. Atualmente, sabe-se que pigmentos distintos absorvem radiação em comprimentos de onda específicos, desencadeando nos vegetais uma série de respostas moduladas por eles, tais como alterações na anatomia e diferenciação de tecidos, alongamento de plantas, enverdecimento, desenvolvimento do aparato fotossintético, incluindo síntese de pigmentos e desenvolvimento de cloroplastídeos; acúmulo de carboidrato nas folhas, alteração nas concentrações de hormônios vegetais, principalmente auxinas e giberelinas, e inibição ou estímulo de brotações axilares.

Conhecendo-se as alterações ocorridas na planta por exposição a determinados comprimentos de onda, é possível controlar o ambiente luminoso, alterando sua composição espectral. Este tipo de controle pode habilitar as culturas para um ajuste de características de forma desejável. Esta tecnologia promove estímulos diferenciais de respostas fisiológicas de maneira direcionada, com o objetivo determinado para cada espécie individualmente, conforme o valor que a mesma possua no mercado consumidor.

Pouca bibliografia existe disponível acerca do efeito no crescimento e no desenvolvimento das plantas promovidas por alterações espectrais durante o cultivo *in vitro*. Esta é uma nova forma de cultivo, já que, tradicionalmente, as

respostas fisiológicas durante a micropropagação são todas obtidas pela aplicação de reguladores de crescimento, entre outros produtos químicos e por meio de práticas de freqüentes subcultivos que necessitam de mão-de-obra especializada.

Diante do exposto, este trabalho foi elaborado com o objetivo de alterar o ambiente de luz em sua composição espectral, visando promover respostas morfofisiológicas de interesse em *Cattleya wakeriana* para melhorar a qualidade dessas plântulas durante o cultivo *in vitro* e, principalmente, sua sobrevivência durante a aclimatização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

O material vegetal utilizado consistiu de plântulas de orquídeas da espécie *Cattleya walkeriana* Gardn., germinadas de sementes *in vitro*. As plântulas para os experimentos tinham aproximadamente 0,3 a 1,0 cm de comprimento de parte aérea, continham entre uma e três raízes e foram selecionadas por uniformidade visual.

2.1 Meio de cultura

As plântulas foram cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), conforme recomendado por Dignart (2003). O meio foi acrescido de 6 g L⁻¹ de ágar, 15 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e o meio foi autoclavado a 121°C de temperatura e 1,2 atm, durante 20 minutos.

2.2 Ambiente de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Agricultura da UFLA, sendo os frascos fechados com tampas de polipropileno e vedados com plástico do tipo parafilme. O material foi colocado diretamente sobre as bancadas ou sob malhas especiais que, segundo o fabricante, alteram o espectro de luz solar ou, ainda, sob proteção adicional de tela preta, que retém 50% da radiação solar (Figura 1). As malhas coloridas utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysac Plastic Industries[®]. Utilizou-se a malha ChromatiNet Vermelha 50%, produzida com a finalidade de alterar espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescentando as ondas na

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

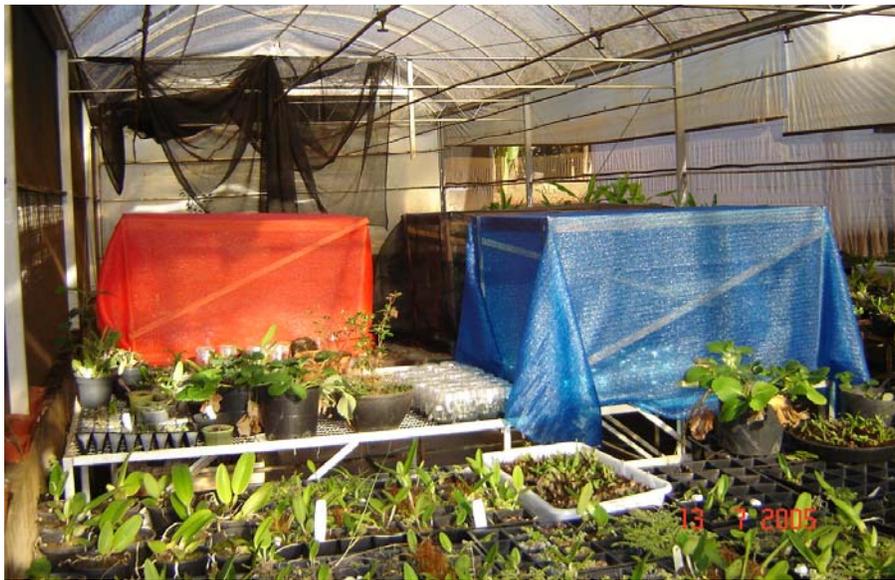


FIGURA 1. Visão geral das plântulas mantidas em casa de vegetação. UFLA, Lavras, MG, 2005.



FIGURA 2: Ambientes de cultivo dos frascos mantidos em Sala de Crescimento convencional. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Foram cultivadas também plântulas em frascos mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com radiação de $5,52 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes para servirem como tratamento controle. Em sala de crescimento, foram testadas também as coberturas coloridas CromatiNet vermelha e azul (Figura 2). Estes locais de incubação constituíram um fator a ser estudado, permitindo a comparação dos dados obtidos em condições convencionais de micropropagação (sala de crescimento sem cobertura), em sala de crescimento com cobertura colorida e o cultivo sob luz natural (com ou sem proteção das malhas coloridas).

A intensidade da radiação foi mensurada por meio de sensores de radiação acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb).

A radiação e a temperatura foram mensuradas em dias típicos da estação. Três sensores foram acoplados ao sistema de registro em cada dia avaliado. No dia 22 de setembro, os sensores foram colocados nos ambientes de casa de vegetação sem sombrite, com sombrite vermelho e azul. No dia 26 de setembro os sensores foram colocados em casa de vegetação com sombrite vermelho, azul e preto (Tabela 1).

Tabela 1 Radiação ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$) observadas nos microambientes em casa de vegetação e sala de crescimento.

Ambiente	Radiação	Ambiente	Radiação	Ambiente	Radiação
CV	3,15	CVP	1,62	SC	3,33
CVV	2,31	CVV	1,63	SCV	1,30
CVA	3,15	CVA	1,50	SCA	1,61

CV= casa de vegetação sem sombrite; CVV=casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA=casa de vegetação com azul; CVP=casa de vegetação com Preto; SC=sala de crescimento sem sombrite; SCV=sala de crescimento com vermelho; SCA=sala de crescimento com azul.

2.3 Variáveis avaliadas

Após 90 dias de cultivo, foram avaliadas as características descritas a seguir:

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

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

2.3.3 Características anatômicas

2.3.3.1 Microscopia de luz

As plântulas selecionadas para os estudos anatômicos foram fixadas em álcool etílico 70%, até a realização das análises. Foram coletadas folhas na posição (2), conforme descrito no capítulo 2.

Os cortes paradérmicos foram efetuados, manualmente, no terço médio foliar, na superfície abaxial das folhas. Para os cortes transversais, utilizou-se um micrótomo de mesa, sendo os cortes retirados da mesma região da folha.

As seções transversais foram clarificadas em hipoclorito de sódio 1% durante um minuto, sendo enxaguados em água destilada por cinco minutos. Após a lavagem, as seções foram coradas com azul de astra e safranina, seguindo a metodologia descrita por Kraus & Arduin (1997). As lâminas foram montadas em glicerina 50%. Para cada tratamento foram avaliadas 5 folhas de

plantas diferentes, tendo para cada folha, sido efetuadas cinco avaliações em campos diferentes. Utilizou-se uma ocular micrometrada acoplada a um microscópio de luz. As variáveis analisadas para as seções transversais foram: espessura das epidermes nas faces superior e inferior, espessura do mesófilo e limbo foliar.

As lâminas das seções paradermicas foram montadas com corante safranina em glicerina com concentração de 1% (v/v). Dessas seções, as variáveis analisadas foram a densidade estomática (n° de estômatos por mm^{-2}) e diâmetros polar e equatorial dos estômatos. A frequência estomática foi avaliada com auxílio de uma câmara clara, em microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica descrita por Laboriau et al. (1961). Para cada corte, foram avaliados cinco campos.

As fotomicrografias foram feitas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da UFLA, utilizando-se um microscópio Olympus modelo BX 60 acoplado a uma máquina fotográfica.

