

CULTIVO *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) EM
AMBIENTES QUE FAVORECEM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS
E MIXOTRÓFICAS: UM ESTUDO RELACIONADO À
FOTOSSÍNTESE, À EFICIÊNCIA FOTOQUÍMICA E ÀS RELAÇÕES
HÍDRICAS

LUIZ EDUARDO DE CAMPOS CRESPO

Tese apresentada ao Centro de Ciências
e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 31 de julho de 2007

Comissão Examinadora:

Prof. Carlos Frederico Menezes Veiga (D.Sc. Produção Vegetal) – UFRRJ

Profa. Mara de Menezes de Assis Gomes (D.Sc. Biologia Vegetal) – FAETEC

Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF

Prof. Eliemar Campostrini (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF
Orientador

A minha esposa Márcia e meus filhos Rafael, Carolina e Maria Gabriela, pelo
companheirismo e apoio nesta caminhada;

A minha mãe Línea e meu pai Luiz Maurício, pela confiança a mim sempre
prestada;

Aos meus amigos Paulo, Eliemar, Gonçalo e Eduardo Augusto.

DEDICO

AGRADECIMENTO

A DEUS, que está sempre presente em todas as minhas caminhadas e que me carregou no colo nos momentos mais difíceis;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado;

Ao Prof. Eliemar Campostrini, pela orientação, incentivo, confiança e por ter acreditado na realização desta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos;

Aos professores do Laboratório de Fitotecnia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF, pela cooperação e incentivo para realização do curso de Doutorado;

Aos colegas do campus Leonel Miranda da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela ajuda e apoio; e

Aos colegas e companheiras (os) de trabalho na UENF Alena, Sávio, Paulo, Geórgia, Isadelma, Acácio, Gloria, Jader, pela ajuda valiosa e carinho.

SUMARIO

LISTA DE QUADROS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE SIMBOLOS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIV
1- INTRODUÇÃO.....	01
2- REVISAO DE LITERATURA.....	04
3- MATERIAIS E METODOS.....	13
4- RESULTADOS E DISCUSSAO.....	20
5- CONCLUSÕES.....	38
6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	39

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Modelo da análise de variância para as avaliações de dois fatores, Ventilação e Sacarose, em parcelas subdivididas.
- Quadro 2 - Estimativa dos quadrados médios do fator ventilação (F_v), do fator sacarose (F_s), da respectiva interação ($F_v \times F_s$) e dos resíduos em parcela subdividida. Características avaliadas em cultivo de plântulas de cana de açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.
- Quadro 3 - Estimativa dos quadrados médios do fator leitura (F_L) do fator ventilação (F_v), do fator sacarose (F_s), das respectivas interações e dos resíduos em parcelas sub-sub-dividida. Características avaliadas em plântulas de cana de açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.
- Quadro 4 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V_0 e V_1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da massa seca da parte aérea (MSPA), da massa seca das raízes (MSR) e da relação das massas secas da parte aérea com das raízes. (MSPA/MSR). Características avaliadas em plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Quadro 5 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V_0 e V_1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) do comprimento da nervura central da folha (CNF) e do índice SPAD. Características avaliadas em plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Quadro 6 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V_0 e V_1) e sacarose (0%; 1,5%; 3% e 4,5%) e das oito respectivas combinações (tratamentos) do pH no meio de cultura. Características avaliadas em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Quadro 7 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V_0 e V_1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da liberação de CO_2 (A), da condutância estomática (g_s), da transpiração (E) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV). Características avaliadas em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Quadro 8 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V_0 e V_1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da taxa de perda de água (TPA) da folha (media de seis observações sucessivas a cada trinta minutos), da fluorescência inicial (F_0), do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) e da área proporcional à quantidade de aceptores localizados na parte redutora do PSII (ÁREA). Características avaliadas em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Quadro 9 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V0 e V1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da liberação de O₂ (A_{Pot.}; Fotossíntese Potencial). Característica avaliada em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em frascos tipo “baby food”. Os frascos “baby food” estavam dentro dos frascos maiores sem ventilação (V0) e com ventilação forçada (V1).

Figura 2 – Plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* spp.) da variedade SP-791011 em frasco de vidro, tipo “baby food”, aos 30 dias do cultivo em três níveis (1,5%; 3% e 4,5%) de sacarose adicionada ao meio e em dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1). À esquerda dois frascos plântulas de cana-de-açúcar que não se estabeleceram em meio sem sacarose (0%).

Figura 3 - Taxa de perda de água (TPA) aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar em três níveis (1,5%; 3% e 4,5%) de sacarose adicionada ao meio e aos dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1) (n= 288). Valores médios das combinações (tratamentos) (a); valores médios e regressão dos níveis de sacarose (b) e valores médios e regressão dos níveis de ventilação (c) (p < 0,05).

Figura 4 - Liberação de oxigênio aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar com três níveis de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) adicionada ao meio nos dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1) (n= 180).

Figura 5 - Liberação de oxigênio aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar em três níveis de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) adicionada ao meio (n= 180).

Figura 6 - Liberação de oxigênio aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar em dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1) (n= 180).

LISTA DE SÍMBOLOS

A: Taxa Fotossintética Líquida Instantânea

AIA: Ácido indol acético

AIB: Ácido indol butírico

A_{pot} : Taxa fotossintética potencial

AREA: Área proporcional à quantidade de aceptores da parte redutora do PSII.

ATP: Adenosina trifosfato

ATPase: Adenosina trifosfatase

BAP: 6-benzilamina purina

C: Carbono

CLO: Complexo de liberação de oxigênio (CLO)

CNF: Comprimento da nervura central da folha

CO₂: Dióxido de carbono

DIF: Diferença da temperatura média diurna com a média noturna

DPV_{folha-ar}: Déficit de Pressão de Vapor entre a folha e o ar

E: Transpiração

FFF: Fluxo de fótons fotossintéticos

F_m: Fluorescência máxima

F_o: Fluorescência inicial

F_v/F_m: Rendimento quântico máximo do fotossistema II

g_s : Condutância estomática
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MFE: Massa Foliar Específica
MSPA: Massa seca da parte aérea
MSR: Massa seca de raízes
N: Nitrogênio
 O_2 : Oxigênio
PEA: Plant Efficiency Analyser
PSI: Fotossistema I
PSII: Fotossistema II
 Q_a : Quinona A
Rubisco: Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase-Oxigenase
SPAD: Soil Plant Analysis Development
TPA: Taxa de perda de água da folha
UR: Umidade Relativa

RESUMO

CRESPO, LUIZ EDUARDO DE CAMPOS, Ds; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Julho 2007; Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas: um estudo relacionado à fotossíntese, à eficiência fotoquímica e às relações hídricas; Eliemar Campostrini, Ricardo Enrique Bressan Smith, Mara Menezes de Assis Gomes, Carlos Frederico de Menezes Veiga.

O Brasil busca, como maior produtor e exportador de açúcar e etanol oriundos da cana-de-açúcar, ganhos da produtividade agrícola com uso de plântulas de excelente qualidade, pela micropropagação. Nessa cultura *in vitro*, a adição de sacarose no meio, em concentrações variadas, eleva a produção de biomassa e favorece o enraizamento. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos ecofisiológicos do cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar relacionados à fotossíntese, fluorescência, crescimento e às relações hídricas. Os tratamentos consistiram na combinação de sacarose adicionada ao meio (1,5%; 3% e 4,5%), com dois tipos de ventilação no frasco. O frasco sem trocas gasosas com ambiente externo (V0), e o ventilado (V1) com a injeção de ar comprimido caracterizado com 30 mL min⁻¹;