2.3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão

Todas as amostras foram imersas em solução fixativa (Karnovisk's modificado), pH 7,2 por um período de 24 horas, lavadas em tampão cacodilato por 3 vezes, pós-fixada em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, lavadas por 2 vezes, de 15 minutos em água destilada.

Depois de fixado, o material selecionado para microscopia de varredura (MEV) foi desidratado em gradientes de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) por três vezes de 10 minutos. Em seguida, este material foi levado para o aparelho de ponto crítico para secagem, montado em "stubs" para ser então coberto por ouro. As análises foram efetuadas em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo40 XVP.

As amostras para microscopia de transmissão (MET), depois de fixadas,, foram transferidas para solução a 0,5% de acetato de uranila, por 12 horas a 4°C. Em seguida, foram desidratadas em gradiente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), por 3 vezes de 10 minutos em cada concentração e imersas em gradiente crescente de Spurr/acetona, 30% (8h), 70% (12h) e 100% (2 vezes de 24h), sendo os espécimes montados em moldes e colocadas para polimerizar em estufa a 70°C por 48 horas.

Os blocos obtidos foram levados a um aparelho de “Trimming” para retirada dos excessos e, em seguida, obtiveram-se seções ultrafinas (< 100 nm) com auxílio de um ultramicrotomo Reichert Jung (Ultracut E) acoplado à navalha de diamante. Os cortes foram coletados em grades de ouro, secas em raques de alumínio e pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109A a 80 Kv.

2.3.4 Aclimatização

Ao término de 90 dias de cultivo 30 plântulas por tratamento foram testadas quanto à capacidade de aclimatização. As plântulas foram colocadas em bandejas contendo xaxim como substrato e foram mantidas na mesma casa de vegetação onde foram previamente conduzidos os experimentos. A capacidade de aclimatização foi avaliada pela porcentagem de sobrevivência em cada tratamento ao término de um mês.

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

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e dezesseis repetições cada um. A repetição era composta

por um frasco contendo cinco plântulas. Dessas 16 repetições, seis foram utilizadas para análises fitotécnicas, as quais foram posteriormente usadas para avaliações anatômicas; quatro foram destinadas à quantificação dos teores de clorofilas nas folhas e seis foram utilizadas no experimento de aclimatização.

Aos 90 dias de cultivo, realizou-se a coleta de dados. Os dados foram submetidos a testes de homogeneidade de variâncias e normalidade e, tendo sido comprovados estes parâmetros, foram então submetidos à análise de variância. Os dados que apresentaram coeficiente de variação maior que 20% foram transformados em $\log.x + 1$ ou \sqrt{x} . As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAEG®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características fitotécnicas

O número de folhas observado em sala de crescimento foi maior que em casa de vegetação. Observou-se que diferentes coberturas coloridas para ambientes similares (sala de crescimento ou casa de vegetação) não resultaram em diferenças estatísticas para esta variável (Tabela 2). Resultados similares foram obtidos por Silva & Debergh, (1997) que também não observaram diferença para esta variável em tratamentos de alteração de qualidade espectral.

Os valores obtidos para comprimento de parte aérea foram maiores em sala de crescimento, sob telas azul e vermelha (Tabela 2). Esses resultados podem ser o reflexo de um crescimento já com características de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente. Esse aspecto já foi relatado por Radmann et al. (2001) no cultivo de *Gypsophila paniculata*, em diferentes intensidades luminosas. Todas as plântulas mantidas em casa de vegetação desenvolveram um menor comprimento de parte aérea, quando comparadas às plântulas mantidas em sala de crescimento (Tabela 2).

TABELA 2. Parâmetros fitotécnicos observados para plântulas cultivadas em diferentes ambientes com diferentes coberturas coloridas.

LUZ	NF	CPA	NR	CR	NB
Sala de crescimento	10,35 ab	2,15 ab	3,55 ab	1,17 a	1,00 ab
SC vermelho	10,80 a	2,47 a	2,85 ab	1,07 a	1,20 a
SC azul	10,47 ab	2,65 a	2,71 b	1,17 a	1,24 a
Casa de vegetação	7,89 bc	1,60 bc	3,24 ab	1,33 a	0,80 abc
CV vermelho	7,24 c	1,41 c	3,31 ab	1,24 a	0,38 c
CV azul	7,55 c	1,48 c	3,41 ab	1,28 a	0,54 bc
CV preto	7,78 c	1,94 abc	3,73 a	1,19 a	0,71 abc

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. NF= número de folhas; CPA= comprimento de parte aérea (cm); NR= número de raízes; CR= comprimento médio de raízes (cm); NB = número de brotações. SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

Existem poucos relatos sobre os efeitos que a qualidade espectral ou os níveis de irradiância têm no crescimento e desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*, devido ao foco das pesquisas com alterações no meio de cultura (Marks & Simpson, 1999). A radiação vermelha, de modo geral, promove um alongamento de parte aérea, como já foi constatado em diversos estudos com alteração na qualidade de luz (Appelgren, 1991; Marks & Simpson, 1999; Silva & Debergh, 1997), mas, esse alongamento não é uma característica geral, e muitos autores afirmam que a influência da qualidade espectral sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas está fortemente associada à espécie vegetal (Antonopolou et al., 2004; Hunt & Burrit, 2001; Schuerger et al., 1997).

Lee et al. (2000) observaram também que em duas espécies de *Hopea*, a intensidade da luz foi mais significativa no desenvolvimento do que a variação na qualidade espectral. No presente estudo, em casa de vegetação, observaram-se menores comprimentos de parte aérea, sendo essas, contudo, mais rígidas que as obtidas em sala de crescimento, principalmente sob as telas vermelha e azul.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para comprimento médio de raízes. Para número de raízes, todos os tratamentos foram similares, exceto sala de crescimento com sombrite azul, que resultou em uma média inferior (Tabela 2). Também não foram observadas diferenças no enraizamento para *Pinus silvestris* cultivados *in vitro*, sob diferentes espectros de luz (Niemi et al., 2005). Antonopolou et al. (2004) encontraram melhores taxas nos parâmetros de enraizamento sob radiação branca, em vez das monocromáticas, isso porque esse tipo de radiação contém todos os comprimentos de onda necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos. No presente estudo, é provável que, apesar do enriquecimento de certos comprimentos de onda sob coberturas coloridas, a radiação incidente sobre os frascos de cultura não tenha se tornado monocromática, oferecendo, dessa forma, todos os comprimentos de onda

necessários para um enraizamento satisfatório e similar entre os diferentes tratamentos. Morini et al. (2000) também encontraram maior taxa de regeneração de raízes por explante foliar de *Cydonia oblonga* em amplo espectro, ou seja, sob radiação de cor branca.

Os maiores números de brotações foram obtidos em sala de crescimento, não diferindo estatisticamente entre esses ambientes. Isso sugere que a intensidade de radiação não tenha sido alta o suficiente para promover alterações sob essas coberturas.

Em casa de vegetação, mais brotações laterais foram formadas em plântulas sem cobertura e com sombrite preto e azul. A formação de brotos axilares pode ser o resultado da liberação da dominância apical, tanto pela fotoxidção de auxinas em altas intensidades de luz como pela degradação desse regulador em luz azul (Chee & Pool, 1989). O tratamento que resultou em menor número de brotações em casa de vegetação foi cobertura vermelha (Tabela 2). A radiação vermelha pode promover crescimento apical ativo, isso porque o fitocromo atua no controle de enzimas que afetam o metabolismo das auxinas; por isso, esse tipo de regulador pode ser conservado em culturas iluminadas com luz vermelha (Marks & Simpson, 1999).

3.2 Teores de clorofila

O maior teor de clorofila *a* foi obtido em sala de crescimento sem cobertura colorida (Tabela 3). Os demais resultados são estatisticamente similares, exceto casa de vegetação com sombrite vermelho, que resultou em uma média inferior desta clorofila. Silva & Debergh (1997) encontraram resultados similares para *Azorina vidalii*, e não observaram diferenças nos teores de clorofila *a* para tratamentos enriquecidos com luz azul, e, em radiação enriquecida com vermelho, ocorreu uma diminuição deste pigmento.

TABELA 3. Teores de clorofilas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) observados para plântulas cultivadas em diferentes ambientes com diferentes coberturas coloridas.