75% UR; 27°C; 370 μL de $\text{CO}_2 \text{ L}^{-1}$ e esterilizado (Filtro Millipore; 0,2 μm). A unidade experimental contemplava um frasco de vidro transparente de 2,2 L e cada frasco continha frascos menores com 30 mL de meio cada. Os explantes foram colmos inteiros, de plântulas, com dois a três centímetros, contemplando folhas cortadas transversalmente acima do ápice caulicar para a padronização do tamanho. Nas prateleiras, o experimento foi instalado a 25°C \pm 1,0; 135 μmol de FFF $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; fotoperíodo de 16h; meio MS acrescido de mio-inositol (100 mg L^{-1}), agar (13g L^{-1}) e sem reguladores de crescimento. Aos trinta dias da inoculação, avaliou-se o pH do meio, o comprimento da nervura central da folha, a fluorescência da clorofila *a*, as trocas gasosas, a intensidade de cor verde da folha (índice SPAD), a massa seca, o déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar, a transpiração, a condutância estomática, a taxa de perda de água e a fotossíntese potencial. Como resultado, as plântulas não apresentaram competência fotossintética em 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (FFF), quando avaliadas pela assimilação de CO_2 . Este caso foi associado a comprometimentos na fase bioquímica da fotossíntese, causados pela presença da sacarose no meio, uma vez que as plântulas apresentaram significativa estrutura e atividade do PSII. O complexo de liberação de oxigênio (CLO), representado pela fotossíntese potencial, apresentou atividade a 1,5% de sacarose, nas intensidades de 300 a 750 μmol de FFF $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Houve fotossíntese potencial nas folhas das plântulas cultivadas nos frascos ventilados, em FFF acima de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Na substituição da fonte exógena de carbono (sacarose) pelo carbono via CO_2 (370 $\mu\text{L L}^{-1}$), em condição de FFF de 135 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, não houve estímulo relacionado ao metabolismo autotrófico. Nessa espécie, a ventilação dos frascos de cultivo reduziu a taxa de perda de água, proporcionou uma menor condutância estomática, maior intensidade de cor verde nas folhas e maior ganho de biomassa. Estas respostas podem estar associadas à eliminação do etileno e de outros gases tóxicos, ou por ter evitado a depleção do oxigênio dentro dos frascos.

Palavras-chaves: Cana-de-açúcar; micropropagação; ventilação forçada; condição mixotrófica; fotossíntese.

ABSTRACT

CRESPO, LUIZ EDUARDO DE CAMPOS, Ds; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; July 2007; Sugar cane *in vitro* cultivation (*Saccharum* spp.) in environments that favor heterotrophical and mixotrophical conditions: a study related to the photosynthesis, to the photochemical efficiency and to the hydric relations; Eliemar Campostrini, Ricardo Enrique Bressan Smith, Mara Menezes de Assis Gomes, Carlos Frederico de Menezes Veiga.

Brazil searches for, as the biggest producer and exporter of sugar and ethanol derived from the sugar cane, agricultural productivity gain by using seedlings with excellent quality, by micropropagation. In this *in vitro* crop, the sucrose addition in the environment, in varied concentrations, increases the biomass production and favors the rooting. The aim of this paper was to study the ecophysiological aspects of the sugar cane *in vitro* cultivation related to the photosynthesis, fluorescence, growing and to the hydric relations. The treatments consisted of the sucrose combination added to the environment (1,5%; 3% and 4,5%), with two types of ventilation in the flask. The flask without gaseous exchanges with the external environment (V0), and the ventilated (V1) with compressed air injection characterized by 30 mL min⁻¹; 75% UR; 270C; 370 µL of CO₂ L⁻¹ and sterilized (Millipore Filter; 0,2µm). The experimental unit contemplated a 2,2 L transparent glass flask and each flask had smaller flasks each one with 30 mL of environment. The explants were entire stems, of seedlings, ranging from 2 to 3 centimeters, contemplating leaves transversely cut above the stem apex for the size

standardization. On the shelves, the experiment was installed at $25^{\circ}\text{C} \pm 1,0$; $135 \mu\text{mol}$ of FFF $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; photoperiod of 16h; MS environment plus Myo-Inositol (100mg L^{-1}), agar (13g L^{-1}) and without growing regulators. After thirty days of inoculation, the PH of the environment was evaluated, as well as, the central ribbing length of the leaf, the chlorophyll fluorescence, the gaseous exchanges, the green color intensity of the leaf (SPAD index), the dry mass, the steam pressure deficit between the leaf and the air, the transpiration, the stomatal conductance, the rate of water loss and the potential photosynthesis.

As a result, the seedlings have not presented photosynthetic competence in $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (FFF), when evaluated by the CO_2 assimilation. This case was associated with compromises in the biochemical phase of the photosynthesis, caused by the sucrose presence in the environment, once that the seedlings presented significant structure and activity of the PSII. The complex of liberating the oxygen (CLO), represented by the potential photosynthesis, presented activity at 1,5% of sucrose, under intensities ranging from 300 to $750 \mu\text{mol}$ of FFF $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. There was potential photosynthesis on the leaves of the seedlings cultivated in ventilated flasks, in FFF over $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. When replacing the carbon exogenous source (sucrose) by the carbon via CO_2 ($370 \mu\text{L L}^{-1}$), under the FFF condition of $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, there was no stimulus related to the autotrophic metabolism. In this species, the ventilation of the cultivation flasks reduced the water loss rate, provided lesser stomatal conductance, higher green color intensity on the leaves and higher biomass gain. These answers can be associated to the ethylene elimination and other toxic gases, or for had avoided the oxygen depletion inside the flasks.

Key-words: Sugar cane; micropropagation; forced ventilation; mixotrophical condition; photosynthesis.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no século XVII, com o objetivo de quebrar o monopólio mundial exercido pela França no comércio com o açúcar produzido nas Ilhas do Caribe. Desde aquele período, o cultivo e a produção desta espécie vêm representando um importante segmento no setor sócio-econômico do país. O cultivo da cana-de-açúcar teve um grande aumento quando, em meados da década de 70, o Brasil criou o Programa Nacional do Álcool. Neste programa, o objetivo foi estimular a produção do etanol visando ao atendimento das necessidades dos mercados interno e externo e da política de combustíveis automotivos. Hoje, o Brasil é o principal país do mundo a implantar, em larga escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo. O etanol é reconhecido mundialmente pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas e os países do primeiro mundo estão interessados nesta tecnologia brasileira.

Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas do panorama brasileiro, ocupando uma área de mais de 4 milhões de hectares. Esse número continua crescendo em função do uso desta cultura como fonte de energia (açúcar e álcool). Segundo a UNICA (2007), nas safras de 2004/05, 2005/06 e 2006/07, o Brasil produziu 386,1; 386,6 e 426,0 milhões de toneladas de cana, respectivamente. Desta produção de cana, nestas safras, foram produzidas 22,1; 22,0 e 25,6 milhões de toneladas de açúcar; e foram produzidos 15,41; 15,94 e

17,76 milhões de m³ de etanol, respectivamente. Estas produções correspondem a cerca de 30% do total mundial, o que consolida o país como o maior produtor de cana-de-açúcar e maior exportador de açúcar do mundo.

No Estado do Rio de Janeiro, dentre os diversos produtos agrícolas cultivados, a cana-de-açúcar é a cultura de maior importância econômica, apresentando a maior área colhida e o maior valor de produção. Em 2005, o Estado do Rio de Janeiro registrou a maior safra desta cultura dos últimos dez anos: 6,5 milhões de toneladas, 15% a mais que na safra anterior (Veiga, 2006). O recorde na produção foi resultado de condições climáticas adequadas, inovações tecnológicas e pesquisa científica aplicada.

No Brasil, a região Norte do Estado do Rio de Janeiro foi uma das primeiras a iniciar a atividade canavieira, a qual ainda representa um importante segmento na economia regional. De acordo com o levantamento da Produção Agrícola Mundial 2003/2004 do IBGE, citado por Veiga (2006), Campos dos Goytacazes é o município que apresenta a maior área colhida de cana-de-açúcar, com cerca de 60% do total da área colhida do Estado. Em relação à quantidade total de cana-de-açúcar produzida por município, Campos dos Goytacazes ocupa o segundo lugar, seguido apenas do município de Morro Agudo, situado na região nordeste do Estado de São Paulo (Veiga, 2006). Diante da importância da cultura da cana-de-açúcar no estado do Rio de Janeiro, torna-se necessária, cada vez mais, a busca na elevação da produtividade desta espécie. Uma das alternativas para esta elevação é a formação de lavouras de alta qualidade. Tal ação somente se consegue por meio do uso de mudas de excelente qualidade. Desta maneira, a micropropagação é uma técnica que pode contribuir significativamente para a produção de mudas de qualidade desta espécie. Entre as diversas vantagens que esta técnica apresenta, destaca-se a produção rápida de mudas em larga escala e a eliminação de microrganismos potencialmente fitopatogênicos (Teixeira, 2001).