LUZ	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	a:b
Sala de crescimento	88,84 a	37,64 a	126,45 a	2,36 ab
SC vermelho	63,45 ab	15,79 b	79,22 b	2,42 ab
SC azul	60,27 ab	21,09 b	81,34 b	2,92a
Casa de vegetação	60,49 ab	27,39 ab	87,85 b	2,24 ab
CV vermelho	52,57 b	25,80 ab	78,36 b	2,05 b
CV azul	67,30 ab	38,09 a	105,36 ab	1,77 b
CV preto	59,22 ab	35,81 a	95,00 ab	1,65 b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.
SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

Na análise dos teores de clorofila *b* observou-se que os tratamentos com telas coloridas em sala de crescimento resultaram em menores valores e os demais tratamentos foram similares (Tabela 3). Silva & Debergh (1997) também não obtiveram diferenças estatísticas para os teores de clorofila *b* de plântulas cultivadas sob enriquecimento com luz azul ou vermelha. Os baixos valores obtidos em sala de crescimento com telas coloridas podem ser devido à baixa quantidade total de fluxo de fótons recebidos, devido à retenção pelas telas. Radmann et al. (2001) também apontaram evidências de que as baixas irradiâncias não permitiram um desenvolvimento adequado do aparato fotossintético. Milivojević & Eskins (1990), da mesma forma, afirmam que os efeitos da luz azul e vermelha nas plantas são uma função direta dos níveis de irradiância nesses comprimentos de onda.

Em casa de vegetação, observou-se tendência de maiores teores de clorofila *a b* e total em plântulas cultivadas sob sombrite de cor azul. Milivojević & Eskins (1990) também observaram aumento na síntese de clorofilas *a e b* em *Pinus nigra* em luz azul quando comparada à aplicação de luz vermelha. Isso ocorre porque a luz azul é importante na síntese deste pigmento (Schuerger et al., 1997). Em seguida, as maiores médias foram àquelas obtidas em radiação de

amplo espectro, ou seja, em folhas de plântulas mantidas em frascos cultivados sem sombrite ou com sombrite preto, se comparados às aquelas cultivadas em vermelho. Contudo, os teores de clorofila total não diferiram estatisticamente entre sombrite vermelho e plantas cultivadas sem cobertura (Tabela 3).

Entre todos os tratamentos, o que resultou em maior quantidade de clorofila total foi nas plantas mantidas em sala de crescimento (Tabela 3). Esses resultados podem ser explicados porque, em intensidades de luz mais baixas, um aumento na concentração total de clorofilas garante uma absorção mais eficiente da radiação (Atroch et al., 2001; Engel & Poggiani, 1991).

A relação de clorofila *a:b* foi maior em sala de crescimento, para todos os tratamentos. Já os menores valores foram obtidos nos tratamentos em casa de vegetação com sombrite, não diferindo estatisticamente entre as cores (Tabela 2). Esses resultados diferiram dos obtidos por Marks & Simpson (1999) que observaram um aumento da relação em luz vermelha e diminuição em luz azul quando comparados ao controle de luz branca.

3.3 Características anatômicas

As maiores densidades de estômatos foram obtidas em sala de crescimento sem sombrite e com cobertura vermelha, e em casa de vegetação sem cobertura (Tabela 4). Menores densidades foram observadas em plântulas cultivadas sob cobertura azul, tanto em casa de vegetação como em sala de crescimento. Esses resultados podem ser comparados aos obtidos por Rajapske & Kelly (1993), que observaram menor densidade estomática em crisântemo cultivado sob filtros de CuSO_4 , que produz os mesmos efeitos de filtros de luz azul.

TABELA 4 Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial dos estômatos (μm) e relação DP/DE entre estômatos para folhas de plântulas cultivadas em diferentes ambientes de luz com telas coloridas.

LUZ	Densidade	DP	DE	DP/DE
Sala de crescimento	141,34 ab	27,54 b	24,32 c	1,14 a
SC vermelho	167,98 a	27,68 b	24,50 c	1,14 a
SC azul	105,82 c	28,46 ab	24,89 c	1,15 a
Casa de vegetação	143,56 ab	29,40 ab	29,50 ab	1,00 b
CV vermelho	114,70 bc	31,07 a	31,75 a	0,98 b
CV azul	104,34 c	30,21 ab	28,82 b	1,05 ab
CV preto	122,84 bc	29,43 ab	29,05 b	1,01 ab

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.
SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

Maiores relações DP/DE foram obtidas em todos os tratamentos de sala de crescimento e em tela preta e azul, em casa de vegetação. Os tratamentos que resultaram nas menores médias foram tela vermelha e casa de vegetação sem sombrite (Tabela 4). Observou-se maior deposição de cera nos tratamentos em casa de vegetação, principalmente em frascos cultivados sem sombreamento adicional ou sob sombrite preto. Tanto em sala de crescimento como em casa de vegetação, observou-se menor deposição de ceras em frascos cultivados sob vermelho do que em azul. As células epidérmicas são mais alongadas nos tratamentos em azul e vermelho, tanto em casa de vegetação como em sala de crescimento (Figura 5).

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para espessura da epiderme adaxial (Tabela 5). Plântulas mantidas em sala de crescimento sem sombrite tiveram menor espessura de epiderme abaxial. Nos demais tratamentos, os resultados foram similares e as plântulas em casa de vegetação com sombrite vermelho foram as que tiveram a maior espessura desta epiderme (Tabela 5). Schuerger *et al.* (1997) não observaram diferenças significativa para espessura das epidermes em *Capsicum annum*,

tendo esses autores afirmado que o mesofilo é mais eficiente nas respostas de alterações espectrais.

A espessura do mesofilo foi maior em casa de vegetação e inferior e todos os tratamentos de sala de crescimento (Tabela 5), evidenciando a importância da influência da intensidade de luz sobre as características desse tecido foliar, como já relatado por diversos autores (Castro et al., 1998; Deccetti, 2004; Rocha, 2005; Serret et al., 1997).

TABELA 5 Espessura dos tecidos foliares de *Cattleya walkeriana* na região do feixe vascular principal, em diferentes ambientes, com diferentes coberturas coloridas.

LUZ	EAd	EAb	MESO	ETL
Sala de crescimento	53,13 a	15,30 b	494,59 c	563,02 c
SC vermelho	61,71 a	19,53 ab	580,29 bc	661,53 bc
SC azul	58,74 a	16,02 ab	547,30 bc	622,06 bc
Casa de vegetação	57,96 a	20,55 ab	636,47 abc	714,98 abc
CV vermelho	70,47 a	21,60 a	759,99 a	852,06 a
CV azul	66,00 a	20,43 ab	662,02 ab	748,45 ab
CV preto	55,59 a	19,83 ab	622,95 abc	698,37 abc

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

EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL= espessura total do limbo, SC=sala de crescimento, CV=casa de vegetação.