A micropropagação tradicional tem como premissa a presença de sacarose no meio de cultivo, uma vez que este composto eleva a produção de biomassa e pode contribuir para aumentar o enraizamento de muitas espécies *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1990). Entretanto, quando a concentração deste composto apresenta-se em excesso, ele pode aumentar o grau de contaminação

do meio de cultivo, promover alteração no estado hídrico, inibir a síntese de clorofila, diminuir as atividades de algumas enzimas do ciclo de Calvin e, desta maneira, comprometer significativamente a capacidade fotoautotrófica (Kozai, 1999). Com base nestas informações, torna-se necessário utilizar no meio de cultivo uma concentração adequada de sacarose. Ao se utilizar em quantidades adequadas deste composto, pode-se otimizar o crescimento do explante sem uma elevação nos custos e na contaminação do meio de cultivo. A concentração de sacarose em níveis adequados pode evitar o comprometimento no metabolismo fotossintético e nas relações hídricas do material micropropagado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum*)

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea perene do reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae, gênero Saccharum.

A cana-de-açúcar é produzida por meio da propagação assexuada. Na brotação da gema estão envolvidas substâncias reguladoras de crescimento. O rápido desenvolvimento das gemas depende do estado nutricional do tolete, que influenciará também o desenvolvimento da cultura (Clements, 1980).

As raízes da cana-de-açúcar são fasciculadas e podem atingir até 4m de profundidade. Em *S. officinarum*, cerca de 80% das raízes concentram-se nos 20cm superficiais do solo (Sampaio et al., 1995). Esta planta apresenta rizomas com nós, entre-nós e gema. As folhas são simples, alternadas e compostas de lâmina e bainha, ambas ligadas por uma porção internamente membranosa, denominada lígula. Normalmente, a bainha apresenta na borda a aurícula e existem pêlos. Dependendo das condições climáticas, a duração da folha pode variar de 30 a 150 dias, e o espaço de tempo entre o aparecimento de uma folha e outra, em nós sucessivos, varia de cinco a sete dias (Haag et al., 1963).

Esta espécie apresenta uma inflorescência denominada panícula, o caule é um colmo e as folhas possuem lâminas com sílica nas bordas. A bainha das

folhas é do tipo aberta. Em curto período, é uma cultura que produz um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras, sendo considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética. Em larga escala, o plantio da cana-de-açúcar é tradicional e é, em vários países das regiões tropical e subtropical, utilizado para a produção de açúcar, etanol e outros subprodutos. Os colmos, caracterizados por nós bem marcados e entrenós distintos, quase sempre são fistulosos, espessos e repletos de suco açucarado. As flores, muito pequenas, formam espigas florais, agrupadas em panículas e rodeadas por longas fibras sedosas, congregando-se em enormes pendões terminais de coloração cinzento-prateada.

Existem diversas variedades cultivadas de cana-de-açúcar que se distinguem pela cor e pela altura do caule. Esta parte da planta pode atingir entre três e seis metros de altura e ter de dois a cinco centímetros de diâmetro. A multiplicação desta espécie é feita por meio de estacas e algumas variedades não produzem sementes férteis. A cana-de-açúcar é cultivada, principalmente, em clima tropical, em que se alternam as estações secas e úmidas. Em geral, a floração da cana-de-açúcar começa em abril e a colheita se dá na estação seca, durante um período de três a seis meses. No Sudeste do Brasil, esta espécie é plantada de outubro a março e colhida de maio a outubro. No Nordeste, ela é plantada de julho a novembro e colhida de setembro a maio.

2.2 - MICROPROPAGAÇÃO

Em escala comercial e em curtos períodos de tempo, a micropropagação pode produzir plantas com alta qualidade fitossanitária e com excelente homogeneidade genética (Teixeira, 2001).

Na micropropagação, o material de multiplicação utilizado é proveniente do meristema. Conforme pesquisa de Hendre et al. (1983), o método de propagação de cana-de-açúcar, por meio do uso de meristemas, mostrou-se viável, pois os clones obtidos são fenotípicos e genotipicamente idênticos à planta-mãe. Lee (1988) aperfeiçoou o método para aplicação industrial.

Falando-se do sistema tradicional de cultivo *in vitro*, Miocque (1999) relata os procedimentos adotados para a multiplicação por cultura de meristema de cana-de-açúcar conforme a seguinte descrição:

2.2.1 - PREPARO DA EXTRAÇÃO DE EXPLANTE – ESTÁGIO I

O explante é constituído de ápices caulinares oriundos das gemas de minitoletes de variedades (clones) de cana-de-açúcar sadia em plena vegetação (6-8 meses de idade). Os minitoletes são desinfestados com hipoclorito de sódio (2,5% Cloro ativo; Imersão 10 min.) e lavados em água pura. Em seguida, os pequenos toletes são colocados para brotar em substrato esterilizado (Vermiculita ou Composto Orgânico) em casa-de-vegetação (Incubado a 37°C; 15 dias). Na seqüência, selecionam-se os ponteiros dos brotos mais vigorosos (cerca de 20 cm) e, no laboratório, após lavagem com água destilada, é extraído um pedaço, contendo o meristema apical, com cerca de cinco centímetros. Faz-se uma desinfestação superficial (Hipoclorito de cálcio (65% Cloro ativo; Imersão 15 min) e uma lavagem, por imersão, com água destilada autoclavada, em ambiente asséptico numa capela de fluxo laminar. Os ápices caulinares (2-3 mm) são extraídos e inoculados em tubos de ensaio (2,5 x 8,5 cm) contendo ponte de papel e 8,0 mL de meio denominado MS1. Neste primeiro estágio, o meio de cultura contém cinetina (0,1mg L⁻¹) como o único regulador de crescimento.

A composição destes meios de cultura foi pesquisada por Murashige e Skoog (1962), e é conhecida pelas abreviações MS seguido do número de referência do estágio de desenvolvimento, MS1; MS2 e MS3, correspondente ao estágio I, II e o III respectivamente.

Os frascos de cultivo ficam em câmara de crescimento com temperatura de 28-30°C; iluminação com lâmpadas fluorescentes de 3000 Lux ($\pm 38 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Distância de 20 cm dos recipientes) e um fotoperíodo de 12 horas. Este estágio é caracterizado após cerca de 30-45 dias após o início do estabelecimento *in vitro*, quando as plantas atingem o tamanho de 03 cm de altura.

2.2.2 - DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS – ESTÁGIO II

As plantas estabelecidas *in vitro* passam para a fase de desdobramento vegetativo. Estas são transportadas para vidro maior (5 x 12 cm) com 50 mL do meio de cultura MS2, adicionada cinetina (0,1 mg L⁻¹) e 6-benzilamina purina (BAP; 0,2 mg L⁻¹). A cada três semanas procede-se ao subcultivo (aproximadamente cinco vezes ou mais). Em geral, a permanência por um período de 3 a 4 meses na câmara de crescimento é suficiente. A taxa de multiplicação é de 1:10, conforme a variedade considerada.

2.2.3 - FORMAÇÃO DAS RADÍCULAS – ESTÁGIO III

As touceiras, bem desenvolvidas, provenientes da segunda etapa, são divididas na base de manejos de três perfilhos, os quais são colocados em frascos de vidro contendo o meio MS3, adicionado cinetina (0,1 mg L⁻¹) e ácido indol butírico (AIB; 0,2 mg L⁻¹). Nestas condições, após 21 dias, aparecem raízes, e nessa etapa, ainda pode ocorrer a formação de alguns perfilhamentos. Neste estágio III, na câmara de crescimento, o fotoperíodo deve ser de 16 horas.

2.2.4 - TRANSPLANTIO E ACLIMATAÇÃO

Após 15-20 dias, as touceiras mais desenvolvidas são retiradas do meio de cultura e subdivididas em manejos com as folhas aparadas e, para evitar o ressecamento das raízes antes do transplante, as touceiras são postas em recipientes com água.

O transplante para a condição *ex vitro* é feito em recipientes próprios para mudas (copos de plásticos; saquinhos de plásticos ou bandejas de isopor), contendo substrato esterilizado. Em estufa com sombreamento, as mudas transplantadas ficam mantidas em condições com umidade relativa acima de 80% e temperatura de 28-35°C. Após 15 dias, é retirado o sombreamento e, durante 40 a 50 dias, as plantas são expostas ao ambiente externo com irrigação controlada, até o plantio definitivo no campo (viveiro).