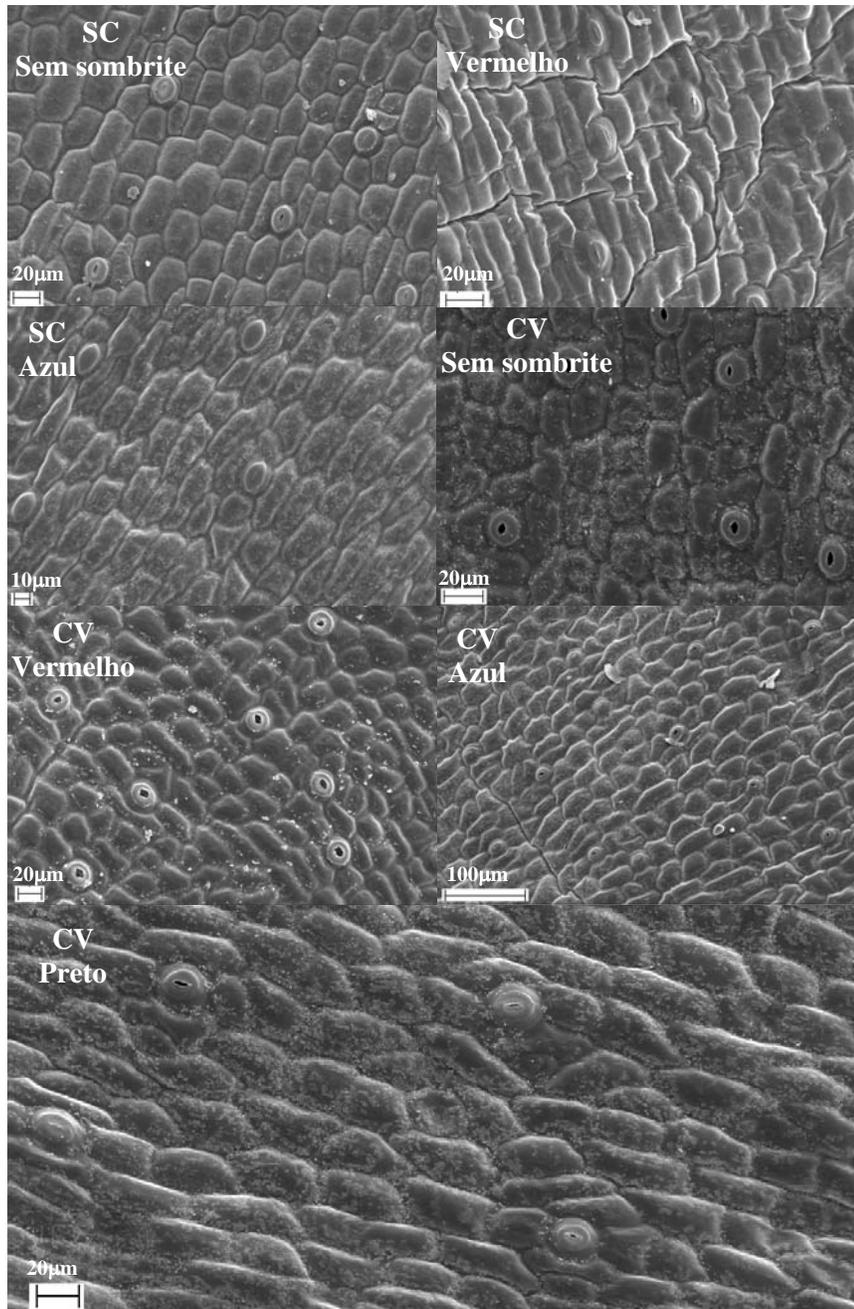


FIGURA 5 Superfície abaxial de folhas de plântulas cultivadas em diferentes ambientes de luz com coberturas coloridas. SC= sala de crescimento; CV=casa de vegetação. Lavras, 2005.

A maior espessura do mesofilo foi obtida em casa de vegetação com tela vermelha (Tabela 5). Esse resultado difere de outros obtidos por tratamentos de alterações espectrais, pois, na maioria dos casos, observa-se redução da espessura foliar sob radiação vermelha (Cui et al., 1991; Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997). A característica de redução no espessamento de tecidos foliares sob radiação vermelha está associada fortemente a características da espécie, a um aumento na relação V:VD (Barreiro et al., 1992) ou a uma redução no níveis de luz azul (Pushnick et al., 1987; Saebo et al., 1995). Além disso, maior espessura foliar em sombrite vermelho neste experimento pode ser resultado de um crescimento vegetativo mais vigoroso (Reshef, 2005; Shahak, 2005). O fitocromo está também associado à concentração de alguns hormônios de crescimento, pois atua na conversão de giberelinas em sua forma inativa para a ativa. Esse regulador está associado ao alongamento celular (Almeida & Mundtack, 2000; Marks & Simpson, 1999), o que também pode ter contribuído para maior espessura do mesofilo em casa de vegetação com sombrite vermelho, onde foram observadas células mais alongadas que em outros tratamentos (Figura 7)

Quando comparadas à radiação sem alteração espectral com telas coloridas, as telas azuis promoveram tendência de maior espessamento do mesofilo. Outros autores já observaram espessamento foliar quando plantas foram cultivadas sob radiação azul, comparadas à radiação de amplo espectro (Saebo et al., 1995; Schuerger et al., 1997).

O mesofilo de *C. walkeriana* observado possui parênquima clorofiliano com células de formato semelhante e epiderme adaxial mais espessa que a abaxial (Figuras 6, 7 e 8).

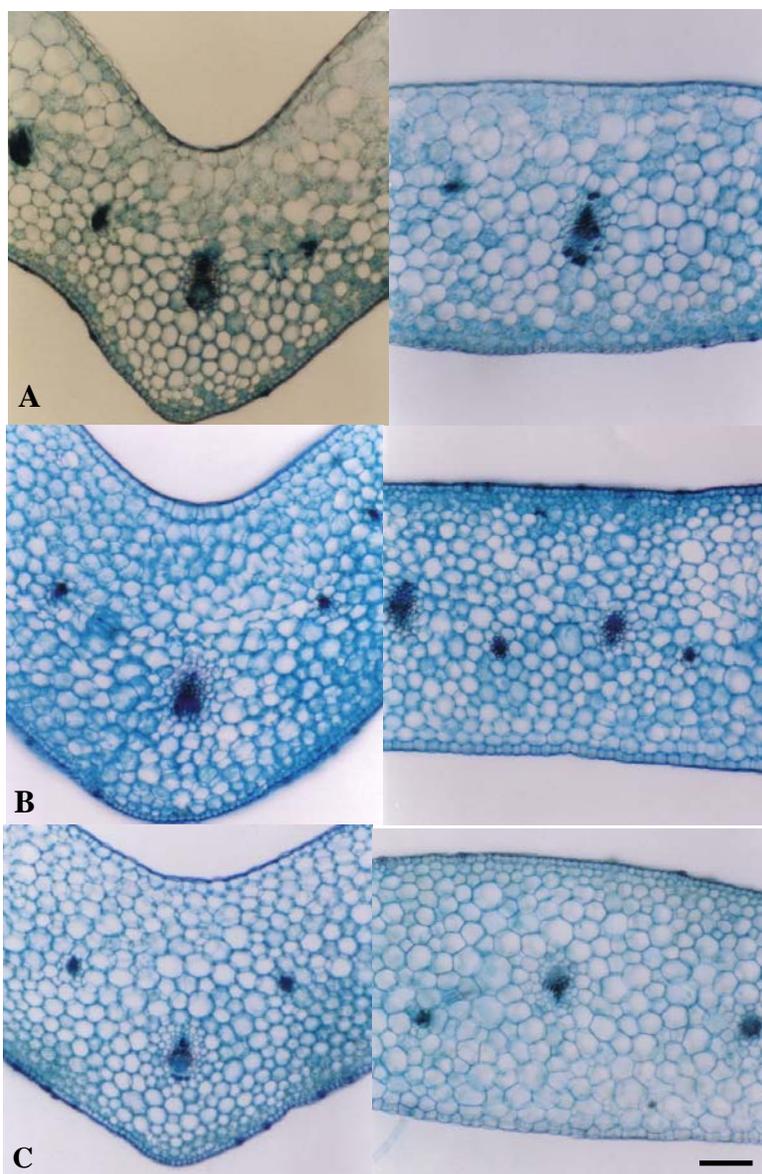


FIGURA 6: Seções transversais de folhas de *C. walkeriana* cultivadas na região do feixe principal e terceiro feixe vascular em diferentes qualidades de luz em sala de crescimento. A=luz branca; B=sombrite vermelho; C=sombrite azul. Lavras, 2005. Barra = 100 μ m.