Veiga (1997) cita que na fase de enraizamento, ou seja, no terceiro estágio da micropropagação em cana-de-açúcar, a composição do meio de cultura pode apresentar diferenças em relação à apresentada por Miocque (1999). Basicamente, as diferenças consistem em uma redução pela metade nos níveis de todos os macronutrientes, do pH (de 5,8 para 4,0), a não-adição de vitaminas e

reguladores de crescimento ao meio, e o nível de sacarose é dobrado (de 2% para 4%).

Com relação à micropropagação, a partir de pouco material vegetativo, esta técnica pode proporcionar uma rápida multiplicação e em elevada quantidade de plantas saudáveis e tal multiplicação em larga escala é independente da época do ano. Além disso, a micropropagação necessita de um espaço físico pequeno, permitem a obtenção de plantas livres de microrganismos como bactérias, fungos e vírus, os quais podem afetar, de maneira significativa, o desenvolvimento das plantas (Grattapaglia e Machado, 1998).

Apesar das vantagens da propagação *in vitro*, esta técnica pode produzir plantas com certas características peculiares, tais como partes aéreas muito pequenas, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, tecidos com reduzida resistência mecânica (menos colênquima e esclerênquima), maior conteúdo de água e estômatos não-funcionais (Cassells e Walsh, 1994; Ziv et al., 1987). Em relação às plantas cultivadas *ex vitro*, esta técnica pode produzir plantas com folhas finas (Wetzstein e Sommer, 1982) e pequenas, com poucos tricomas e com baixa atividade fotoautotrófica (Catsky e Solarová, 1992; Deng e Donnelly, 1993; Donnelly e Vidaver, 1984; Fujiwara, et al., 1987; Pospisilová et al., 1992).

2.3 – FATORES AMBIENTAIS E CULTIVO *IN VITRO*

2.3.1 – LUZ

A luz é utilizada na sala de cultura como estímulo ao crescimento e ao desenvolvimento de plantas. A ação deste fator é devido à sua importância em relação aos mecanismos da fotossíntese, da fotomorfogênese e do fototropismo (Genoud et al., 1999; Pyke e López-Juez, 1999). A luz branca fluorescente apresenta uma composição espectral que pode variar e, com isto, causar respostas diferenciadas na cultura *in vitro*. Como exemplo, em alguns casos, a predominância na emissão de fótons na região do vermelho até o azul pode estimular a indução de calos, quebrar a molécula de AIA (ácido indol acético) e ainda estimular a indução de brotos. Porém, nesta região do espectro, pode ter inibição na indução de raízes (Chamovitz e Deng, 1996; Barrueto Cid, 2001).

A exposição do material vegetal *in vitro* em intensidades luminosas combinadas com composições espectrais pode fazer parte de estudos em vários aspectos, como foi feito nos estudos relacionados à proliferação de brotos em aemóia (Rasai et al., 1994), em maçã a *Malus domestica* Borkh (Noé et al., 1997), em *Rhododendron* (Marks e Simpson, 1999) e em petúnia (Michalczuk e Michalczuk, 2000); no desenvolvimento de brotos em *Ceratonia siliqua* L. (Vinterhalter et al., 2001), e em tabaco *Nicotiana tabacum* (Radochova et al., 2000; Kadlecek et al., 2001).

Em geral, a intensidade da luz na faixa de 400 a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ melhora a atividade fotossintética (Desjardins, 1994). Kozai et al., (1988, 1991), Lee et al. (1995) e Dubé e Vidaver (1992) mostraram que a elevação da intensidade luminosa, fornecida durante o cultivo *in vitro*, resultou no aumento na fotossíntese. Tendo as demais condições necessárias para se obter uma elevada atividade fotossintética, o aumento da intensidade luminosa pode melhorar o crescimento do explante. Entretanto, Lee et al. (1995) citam que, na presença de 314 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons fotossintéticos, as plantas tiveram menor saturação fotossintética do que as plantas crescidas sob intensidade de luz considerada média (115 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A diminuição da fotossíntese foi atribuída a danos específicos nos pigmentos receptores de luz ligados ao sistema antena dos fotossistemas. Já Anna et al. (1999) citam que, sob um maior fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e, tanto em condições fotomixotrófica (sacarose 15 g L⁻¹) e fotoautotrófica, o crescimento de brotos de explantes de roseiras (cv. Samanta e Landora) cultivados *in vitro* foi superior quando comparado ao crescimento sob um menor FFF (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Uma interação significativa foi observada entre o DIF (diferença da temperatura média diurna com a média noturna) e o FFF, em cultivos de plantas de *Rehmannia glutinosa*, em condições fotoautotrófica e fotomixotrófica (Cui et al., 2000). O maior crescimento das plantas foi em DIF positivo (+8 DIF; 25/18°C) e com o FFF de 210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Uma outra concepção de fornecimento de energia luminosa no ambiente *in vitro* é o uso de luz natural. Em bananeira, Kodym e Arias (1999) utilizaram a luz natural numa intensidade média de 570 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF, temperatura de 23-30°C e fotoperíodo de 12-16 h. Nestas condições, houve a maior produção de

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

2.3.2 – CARBOIDRATOS

Dentre os componentes do meio de cultivo, a sacarose se mostra de extrema importância, pois é a fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento do explante, quando a taxa fotossintética nas condições *in vitro* não é otimizada. Este composto é indispensável e garante a permanência viva do explante *in vitro*, já que o sistema tradicional de cultivo não é suficientemente autotrófico (Barrueto Cid, 2001). Sabe-se que os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas e polissacarídeos estruturais como celulose (Torres et al., 1998). Entretanto, quando as fontes de carbono são adicionadas em altas concentrações, o potencial osmótico do meio pode acarretar estresse hídrico, com perdas de hidratação dos tecidos na condição *in vitro* (Souza, 1995).

Os estudos fisiológicos de fatores ambientais, ligados à atividade fotossintética de plantas em cultura de tecidos, são fundamentais para o processo de propagação *in vitro* bem como o acompanhamento do material vegetal até as condições *ex vitro*, após a utilização de pré-tratamentos *in vitro*. A utilização de fatores ambientais como níveis de irradiâncias e compostos orgânicos como a sacarose foram estudados em *Ceratonia siliqua* L. Neste trabalho, foi verificado que maiores valores de área foliar foram obtidos em combinações com menor concentração de sacarose e sob alta irradiância e baixa irradiância com maior concentração de sacarose (Vinterhalter et al., 2001). Entretanto, os estudos com tabaco (*Nicotiana tabacum*), de Kadlecek et al. (2001), mostraram que os maiores valores de área foliar total foram encontrados nos pré-tratamentos com alta irradiância e alta concentração de sacarose no meio. Neste trabalho, foi verificado um aumento de espessura foliar em condições elevadas de irradiância associadas à presença de sacarose. Segundo os autores do trabalho, este fato mostrou que esses dois fatores foram os principais responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento de plantas *in vitro* da espécie em estudo. Nesse caso, o controle do ambiente e do meio de cultura pode refletir a possibilidade de adequar as

condições *in vitro*, com o objetivo de aproximá-lo ao máximo do ambiente *ex vitro*. Tal ação pode diminuir as perdas na aclimatação.

Em elevadas concentrações de sacarose, o crescimento de plantas de rosa teve forte impacto no teor de amido nas folhas e, posteriormente, na fotossíntese (Capellades et al., 1991). Neste trabalho, observou-se uma quantidade elevada de grânulos de amido nas plantas crescidas em meio com 5% de sacarose, enquanto que nos teores de 0 a 1%, nenhum grânulo foi observado. Paralelamente, o aumento na concentração da sacarose em níveis em torno de 5% reduziu, consideravelmente, a fotossíntese. Tal comprometimento na fotossíntese foi associado a alterações na emissão de fluorescência da clorofila (Capellades et al., 1990).

Após quatro dias de cultivo, plantas de orquídeas em condições fotoautotróficas apresentaram maior crescimento, maiores taxas de fotossíntese líquida e massa fresca e seca. O valor destas duas últimas variáveis foi 1,5 vez superior ao das plantas cultivadas em condições fotomixotróficas (com sacarose no meio e sem ventilação forçada) (Hahn et al., 2001).

Segundo Pasqual (2001), tem sido sugerido que uma vez que as plantas *in vitro* têm certa habilidade fotossintética e desenvolvem autotrofia, na presença de fatores físicos do ambiente como o CO₂ e luz, não é necessária adicionar sacarose ao meio de cultura. Assim, é conceituada a cultura de tecidos autotrófica (livre de açúcar) e a mixotrófica (intermediária).

2.4 - FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Uma técnica importante no diagnóstico do fotossistema II (PSII) é a fluorescência. Vários artigos foram publicados sobre a base teórica e aplicações na ecofisiologia relacionados à fluorescência (Krause e Weis 1991; Schreiber et al., 1998; Mohammed et al., 1995). Segundo Krause e Weis (1991), a medição da fluorescência pode ser considerada como uma medida de complemento às medições do processo fotossintético. Segundo alguns autores, a emissão da fluorescência mostra o nível da energia de excitação nos complexos pigmentos/proteínas, energia esta que controla a fotossíntese. Por meio da

fluorescência, é possível obter informações detalhadas sobre a estrutura, a distribuição de energia e atividade do aparelho fotossintético e, em especial, o fotossistema II (PSII) (Strasser et al., 2000).

Em brotos de *Pinus radiata*, o estudo da fluorescência da clorofila demonstrou que a eficiência fotossintética do PSII foi superior, quando estes brotos foram desenvolvidos em meio de cultura *in vitro*, sem adição de sacarose. Durante a mudança da condição heterotrófica para a autotrófica, ocorrida durante a fase de aclimatização, a fluorescência da clorofila foi uma técnica útil para avaliar o nível de estresse nutricional ou fisiológico dos brotos de plantas de *P. radiata* cultivado *in vitro* (Aitken-Christie et al., 1992).

Em comparação às plantas cultivadas nos meios de cultivo contendo 0% ou 1% de sacarose, as plantas de morango cultivadas nos meios contendo 3% ou 5% de sacarose apresentaram menores valores do rendimento quântico e do rendimento quântico máximo do PSII, caracterizado pela relação F_v/F_m (Hdider e Desjardins, 1994). Segundo os autores, a sacarose afetou a capacidade fotoquímica das plantas de morango micropropagadas. Tal dano foi possível ser detectado por meio do estudo da emissão da fluorescência.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado na unidade de pesquisa em fotossíntese de plantas *in vitro*, no Setor de Fisiologia Vegetal, UENF, Campos dos Goytacazes/RJ. Para tanto, utilizaram, como explante, plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum Oficinarum* spp.) da variedade SP-791011, com dois a três centímetros de altura, sem raiz, proveniente de material vegetal cultivado em meio MS modificado (0,2 mg L⁻¹ de fonte de nitrogênio combinado; 0,1 mg L⁻¹ de cinetina; 0,2 mg L⁻¹ de 6-benzilamina purina (BAP); 1,0 mg L⁻¹ de tiamina; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 20 g L⁻¹ de sacarose), em condições de perfilhamento. O material vegetal foi obtido no Laboratório de Cultura de Tecido, Campus Dr. Leonel Miranda, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em Campos dos Goytacazes/RJ.

A partir do material obtido na UFRRJ, instalou-se o experimento em sala de crescimento de cultivo *in vitro*, a uma temperatura 25°C ± 1,0; a um fluxo de fótons fotossintéticos de 135 μmol m⁻² s⁻¹, com 16h de fotoperíodo, obtido por meio de lâmpadas fluorescentes do tipo grow lux (40 watts).

O meio de cultura utilizado no experimento foi o MS padrão (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 13 g L⁻¹ de agar, pH 5,7 (± 0,1) e sem adição de reguladores de crescimento. Os trabalhos consistiram do cultivo em ambiente com dois diferentes tipos de ventilação (V0 e V1) com quatro níveis de sacarose adicionados ao meio de cultura (0%; 1,5%; 3% e 4,5%). A

ventilação V0 foi assim denominada, pois o frasco de cultivo não apresentava trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e o meio externo. Neste tratamento, o frasco era completamente fechado. A ventilação considerada V1 apresentava trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o meio externo, e, nesta condição V1, era injetado ar comprimido esterilizado a um fluxo de 30 mL min⁻¹, com 75% de umidade relativa, a 27°C e com uma concentração em torno de 370 µL L⁻¹ de CO₂.

No sistema de ar comprimido, trabalhou-se com o ar natural oriundo de um compressor (localizado externamente ao laboratório) acrescido de tubulações; registros; um regulador de pressão com filtro (remover partículas em suspensão tais como óleo e água); um distribuidor do fluxo (uniformizar o fluxo ar na distribuição); mangueiras (diâmetro 4.mm); um medidor da umidade relativa (UR) e temperatura do ar comprimido; e um medidor do fluxo. O ar comprimido, antes de penetrar nos vidros pelas tampas de cada frasco de cultivo, passava por filtros esterilizadores (0,2 µm; Millipore) instalados em cada frasco, sendo um localizado na entrada e outro na saída do ar injetado, perfazendo dois filtros por frasco. Uma vez que os frascos de cultivo apresentavam um volume de 2,2 L, o tempo necessário para haver a troca completa do ar no frasco era de 73 minutos, ou seja, nestas condições, ocorriam 19,7 trocas por dia.

A unidade experimental foi constituída com um frasco de vidro maior (2,2 L; 180 mm altura e 150 mm diâmetro), e, neste frasco maior, foram colocados quatro vidros menores (70 mL; 65 mm altura e 60 mm diâmetro) sem tampa, tipo “baby food”. O frasco menor, num volume de 30 mL, continha, individualmente, o meio de cultura com uma das quatro diferentes concentrações de sacarose (0%; 1,5%; 3% e 4,5%).

Os frascos maiores, numa quantidade de 16 frascos, foram divididos em dois grupos, conforme o ambiente de cultivo. Em um grupo de oito frascos, a tampa foi completamente vedada (V0), e, em outro grupo, a tampa permitia a troca gasosa num fluxo de ar de ventilação forçada (V1) (Figura 1).

Os frascos maiores com as respectivas tampas, e os frascos menores com os meios de cultura foram conjuntamente esterilizados em autoclave com pressão de 1,5 atm e a temperatura de 121°C, por 20 minutos.

Os trabalhos de inoculação foram realizados sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Os explantes, plântulas de cana, receberam um corte transversal do limbo foliar acima do ápice caulinar, para que houvesse, no início do experimento, uma padronização do material vegetal a ser inoculado nos frascos de cultivo. Aos trinta dias da inoculação, o meio de cultura e as plântulas de cana desenvolvidas nos respectivos tratamentos receberam avaliação das características descritas a seguir:



Figura 1 - Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em frascos tipo “baby food”. Os frascos “baby food” estavam dentro dos frascos maiores sem ventilação (V0) e com ventilação forçada (V1).

3.1.1 - Determinação da massa seca da parte aérea (MSPA), matéria seca de raízes (MSR) e a relação da massa seca da parte aérea com a massa seca das raízes (MSPA / MSR): No final do experimento, as plântulas foram divididas em duas partes: a aérea e raiz. Estas partes foram colocadas em estufa a 70°C por 48 h e foram pesadas para a determinação das respectivas massas secas. Com os dados da massa seca, foi possível estimar a relação da massa seca da parte aérea com a massa seca da raiz (MSPA/MSR).

3.1.2 - Comprimento da nervura central da folha (CNF): Por meio de um paquímetro digital da marca Starred (modelo Digital Caliper 727, 0-150 mm) o

comprimento da nervura central da folha foi determinado medindo-se o tamanho da nervura central da maior folha de cada plântula.

3.1.3 - Intensidade de cor verde das folhas (índice SPAD): O teor de clorofila total foi estimado por meio de um medidor portátil do teor de clorofila modelo SPAD 502 (Chlorophyll Meter – Minolta, Japão). As medidas foram realizadas em plântulas inteiras, em uma das 2° ou 3° folhas expandidas contadas a partir do ápice, de um dos colmos da plântula. As medidas foram feitas em três diferentes pontos do limbo foliar, direcionados a parte mediana evitando-se as extremidades da folha. Após as medidas do índice SPAD, realizaram-se, nessas mesmas folhas, as medidas das variáveis da fluorescência da clorofila *a*.

3.1.4 – O pH do meio de cultura: No final do experimento, o pH do meio de cultura foi novamente medido com auxílio de um peagâmetro da marca Quimis, São Paulo, e, durante as medidas, este foi inserido dentro do meio de cultura. Nesta avaliação consideraram-se os frascos de cultivos que não se inclui sacarose ao meio (0%), mas se fez o cultivo do explante.