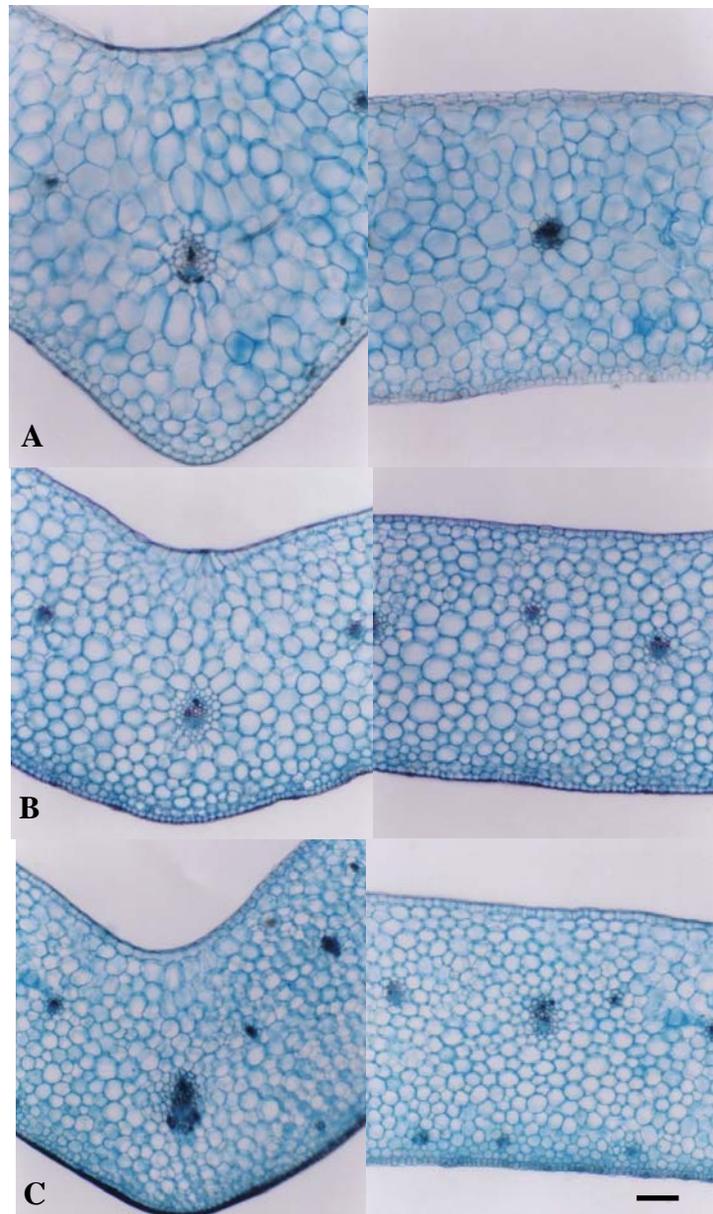


FIGURA 7: Seções transversais de folhas de *C. walkeriana* cultivadas na região do feixe principal e terceiro feixe vascular em diferentes qualidades de luz em casa de vegetação. A=sombrite vermelho; B=sombrite azul; C=sombrite preto. Lavras, 2005. Barra= 100 μ m.

Na região do terceiro feixe vascular não foram observadas diferenças estatísticas para epidermes adaxial e abaxial. O mesofilo foi mais espesso em casa de vegetação sem sombrite e com sombrite vermelho. Sombrite azul e preto não resultaram em diferenças significativas em casa de vegetação (Tabela 6).

Em sala de crescimento, não houve diferença significativa na espessura do mesofilo para plantas cultivadas em coberturas vermelha e azul, mas, as plântulas em sala de crescimento sem cobertura, apresentaram o mesofilo menos espesso. Como não houve diferenças estatísticas entre as epidermes, a espessura total do limbo foliar seguiu o mesmo padrão observado no tecido do mesofilo.

TABELA 5: Espessura dos tecidos foliares (μm) de *Cattleya walkeriana* na região do terceiro feixe vascular, em diferentes ambientes, com diferentes coberturas coloridas.

LUZ	EAd	EAb	MESO	ETL
Sala de crescimento	30,15 a	21,00 a	416,70 c	467,85 c
SC vermelho	37,26 a	23,31 a	458,62 bc	519,19 bc
SC azul	32,85 a	20,37 a	463,26 bc	516,48 bc
Casa de vegetação	35,40 a	22,92 a	636,78 a	695,10 a
CV vermelho	33,03 a	23,10 a	678,81 a	734,94 a
CV azul	32,73 a	22,83 a	590,16 ab	645,72 ab
CV preto	33,96 a	22,47 a	574,57 ab	631,00 ab

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.
EAd=epiderme adaxial; EAb=epiderme abaxial; MESO=mesofilo; ETL= espessura total do limbo. SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

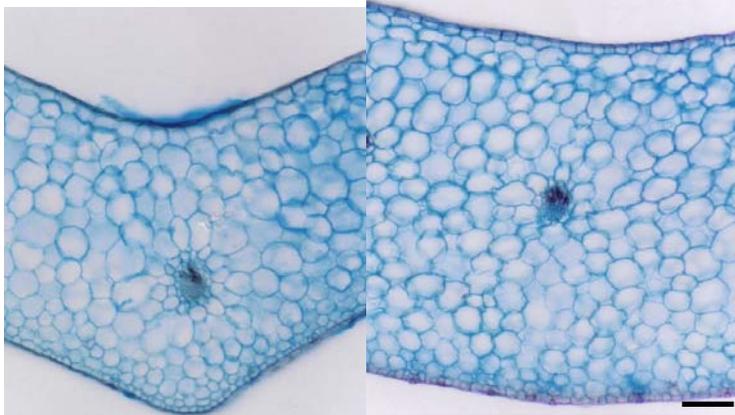


FIGURA 8: Seções transversais de folhas de *C. walkeriana* cultivadas na região do feixe principal e terceiro feixe vascular, em casa de vegetação sem sombrite. Lavras, 2005. Barra= 100 μ m.

Em todos os tratamentos, os cloroplastos foram observados próximos à parede celular, somente no tratamento de casa de vegetação com sombrite preto; algumas dessas organelas estavam dispersas no meio intracelular (Figura 9).

Um maior número de cloroplastídeos por célula foi observado em plântulas cultivadas em casa de vegetação e cobertas por sombrite azul (Tabela 6). Os demais tratamentos aplicados neste ambiente (casa de vegetação) tiveram resultados similares. A luz azul é importante para o desenvolvimento de cloroplastos e tem se mostrado mais eficiente que a luz vermelha para esta característica, como já foi relatado por Saebo et al. (1995), em *Betula pendula* cultivada *in vitro* e por Schuerger et al. (1997), para *Capsicum annuum*.

Em sala de crescimento, o maior número de cloroplastos por célula foi observado em frascos mantidos diretamente nas bancadas, sem cobertura colorida, seguidos pelo tratamento de sombrite azul. Entre todos os ambientes testados, o que proporcionou menor número de cloroplastos foi sala de crescimento com sombrite vermelho (Tabela 7). Nesse tratamento, as células eram visivelmente maiores e os cloroplastídeos mais dispersos.

TABELA 7 Número de cloroplastos por célula, altura (μm), largura (μm) e área (μm^2), em plântulas cultivadas em diferentes ambientes de luz com telas coloridas.

LUZ	Nº/Célula	Altura	Largura	Área
Sala de crescimento	5,50 ab	5,66 a	1,80 abc	5,80 bc
SC vermelho	3,00 c	5,84 a	1,42 bc	6,65 ab
SC azul	4,90 b	5,28 ab	1,51 abc	6,15 abc
Casa de vegetação	6,00 ab	4,78 ab	2,13 a	8,90 a
CV vermelho	6,30 ab	5,66 a	1,73 ab	7,42 ab
CV azul	7,20 a	5,34 ab	1,66 abc	6,22 abc
CV preto	5,80 ab	4,40 b	1,19 bc	3,90 c

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.
SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

Os cloroplastos de maior área foram observados no tratamento de casa de vegetação em frascos cultivados sem cobertura. Esses cloroplastos tinham forma mais arredondada e não continham muitos grãos de amido (Figura 9). O tratamento que resultou em cloroplastos de menor área foi o tratamento de casa de vegetação em sombrite preto (Tabela 7).

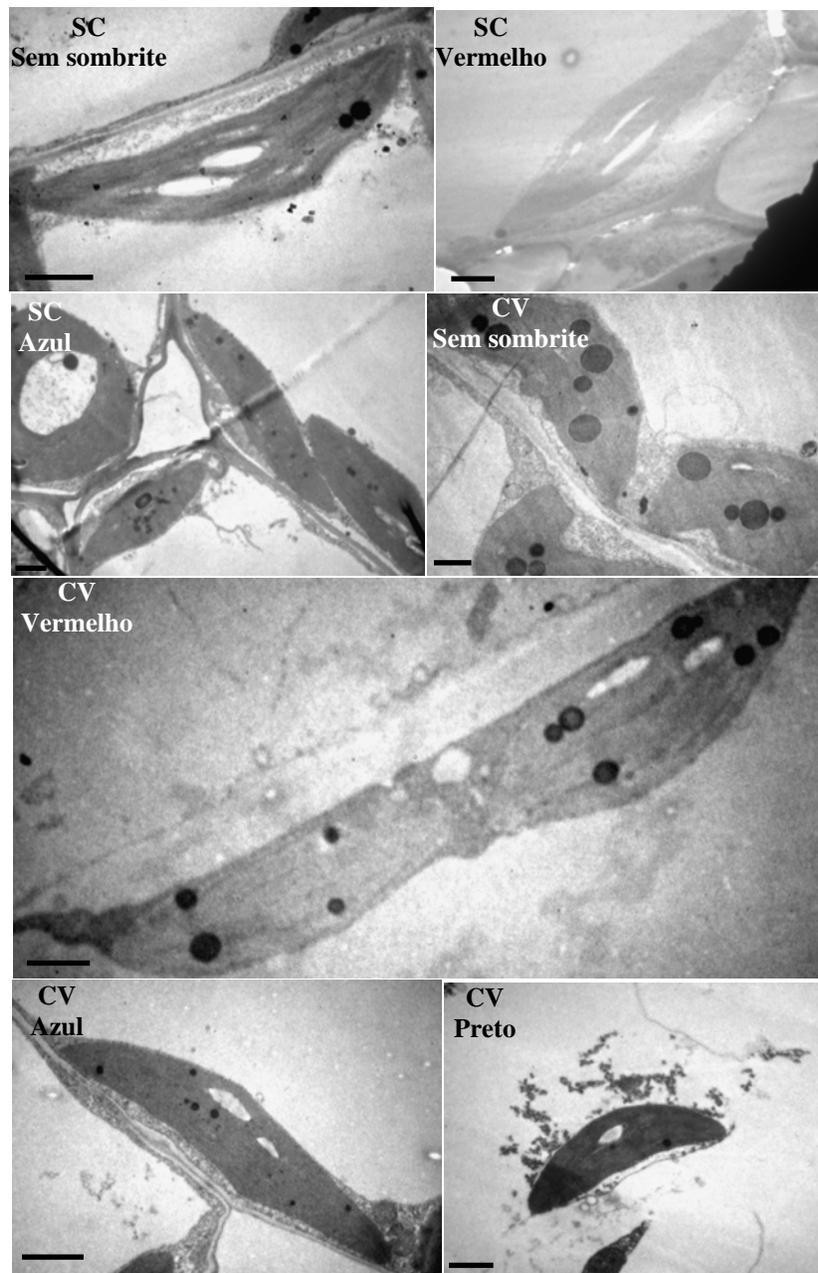


FIGURA 9 Aspectos de cloroplastídeos em plantas cultivadas em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação. Lavras, 2005. Barra= 1,0 μ m.

3.4 Aclimatização

Todas as plântulas previamente cultivadas em sala de crescimento tiveram uma porcentagem de aclimatização inferior àquelas mantidas em casa de vegetação (Figura 10), ressaltando-se as vantagens do cultivo *in vitro* em luz natural.

Observou-se maior número de plantas sobreviventes para àquelas provenientes de plântulas em sombrite vermelho, obtendo-se uma taxa de aclimatização de 56,67% em sala de crescimento e de 73,33% em casa de vegetação nessa cobertura. Esses resultados eram esperados devido ao vigor desenvolvido pelas plântulas cultivadas nestas telas, principalmente em casa de vegetação. A obtenção de plantas mais vigorosas cultivadas sob cobertura vermelha já foi relatada por outros autores (Gringberger et al., 2005; Reshef, 2005; Shamir et al., 2005).

Plântulas cultivadas sem cobertura resultaram em melhor aclimatização que aquelas cultivadas em sombrite azul em casa de vegetação. Os valores foram de 70,00% e 60,00% para plântulas cultivadas sem sombrite e em tela azul, respectivamente.

Em casa de vegetação, o tratamento que resultou em menor taxa de sobrevivência na aclimatização foi o cultivo em sombrite preto, com 56,67% de plantas sobreviventes. Saebo et al. (1995), testando o desempenho em campo de *Betula pendula* após cultivo *in vitro* em diferentes espectros de luz, observaram que as plantas que melhor aclimatizaram foram as cultivadas em luz azul e luz vermelha, em comparação às cultivadas em lâmpadas brancas.

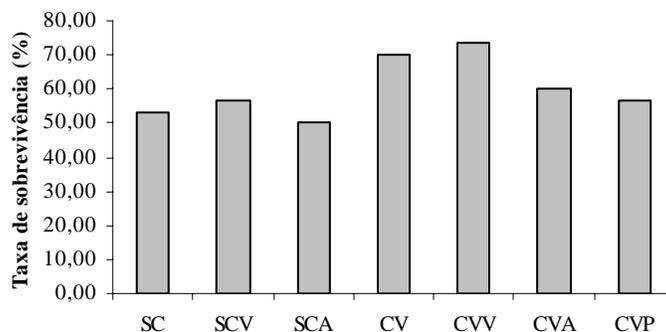


FIGURA 10 Eficiência de aclimatização após cultivo em diferentes ambientes de luz com telas coloridas. SC=sala de crescimento; SCV=sala de crescimento com sombrite vermelho; SCA=sala de crescimento com sombrite azul; CV=casa de vegetação; CVV=casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA casa de vegetação com sombrite azul; CVP casa de vegetação com sombrite preto. Lavras, 2005.

As características estomáticas analisadas variaram muito após o período de aclimatização, quando comparadas ao período de cultivo *in vitro* (Tabela 8). A densidade estomática foi bem menor do que durante o cultivo *in vitro* em todos os tratamentos. Redução na densidade de estômatos durante o período de aclimatização é um processo bem característico desta fase e já foi reportado por diversos autores (Albarello et al., 2001; Donnelly & Vidaver, 1984; Lee et al., 1985; Lee et al., 1988). Isso ocorre porque as células da epiderme, bem como os demais tecidos foliares, apresentam elevada taxa de crescimento e divisão durante o período de aclimatização e esse crescimento ocorre em ambiente com umidade reduzida, o que promove adaptação, melhorando a funcionalidade dos estômatos e reduzindo sua densidade.

Após a aclimatização, todas as plântulas que apresentaram menor densidade estomática foram aquelas oriundas do cultivo *in vitro* em casa de

vegetação com sombrite vermelho, ressaltando a capacidade de adaptação das plântulas oriundas deste tratamento (Tabela 8).

TABELA 8 Densidade estomática, diâmetros polar e equatorial dos estômatos (μm) e relação DP/DE entre estômatos para folhas de plântulas aclimatizadas.

LUZ	Densidade	DP	DE	DP/DE
Sala de crescimento	86,58bc	28,85 a	25,94ab	1,12 a
SC vermelho	99,90 ab	27,25 a	22,97 b	1,20 a
SC azul	75,48bc	27,41 a	25,07 ab	1,10 a
Casa de vegetação	96,20abc	30,13 a	26,98 a	1,12 a
CV vermelho	68,08 c	30,67 a	28,21 a	1,09 a
CV azul	86,58bc	29,68 a	27,00 a	1,10 a
CV preto	120,62a	30,11 a	27,23 a	1,11 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5%.
SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

A relação DP/DE não diferiu estatisticamente entre os tratamentos após o período de aclimatização, evidenciando a capacidade de adaptação e ajuste celular dessas plantas ao ambiente *ex vitro*.

Após 35 dias de aclimatização, não observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos aplicados ainda durante o cultivo *in vitro* para a espessura da epiderme adaxial. Também não foram observadas diferenças significativas para epidermes adaxial e abaxial de ameixeira cultivada *in vitro* se comparadas a plantas crescendo *in vivo* (Brainerd et al., 1981). Para epiderme abaxial, foram observadas maiores espessuras em plântulas do cultivo sob cobertura vermelha em casa de vegetação. Menores espessuras dessa epiderme foram obtidas em plântulas previamente cultivadas em sala de crescimento com sombrite azul ou em casa de vegetação sem sombrite (Tabela 9).

As plântulas previamente cultivadas em casa de vegetação resultaram em maiores espessuras do mesofilo e, conseqüentemente, na espessura total do

limbo foliar. As menores médias foram obtidas no tratamento de frascos mantidos em sala de crescimento sem sombrite (Tabela 9).

TABELA 9: Espessura dos tecidos foliares (μm) de *Cattleya walkeriana* na região do feixe vascular principal de plântulas aclimatizadas.

LUZ	EAd	EAb	MESO	ETL
Sala de crescimento	68,31 a	22,34 ab	540,00 c	630,63 b
SC vermelho	58,94 a	21,34 ab	670,92 abc	751,21 ab
SC azul	61,06 a	18,58 b	548,29 bc	628,13 b
Casa de vegetação	62,48 a	19,93 b	766,99 ab	850,99 ab
CV vermelho	76,93 a	26,81 a	812,44 a	916,18 a
CV azul	59,42 a	21,79 ab	749,51 abc	830,73 ab
CV preto	69,98 a	22,93 ab	808,64 a	901,56 a

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

EAd=epiderme adaxial; EAb=epiderme abaxial; MESO=mesofilo; ETL= espessura total do limbo. SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

Na região do terceiro feixe vascular, os tratamentos *in vitro* resultaram em diferenças nas espessuras das epidermes. A epiderme adaxial foi mais espessa em casa de vegetação com vermelho, tendo as menores espessuras sido obtidas em tratamentos com tela azul, tanto em casa de vegetação como em sala de crescimento. A epiderme abaxial diferiu só para o tratamento em sala de crescimento com sombrite azul, no qual a espessura foi inferior (Tabela 9).