3.1.5 – Trocas gasosas, Condutância estomática, Transpiração e o Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar: A taxa fotossintética líquida (*A*), a condutância estomática (*g_s*), transpiração (*E*) e o déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ($DPV_{\text{folha-ar}}$) foram determinados na 2° ou 3° folha expandida contada a partir do ápice, de um dos colmos da plântula. Estas determinações foram feitas a uma intensidade de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF, utilizando-se um conjunto de LED's vermelhos, sem alterar a temperatura da folha avaliada, e este sistema de LED's estava acoplado à câmara do Sistema Portátil de Medição das Trocas Gasosas, modelo LI - 6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). As folhas estavam fixadas à planta.

3.1.6 - Taxa de perda de água (TPA): A taxa de perda de água (TPA) da folha de cada explante foi determinada segundo metodologia proposta por Eliasson et al. (1994). A massa fresca (MF) de cada uma das 2° ou 3° folhas expandidas contadas a partir do ápice, e destacadas de um dos colmos da plântula, foi

determinada. Inicialmente, a folha destacada, e, ininterruptamente, a cada 30 minutos, por meio de uma balança de precisão, foram feitas, seis leituras até completar 180 minutos. A determinação da TPA foi feita em bancada do laboratório, nas condições de 25,6°C e 81% de umidade relativa. Estas variáveis foram monitoradas por um medidor digital (Spectrum Technologies, USA; modelo Watch 470) exposto ao lado da balança. Nestas condições, as folhas ficavam sobre a bancada do laboratório durante todo o tempo de medição para que ocorresse a perda de água pelo tecido vegetal. Finalizadas as determinações da massa fresca das folhas, estas foram colocadas em estufa a 70°C por 48 h e, depois, foi determinada a massa seca (MS). A taxa de perda de água foi calculada segundo a equação:

$TPA = \left(\frac{M_F - M_X}{M_F - M_S} \right) \cdot 100$. Em que M_F corresponde à massa fresca inicial, M_X corresponde à massa fresca a cada trinta minutos entre as medições, e M_S corresponde à massa seca.

3.1.7 - Fluorescência da clorofila *a*: Nas mesmas folhas onde foram feitas as medições do índice SPAD e mantendo-as intactas com as plântulas em contato com o meio de cultura, as variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram medidas usando o fluorímetro não-modulado PEA (Plant Efficiency Analyser-Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). Na bancada do laboratório, após adaptação ao escuro por 30 minutos com auxílio de pinças, foram determinadas a fluorescência inicial (F_0), a relação F_v/F_m (rendimento quântico máximo do PSII) e a área sobre a curva (área esta proporcional à quantidade dos aceptores localizados na parte redutora do PSII, redutores estes que passam elétrons para Q_a) (Bòlhar-Nordenkampf et al., 1989).

3.1.8 - Fotossíntese potencial: A fotossíntese potencial (A_{pot}) foi determinada no limbo foliar da 2° ou 3° folha expandida contada a partir do ápice de um dos colmos da plântula, utilizando-se o eletrodo de oxigênio do tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, Inglaterra). Para tanto, uma área conhecida do limbo foliar foi posta na câmara do aparelho e a taxa de liberação de oxigênio foi determinada segundo a metodologia proposta por Delieu e Walker (1983). Por meio do eletrodo e uma fonte externa de luz variável, foi possível traçar curvas

entre a fotossíntese potencial (taxa de liberação de oxigênio) e o fluxo de fótons fotossintéticos incidentes sobre a parte da folha do explante. No traçado da curva da A_{pot} versus Fluxo de Fótons Fotossintéticos (FFF), foram utilizados, por meio de LED's vermelhos, seis intensidades de FFF, com os valores de 0; 150; 300; 450; 600 e 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em cada intensidade de FFF, o tempo de medição da A_{pot} , foi de 3 minutos.

3.2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O modelo estatístico adotado foi o fatorial com parcelas subdivididas no delineamento inteiramente casualizado. Desta forma, adotou-se, para as avaliações que contemplaram dois fatores, o modelo de equação descrito a seguir: $Y_{ijk} = \mu + V_i + (\xi_{ik}) + S_j + VS_{ij} + (\xi_{ijk})$; em que:

Y_{ijk} = valor da ijk -ésima observação;

μ = efeito da média geral;

V_i = efeito do fator (Ventilação; V), $i = 1$ e 2 .;

S_j = efeito do fator (Sacarose; S), $j = 1, 2$ e 3 .;

VS_{ij} = efeito da interação do i -ésimo nível de V com o j -ésimo nível de S; e

ξ_{ijk} = erro experimental com $k = 1, 2, 3, \dots r$. (repetição).

O modelo de equação correspondeu ao número de fatores considerados em cada avaliação, bem como a análise de variância (Quadro 1). Nos testes F e de Tukey, considerou-se uma significância a 5% de probabilidade.

Quadro 1 - Modelo da análise de variância para as avaliações de dois fatores, Ventilação e Sacarose, em parcelas subdivididas.

Coeficiente Variação	Soma de Quadrado	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F
Repetição (R)	SQ_R	GL_R		
Fator Ventilação (FV)	SQ_{FV}	GL_{FV}	QM_{FV}	$QM_{FV}/QM_{Res.l}$

Resíduo I (Res.I)	$SQ_{Res.I}$	$GL_{Res.I}$	$QM_{Res.I}$	
PARCELA				
Fator Sacarose (FS)	SQ_{FS}	GL_{FS}	QM_{FS}	$QM_{FV}/QM_{Res.II}$
Fator Interação (FVxFS)	$SQ_{(FVxFS)}$	$GL_{(FVxFS)}$	$QM_{(FVxFS)}$	$QM_{(FVxFS)}/QM_{Res.II}$
Resíduo II (Res.II)	$SQ_{Res.II}$	$GL_{Res.II}$	$QM_{Res.II}$	
SUB-SUBPARCELA				
	SQ_{Total}	GL_{Total}		

Nas avaliações das massas secas, comprimento da nervura central foliar, índice de SPAD, fluorescência da clorofila *a* e da taxa de perda de água ocorreram oito repetições ($r= 8$), dois níveis para ventilação (V0 e V1) e três níveis de concentração de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%); proporcionando um tamanho de amostra igual a quarenta e oito ($n= 48$).

Nas avaliações da Fotossíntese Potencial (A_{pot}), Taxa Fotossintética Líquida (A), Condutância Estomática (g_s), Transpiração (E) e do Déficit de Pressão de Vapor ($DPV_{folha-ar}$) ocorreram cinco repetições ($r= 5$), dois níveis para ventilação (V0 e V1) e três níveis de concentração de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%), proporcionando um tamanho de amostra igual a trinta ($n= 30$).

Na avaliação do pH do meio, ocorreram oito repetições ($r= 8$), dois níveis para ventilação ($V= 2$) e quatro níveis de concentração de sacarose (0%; 1,5%; 3% e 4,5%), o que proporcionou um tamanho da amostra igual a sessenta e quatro ($n= 64$).

Na avaliação da taxa de perda de água, ocorreram oito repetições ($r= 8$), seis níveis de leitura (30; 60; 90; 120; 150 e 180 min.), dois níveis para ventilação (V0 e V1) e três níveis de concentração de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%), proporcionando um tamanho de amostra igual a duzentos e oitenta e oito ($n= 288$). Esses resultados também foram submetidos à análise de regressão.

Na avaliação da Fotossíntese Potencial (A_{pot}), ocorreram cinco repetições ($r= 5$), seis níveis para leitura (0; 150; 300; 450; 600 e 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dois níveis para ventilação (V0 e V1) e três níveis de concentração de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%), proporcionando um tamanho de amostra igual a cento e oitenta ($n= 180$). Esses resultados também foram submetidos à análise de regressão.