A espessura de mesofilo na região do terceiro feixe vascular foi maior no tratamento de casa de vegetação com sombrite vermelho e menor em sala de crescimento sem sombrite e em casa de vegetação com sombrite preto. A espessura total do limbo foliar, de maneira parecida, foi maior em casa de vegetação com sombrite vermelho. Os menores valores observados para esta variável foram em sala de crescimento sem sombrite ou com tela azul (Tabela 10).

TABELA 10: Espessura dos tecidos foliares (μm) de *Cattleya walkeriana* na região do terceiro feixe vascular de plântulas aclimatizadas.

LUZ	EAd	EAb	MESO	ETL
Sala de crescimento	36,30 ab	24,18 ab	443,34 c	503,82 c
SC vermelho	35,49 ab	23,55 ab	561,00 abc	620,04 abc
SC azul	29,97 b	20,70 b	436,13 c	486,80 c
Casa de vegetação	31,77 b	23,28 ab	687,94 ab	742,91 ab
CV vermelho	45,15 a	26,79 a	737,75 a	809,69 a
CV azul	29,10 b	23,58 ab	599,18 abc	651,86 abc
CV preto	34,41 ab	23,01 ab	486,84 bc	544,86 bc

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.
EAd=epiderme adaxial; EAb=epiderme abaxial; MESO=mesofilo; ETL= espessura total do limbo. SC=sala de crescimento; CV=casa de vegetação.

Diversos autores têm reportado aumento, bem como maior diferenciação dos tecidos do mesofilo durante aclimatização, como um processo natural de desenvolvimento de novas características que sejam compatíveis ao ambiente *ex vitro* (Lee et al., 1988; Brainerd et al., 1981; Wetzstein & Sommer, 1982).

4 CONCLUSÕES

Alterações espectrais pelo uso de telas coloridas promovem alterações morfológicas, anatômicas, ultraestruturais e fisiológicas em *Cattleya walkeriana* cultivada *in vitro*.

A qualidade de luz não pode ser analisada independentemente da intensidade da radiação.

O uso de telas coloridas em salas de crescimento não é recomendado pela baixa intensidade de radiação nesse ambiente.

Telas vermelhas e azuis são vantajosas no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana* em luz natural.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil possui consideráveis possibilidades climáticas para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo *in vitro*, considerando-se uso de ambiente natural, o que pode ser forma de viabilizar inserção no cenário mundial de comercialização de plantas ornamentais.

Os resultados deste estudo indicam novas possibilidades para micropropagação de *Cattleya walkeriana* e podem ser considerados como ponto de partida para novas pesquisas de protocolos envolvendo ambiente de cultivo com o objetivo de melhorar a qualidade das mudas produzidas.

Almeja-se uma melhoria na autotrofia das plântulas, sendo o presente trabalho uma iniciativa neste sentido. Contudo, a determinação de condições ótimas de cultivo autotrófico depende de informações adicionais, devido ao complexo processo que envolve o desenvolvimento da capacidade fotossintética, que relaciona-se com diversas características morfológicas e fisiológicas, as quais são respostas à interações entre diversos fatores ambientais. Torna-se, portanto, evidente a necessidade da condução de estudos posteriores envolvendo outras características relacionadas ao processo de cultivo autotrófico.

Recomendam-se estudos, tais como testes de germinação já em luz natural, e sob alteração espectral, visando o desenvolvimento inicial de tecidos em regime de autotrofia ou mixotrofia, mesmo porque sabe-se que, além do fato de monocotiledôneas serem menos responsivas que dicotiledôneas a fatores como alteração espectral, as folhas desenvolvem suas características mais marcantes durante a expansão foliar.

Outros testes necessários envolvem estudos que viabilizem outras formas de fornecimento de carbono nos frascos, em casa de vegetação, como forma de possibilitar a omissão total de sacarose no meio de cultura.

Outras alterações podem ser ocasionadas por diferentes fotoperíodos durante o desenvolvimento e pela influência de época do ano nas plântulas durante o cultivo em casa de vegetação. Por isso, estudos envolvendo a sazonalidade devem ser conduzidos para aperfeiçoar o uso da micropropagação em luz natural.

Apesar de todas as variações de características de plântulas em resposta a diferentes intensidades de luz e concentração de sacarose realizados no primeiro experimento, não foi testada a capacidade de aclimatização dessas plântulas ao ambiente *ex vitro*, sendo uma variável que necessita ser investigada posteriormente.

Para entender melhor os tipos de respostas decorrentes da qualidade espectral, torna-se necessário investigar-se posteriormente os comprimentos de onda específicos recebidos no ambiente de cada telado colorido.

Estudos mais apurados de aclimatização devem ser conduzidos levando-se em conta o ambiente de aclimatização. Neste caso, podem-se testar efeitos da aclimatização sob telados coloridos, observando suas respostas de crescimento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 35-46, 2001.

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

ANTONOPOLOU, C.; DIMASSI, F.; THERIOS, I.; CHATZISSAVVIDIS, C. The influence of radiation quality on the *in vitro* rooting and nutrient concentrations of peach rootstock. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 48, n. 4, p. 549-553, 2004.

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

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

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

BARREIRO, R.; GUIAMET, J. J.; BELTRANO, J.; MONTALDI, E. R. Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red:far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 1, p. 97-101, May 1992.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J.; 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, Apr. 1981.

CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, D. M.; GAVILANES, T. O. T. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea*

guidonea (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, dez. 1998.

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

CUI, M.; VOGELMANN, T. C.; SMITH, W. K. Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinaceae oleraceae*. **Plant Cell and Environment**, v. 14, n. 5, p. 493-500, June 1991.

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

DIGNART, S. L. **Propagação *in vitro* de *Cattlya nobilior* Rehb (Orchidaceae).** Cuiabá – MT, 2003. 55 p. (Monografia de conclusão de curso).

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf Anatomy of Red Raspberry Transferred from Culture to Soil. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 172-176, Mar. 1984.

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

GRINBERGER, A.; SHOMRON, M.; GANELEVIN, R. **Shading nets testing 2000.** Disponível em: <http://www.polysack.com/index.php?goto=bep&page_from=746>. Acesso em: 29 set. 2005.

HUNTER, D. C.; BURRIT, D. J. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa*). **In Vitro Cell, Development Biology of Plants**, New York, v. 40, n. 2, p. 215-220, Mar./Apr. 2004.

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

LABORIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABORIAU, M. I.

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

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* (Dipeterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, Apr. 2000.

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

LEE, N.; WESZTEIN, Y.; SOMMER, H. E. Quantum Flux Density Effects on the anatomy and Surface Morphology of *in vitro*-and *in vivo* developed Sweetgum Leaves, **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, Jan. 1988.

MALOOF, J. N.; BOREVITZ, J. O.; WEIGEL, D. CHORY, J. Natural variation in phytochrome signaling. **Seminars in Cell & Development Biology**, London, v. 11, n. 6, p. 523-530, Dec. 2000. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 21 set. 2005.

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

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

MORINI, S.; D'ONOFRIO, C. D.; BELLOCCHI, G.; FISICHELLA, M. Effects of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 47-55, 2000.

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

NIEMI, K.; JULKUNEN-TIITTO, R.; TEGELBERG, R.; HAGGMAN, H. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scot pine *in vitro*. **Tree Physiology**. Victoria, v. 25, n. 1, p. 123-128, Jan. 2005.

PUSHNICK, J. C.; MILLER, G. W.; BROWN, J. C.; DAVIS, T. D.; BARNES, A. M. Influences of ultra-violet (UV)-blue light radiation on the growth of cotton. II. Photosynthesis, leaf anatomy, and iron reduction. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, n. 17, p. 2283-2297, 1987.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v. 7, n. 3, 171-175, jul./set. 2001.

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

RESHEF, G. **Basil culture under diferent shading nets, summer 2001**. 2005. Disponível em: http://www.polysack.com/index.php?goto=bep&page_from=746. Acesso em: 29 set. 2005.

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

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

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

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

SHAHAK, Y. **Colored shade nets a new ago-technology** Current Research in Ornamental. 2005. Disponível em: <http://www.polysack.com/index.php?goto=bep&page_from=746>. Acesso em: 29 set. 2005.