Na análise de variância das avaliações em que se consideraram três fatores, o fator Leitura (F_L) foi a parcela, o fator Ventilação (F_V) foi a subparcela e o fator Sacarose (F_S) foi a subsubparcela.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas cultivadas *in vitro* sem adição de sacarose no meio (0%), não se estabeleceram nas duas condições do ambiente de cultivo, ou seja, sem e com a ventilação forçada (Figura 2). Nesta fase da micropropagação, este fato mostra a importância de se adicionar ao meio de cultura uma fonte exógena de carboidrato no início do estabelecimento das plântulas de cana-de-açúcar. Mesmo com a injeção de ar, num fluxo de 30 mL min^{-1} e na concentração de $370 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 , no interior dos frascos de cultivo, sem adição de sacarose, essa injeção não foi suficiente para fornecer carbono necessário para o crescimento dos explantes. Possivelmente, nas condições estudadas neste trabalho, a intensidade luminosa pode ter sido o fator limitante para esta espécie. De fato, sendo a cana-de-açúcar uma planta do metabolismo C4, requer elevadas intensidades luminosas para que haja incorporação do carbono. Ou seja, as plantas que apresentam tal metabolismo C4 necessitam de maiores quantidades de ATP, uma vez que, nestas plantas, o CO_2 necessita ser concentrado nas células da bainha. Esta concentração requer um adicional de dois ATP (Buchanan et al., 2000). Este fato torna tais plantas mais exigentes em luz, o que as caracteriza como possuírem elevada irradiância de compensação (Taiz e Zeiger, 2002). Sendo assim, torna-se justificável que as plantas C4 necessitem de um maior número de fótons para fazer funcionar, em maior intensidade, a fase fotoquímica da fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2002). Estes resultados podem mostrar que, na ausência de sacarose, em frascos de cultivo ventilados com ar na concentração de $370 \mu\text{L L}^{-1}$ de CO_2 , uma

maior quantidade de luz acima de $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deverá ser necessária para uma melhor propagação *in vitro* da cana-de-açúcar.

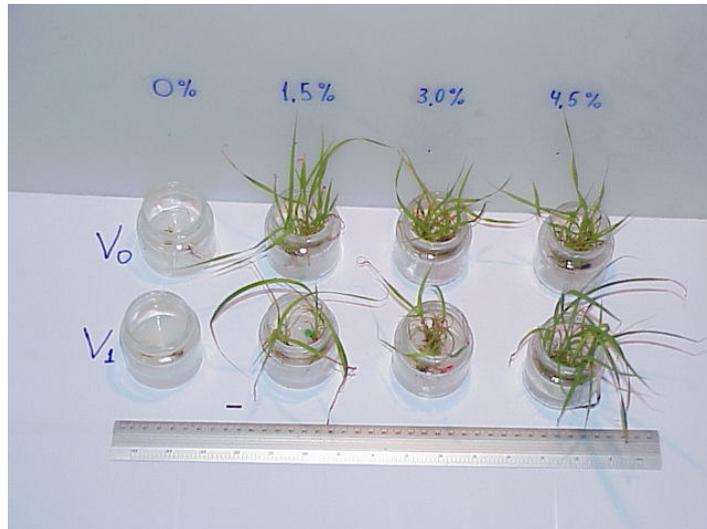


Figura 2 – Plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* spp.) da variedade SP-791011 em frasco de vidro, tipo “baby food”, aos 30 dias do cultivo em três níveis (1,5%; 3% e 4,5%) de sacarose adicionada ao meio e em dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1). À esquerda dois frascos plântulas de cana-de-açúcar que não se estabeleceram em meio sem sacarose (0%).

Nos quadros 2 e 3, observa-se que, das quinze características avaliadas, duas não apresentaram efeito significativo em nível de 0,05, ou seja, o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) e a área proporcional à quantidade de aceptores localizados na parte redutora do PSII (AREA). Houve, em oito características, efeito significativo da interação entre ventilação no frasco de cultivo com a adição de sacarose ao meio de cultura. As oito características são assim relacionadas: matéria seca (MSPA; MSR e MSPA/MSR), comprimento da nervura central da folha (CNF), índice do SPAD, condutância estomática (g_s), taxa de perda de água e liberação de CO_2 (Fotossíntese potencial; A_{Pot}).

Quadro 2 - Estimativa dos quadrados médios do fator ventilação (F_v), do fator sacarose (F_s), da respectiva interação ($F_v \times F_s$) e dos resíduos em parcela subdividida. Características avaliadas em cultivo de plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Coeficiente Variação	QM ^{1/}		Quadrados Médios - QM ^{1/}				
	GL	pH	GL	MSPA	MSR	MSPA/MSR	CNF
Fv	1	0,001 ns	1	0,0201 *	0,0007 *	1,346 *	29677 *
Fs	3	23,48 *	2	0,0134 *	0,0032 *	0,7528 *	755 ns
Fv x Fs	3	0,037 ns	2	0,0127 *	0,0014 *	1,5534 *	1487 *
Resíduo I	7	0,068	7	0,0005	0,0001	0,1182	193
Resíduo II	42	0,254	28	0,0004	0,0002	0,0958	261
T. Amostra (n)	64		48				

Continua...

^{1/}pH = pH do meio de cultura; MSPA = Massa seca da parte aérea; MSR = massa seca das raízes; MSPA/MSR = relação das massas secas da parte aérea com das raízes; e CNF = Comprimento da nervura central da folha.

ns = Não significativo em nível de 0,05; e

* = Significativo em nível de 0,05.

Quadro 2 - continuação.

Coeficiente Variação	GL	Quadrados Médios ^{1/}			
		SPAD	F ₀	F _v /F _m	AREA
Fv	1	385,3 *	34347 *	0,0006 ns	77775208 ns
Fs	2	19,6 *	8782 *	0,0003 ns	16057708 ns
Fv x Fs	2	62,0 *	1183 ns	0,0006 ns	20068958 ns
Resíduo I	7	4,7	399	0,0003	18813780
Resíduo II	28	3,4	426	0,0003	8795476
T. Amostra (n)	48				

Continua...

^{1/}SPAD = Índice SPAD; F₀ = Fluorescência inicial; F_v/F_m = Rendimento Quântico Máximo do PSII; e AREA = Área proporcional à quantidade de aceptores localizados na parte redutora do PSII.

ns = Não-significativo em nível de 0,05; e

* = Significativo em nível de 0,05.

Quadro 2 - continuação.

Coeficiente Variação	GL	Quadrados Médios ^{1/}			
		A	gs	E	DPV
Fv	1	30,4557 *	0,0663 *	26,5080 *	0,0684 ns
Fs	2	8,4038 ns	0,0299 *	18,2730 *	0,0447 *
Fv x Fs	2	6,6845 ns	0,0098 *	2,8470 ns	0,0031 ns
Resíduo I	4	1,0231	0,0013	0,8555	0,0100
Resíduo II	16	3,4009	0,0012	2,1067	0,0096
T. Amostra (n)	30				

^{1/}A = Liberação de CO₂ (Taxa Fotossíntese Líquida); gs = Condutância Estomática; E = Transpiração; e DPV = Déficit pressão de vapor entre folha e ar.

ns = Não-significativo em nível de 0,05; e

* = Significativo em nível de 0,05.

Quadro 3 - Estimativa dos quadrados médios do fator leitura (F_L) do fator ventilação (F_V), do fator sacarose (F_S), das respectivas interações e dos resíduos em parcelas subsubdividida. Características avaliadas em plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Coeficiente Variação	TPA		A _{pot}	
	GL	QM	GL	QM
F _L ^{i.}	5	0,6144 *	5	311,30 *
F _V ^{ii.}	1	3,6956 *	1	221,85 *
F _S ^{iii.}	2	0,1209 *	2	223,58 *
F _L x F _V ^{ii.}	5	0,0077 ns	5	10,00 *
F _L x F _S ^{iii.}	10	0,0014 ns	10	2,99 ns
F _V x F _S ^{iii.}	2	0,1300 *	2	15,07 *
F _L x F _V x F _S ^{iii.}	10	0,0027 ns	10	5,61 ns
Resíduo I	35	0,0020	20	1,06
Resíduo II	42	0,0039	24	1,93
Resíduo III	168	0,0081	96	3,44
Amostra (n)	288		180	

^{1/}TPA = Taxa da perda de água da folha e A_{pot} = Liberação de O₂ (Fotossíntese Potencial).

^{i.} = Parcela I;

^{ii.} = Subparcela; e

^{iii.} = Subsubparcela.

ns = Não-significativo em nível de 0,05; e

* = Significativo em nível de 0,05.