SHAMIR, M. O. **See what you can get with colors** Improvement in the quality and yield of decorative plants by means of clored shading nettings. 2005. Disponível em: <http://www.polysack.com/index.php?goto=bep&page_from=746>. Acesso em: 29 set. 2005.

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

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

7 ANEXOS

TABELA 1A Resumo da análise de variância de parâmetros fitotécnicos em relação à concentração de sacarose no meio de cultura e ambientes de luz. Dados transformados em \sqrt{x} . UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios				
		NF	NB	CPA	NR	CR
Sacarose	2	3,88736*	1,29105*	0,0397749	2,96413*	0,01592
Luz	2	0,63616*	0,30095*	0,359942*	0,008391	0,03612
Sacarose*luz	4	0,695305	0,11470	0,031482	0,063974	0,02239
Erro	63	12,43215	0,05671	0,013537	0,054577	0,01321
Total	71	17,65097	1,76341	0,4447359	3,091072	0,08575
CV%		13,02	15,19	9,02	11,43	10,32

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. NF=número de folhas, NB=número de brotos, CPA=comprimento de parte aérea, NR=número de raízes, CR=comprimento médio de raízes.

TABELA 2A Resumo da análise de variância para teores de clorofila em relação à concentração de sacarose no meio de cultura e ambientes de luz. Dados transformados em $\log x+1$. UFLA, Lavras – MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		Cl a	Cl b	Cl total	a:b
Sacarose	2	0,170562*	0,308553*	0,218358*	0,02457*
Luz	2	0,182173*	0,238740*	0,198635*	0,005803
Sacarose*luz	4	0,017184*	0,071817*	0,027885*	0,04521*
Erro	18	0,0037519	0,0138037	0,005951	0,00682*
Total	26	0,3781709	0,6329137	0,450829	0,082403
CV%		3,22	7,21	3,69	2,51

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. Cl=clorofila

TABELA 3A Resumo da análise de variância para densidade estomática e diâmetros polar e equatorial, em relação à concentração de sacarose no meio de cultura e ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados Médios		
		Densidade	DP	DE
Sacarose	2	245,5192	3,434948*	16,34977*
Luz	2	1242,005*	6,853122	51,69764*
Sacarose*luz	4	737,3371*	8,958054*	10,84553*
Erro	36	169,0989	2,968651	3,308309
Total	44	2393,00	9622,2147	82,2012
CV%		13,98	6,14	6,31

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. DP=diâmetro polar; DE=diâmetro equatorial.

TABELA 4A Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos foliares na região do feixe vascular principal das folhas, em relação à concentração de sacarose no meio de cultura e ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		E Ad	E Ab	MESO	ETL
Sacarose	2	211,7777*	18,14150	19518,92	24184,80
Luz	2	376,1183*	12,85851	73305,21*	63749,73*
Sacarose*luz	4	90,47597	6,612,503	51170,21*	48435,55*
Erro	36	48,16949	10,89575	16494,68	17005,06
Total	44	726,5414	654,3987	109318,81	153375,14
CV%		11,16	14,42	17,91	16,26

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL=espessura total do limbo foliar.

TABELA 5A Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos foliares na região do terceiro feixe vascular das folhas, em relação à concentração de sacarose no meio de cultura e ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		E Ad	E Ab	Meso	ETL
Sacarose	2	60,75058	2,163502	13952,17	14695,76
Luz	2	44,29856	29,36599	32946,85*	29850,42*
Sacarose*luz	4	74,15223*	26,19953	92252,41*	96159,32*
Erro	36	28,49350	11,83500	7895,442	8467,445
Total	44	207,6948	69,56402	147046,87	149172,94
CV%		14,13	13,30	13,81	13,05

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL=espessura total do limbo foliar.

TABELA 6A Resumo da análise de variância de parâmetros fitotécnicos, em relação a diferentes qualidades de luz. Dados transformados em \sqrt{x} . UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios				
		NB	NF	CPA	NR	CR
Tratamento	6	0,56658*	0,75988*	0,347202*	0,10748*	0,16886
Erro	70	0,099411	0,110071	0,0363848	0,044090	0,16284
Total	76	0,665991	0,869951	0,3835680	0,151570	0,33170
CV%		37,56	11,24	13,84	11,72	11,68

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. NF=número de folhas, NB=número de brotos, CPA=comprimento de parte aérea, NR=número de raízes, CR=comprimento médio de raízes.

TABELA 7A Resumo da análise de variância para teores de clorofila em relação a diferentes ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		Cl a	Cl b	Cl Total	a:b
Tratamento	6	402,651030*	226,637224*	920,651611*	0,5454*
Erro	14	130,782927	25,433809	143,700012	0,0787
Total	20	533,43395	252,071033	1064,3516	0,6241
CV%		17,71	17,51	12,84	12,76

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. Cl=clorofila

TABELA 8A Resumo da análise de variância para densidade estomática, diâmetros polar e equatorial, e relação DP/DE dos estômatos em relação a diferentes ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		Densidade ♦	DP	DE	DPDE
Tratamento	6	0,0286921*	34,02291*	173,5989*	0,779401*
Erro	133	0,02964908	9,072651	6,330637	0,1067721
Total	139	0,05834118	43,095561	179,9295	0,8861731
CV%		2,58	9,13	10,34	10,72

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. ♦ Dados transformados em $\log.x + 1$. DP=diâmetro polar, DE= diâmetro equatorial.

TABELA 9A Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos foliares na região do feixe vascular principal das folhas em relação a ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		E Ad	E Ab	Meso	ETL
Tratamento	6	182,5732	28,94828*	36703,27*	43160,03*
Erro	28	80,09711	8,523642	6966,474	7078,919
Total	34	262,67031	37,471922	43669,74	50238,949
CV%		14,78	15,33	13,76	12,11

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL=espessura total do limbo foliar.

TABELA 10A Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos foliares na região do terceiro feixe vascular das folhas em relação a ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		E Ad	E Ab	Meso	ETL
Tratamento	6	25,25614	6,473142	49869,80*	51048,42*
Erro	28	36,13500	7,907464	5165,124	5619,746
Total	34	61,39114	14,380606	55034,92	56668,16
CV%		17,87	12,61	13,17	12,46

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL=espessura total do limbo foliar.

TABELA 11A Resumo da análise de variância para características dos cloroplastídeos no mesofilo das folhas, em relação a ambientes de luz. Dados transformados em $\log.x + 1$. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		Nº/célula	altura	largura	área
Tratamento	6	0,0990159*	0,019789*	0,0310806*	0,124254*
Erro	98	0,00827414	0,5325057	0,0741967*	0,0229981
Total	103	0,10729004	0,5522947	0,1052773	0,1472521
CV%		11,41	9,22	21,05	18,02

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 12A Resumo da análise de variância para densidade estomática, diâmetros polar e equatorial, e relação DP/DE dos estômatos em plântulas aclimatizadas, em relação a diferentes ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		Densidade	DP	DE	DP/DE
Tratamento	6	1489,211*	9,338386*	15,10553*	0,7274368
Erro	28	243,4865	3,626560	2,759244	0,6769330
Total	33	1732,6975	12,964946	17,864774	1,4043698
CV%		17,244	6,532	6,340	7,347

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. DP=diâmetro polar, DE=diâmetro equatorial.

TABELA 13A Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos foliares na região do feixe vascular principal das folhas em plântulas aclimatizadas, em relação a ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		E Ad	E Ab	Meso	ETL
Tratamento	6	222,57485	33,852156*	67369,844*	72328,0299
Erro	28	99,286777	10,36706	12724,773	13754,5484
Total	34	321,86162	44,219216	80094,61	
CV%		15,26	14,66	16,13	14,90

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL=espessura total do limbo foliar.

TABELA 14A Resumo da análise de variância para espessura dos tecidos foliares na região do terceiro feixe vascular das folhas em plântulas aclimatizadas, em relação a ambientes de luz. Dados não transformados. UFLA, Lavras – MG, 2005.

FV	GL	Quadrados médios			
		E Ad	E Ab	Meso	ETL
Tratamento	6	145,59707*	16,145143*	69714,318*	74187,849*
Erro	28	38,59232	7,101000	10708,259	11248,691
Total	34	184,18939	23,246143	80422,577	85436,54
CV%		17,96	11,30	18,33	17,03

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. EAd=epiderme adaxial, EAb=epiderme abaxial, MESO=mesofilo, ETL=espessura total do limbo foliar.