No quadro 4, observa-se que a maior produção de biomassa seca, da parte aérea como no sistema radicular, foi no frasco ventilado e na maior concentração de sacarose. A maior produção de biomassa foi de 0,183 g e 0,080 g de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR), respectivamente, para o tratamento ventilado e com 4,5% de sacarose. A maior relação MSPA/MSR ocorreu no tratamento ventilado e na menor concentração de sacarose adicionada ao meio. Este fato mostra que, nestas condições (V1 e 1,5%), o explante alocou mais assimilados para a parte aérea, em detrimento do sistema radicular, o que mostra que, nas condições *in vitro*, a presença da sacarose no meio contribuiu para a otimização do enraizamento nesta espécie. No frasco fechado, a sacarose não teve efeito sobre a MSPA, MSR e MSPA/MSR, o que não evidenciou diferenças na alocação dos assimilados entre a parte aérea e o sistema radicular no frasco de cultivo em que não se permitiu a troca gasosa.

Quadro 4 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V0 e V1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da massa seca da parte aérea (MSPA), da massa seca das raízes (MSR) e da relação das massas secas da parte aérea com as das raízes. (MSPA/MSR). Características avaliadas em plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Médias ^{1/}	MSPA (grama)			MSR (grama)		
	Ventilação (V)		S.	Ventilação (V)		S.
	V0	V1		V0	V1	
Sacarose (S.)	0,084 B	0,125 a	S.	0,047 b	0,055 a	S.
S. 1,5%	0,077 C	0,074 c	0,08 c	0,040 b	0,034 b	0,04 c
S. 3%	0,094 Bc	0,115 b	0,10 b	0,051 b	0,050 b	0,05 b
S. 4,5%	0,081 C	0,186 a	0,13 a	0,050 b	0,080 a	0,07 a
T. Amostra (n)	48			48		

Continua...

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os tratamentos (V₀S_{1,5%}; V₀S_{3%}; V₀S_{4,5%}; V₁S_{1,5%}; V₁S_{3%} e V₁S_{4,5%}) não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05).

Com relação às trocas gasosas nos frascos de cultivo, resultados semelhantes à produção de matéria seca foram observados para a característica comprimento da maior folha (Quadro 5). A movimentação de ar no interior dos frascos contribuiu para elevar o comprimento da maior folha dos explantes. A presença da sacarose não teve efeito sobre o comprimento da nervura central da folha. Nos frascos fechados, foi observado que as plantas apresentaram um enrolamento da folha (dados não-mostrados), o que pode ser caracterizado como uma epinastia foliar (Abeles et al.,1992). Ou seja, nos recipientes fechados, pode ter ocorrido um acúmulo de etileno, fato que pode não ter acontecido nos frascos ventilados. Nestes frascos, o movimento de ar foi suficiente para eliminar tal fitormônio, uma vez que nestes frascos o ar era trocado, em aproximadamente, 1h (0,8 h⁻¹ de trocas). A epinastia foliar pode ser confirmada por meio da redução no comprimento foliar nos frascos sem trocas gasosas (Quadro 5).

Quadro 4 - continuação.

Médias ^{1/}	MSPA / MSR		
	Ventilação (V)		
	V0	V1	S.
Sacarose (S.)	1,88 <u>b</u>	2,21 <u>A</u>	S.
S. 1,5%	1,83 <u>b</u>	2,72 <u>A</u>	2,27 <u>A</u>
S. 3%	1,80 <u>bc</u>	2,25 <u>Ab</u>	2,02 <u>Ab</u>
S. 4,5%	2,01 <u>b</u>	1,67 <u>C</u>	1,84 <u>B</u>
T. Amostra (n)	48		

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os

tratamentos ($V_0S_{1,5\%}$; $V_0S_{3\%}$; $V_0S_{4,5\%}$; $V_1S_{1,5\%}$; $V_1S_{3\%}$ e $V_1S_{4,5\%}$) não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

As plantas cultivadas nos frascos ventilados apresentaram maior índice SPAD comparado com as do não-ventilado (Quadro 5). Os valores desta variável estão positivamente correlacionados com os teores de clorofilas totais e N em várias espécies (Torres Netto et al., 2002; Torres Netto et al., 2005; Chang e Robison, 2003). Segundo Hendry e Price (1993), a redução no teor de clorofilas totais pode ser considerada um indicador sensível do processo de senescência e Baurle et al. (2004) cita que o teor de clorofila decresce quando a folha remobiliza compostos, em preparação para a senescência. Uma vez que uma das respostas do tecido vegetal à ação do etileno é a senescência deste tecido, a diminuição dos valores do índice SPAD nas plantas cultivadas nos frascos fechados pode ser explicada pela degradação das moléculas de clorofilas nos explantes cultivados nestes frascos. Tal degradação destes pigmentos fotossintéticos pode ter sido promovida pela ação do etileno. Nas plantas cultivadas nos frascos de cultivos em que se permitiram as trocas gasosas, possivelmente, este fitormônio tenha sido arrastado pelo fluxo do ar que foi injetado no interior dos frascos. Em relação às plantas que cresceram nos meios de cultivo com 1,5% e 3% de concentração de sacarose, apresentaram o maior valor do índice SPAD, as plantas do meio com 4,5% (Quadro 5). Entretanto, uma resposta contraditória foi obtida por La Rosa et al. (1984). Estes autores relataram que a presença da sacarose no meio de cultivo inibiu o acúmulo de clorofila nos tecidos vegetais.

Quadro 5 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V_0 e V_1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) do comprimento da nervura central da folha (CNF) e do índice SPAD. Características avaliadas em plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Médias ^{1/}	CNF (milímetro)			SPAD		
	Ventilação (V)		S.	Ventilação (V)		S.
	V0	V1		V0	V1	
Sacarose (S.)	84,3 b	134,0 a	S.	23,6 b	29,27 a	S.
S. 1,5%	90,3 <u>bc</u>	141,4 <u>a</u>	115,9 a	24,55 <u>cd</u>	27,26 <u>bc</u>	25,91 b

S. 3%	94,7 <u>b</u>	124,4 <u>a</u>	109,5 a	23,61 <u>d</u>	27,76 <u>b</u>	25,69 b
S. 4,5%	68,0 <u>c</u>	136,3 <u>a</u>	102,1 a	22,64 <u>d</u>	32,78 <u>a</u>	27,71 a
T. Amostra (n)	48			48		

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os tratamentos (V₀S_{1,5%}; V₀S_{3%}; V₀S_{4,5%}; V₁S_{1,5%}; V₁S_{3%} e V₁S_{4,5%}) não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05).

Nos frascos de cultivo em que não se adicionou sacarose no meio, tanto nos frascos ventilados como nos frascos fechados, o pH foi mais alcalino (Quadro 6) e equivalente ao valor do pH no meio de cultura quando elaborado (5,7 ± 0,1). Nos cultivos em que se adicionou a sacarose, os valores do pH foram mais ácidos em relação ao valor inicial do meio e não apresentaram diferenças entre si. O valor do pH não alterado pode estar relacionado com a não-absorção de nutrientes minerais pelos explantes nos frascos em que se teve ausência de sacarose no meio (Williams, 1995). Tal fato mostrou que o não-crescimento do explante na ausência de sacarose no meio, possivelmente ocorreu pela falta da ação direta deste composto como fonte de energia e de carbono para o explante de cana-de-açúcar. A ventilação nos frascos de cultivo não causou efeito nos valores do pH (Quadro 6).

Quadro 6 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V0 e V1) e sacarose (0%; 1,5%; 3% e 4,5%) e das oito respectivas combinações (tratamentos) do pH no meio de cultura. Características avaliadas em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Médias ^{1/}	PH		
	Ventilação (V)		S.
	V0	V1	
Sacarose (S.)	3,09 a	3,12 a	S.
S. 0%	5,55 <u>a</u>	5,48 <u>a</u>	5,51 a
S. 1,5%	3,01 <u>b</u>	3,12 <u>b</u>	3,06 b
S. 3%	3,02 <u>b</u>	2,93 <u>b</u>	2,98 b
S. 4,5%	3,23 <u>b</u>	3,32 <u>b</u>	3,27 b
T. Amostra (n)	64		

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não-sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os tratamentos (V₀S_{0%}; V₀S_{1,5%}; V₀S_{3%}; V₀S_{4,5%}; V₁S_{0%}; V₁S_{1,5%}; V₁S_{3%} e V₁S_{4,5%}) não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05).

Em todos os tratamentos, as plantas apresentaram abertura nos estômatos (Quadro 7). Nos tratamentos com a presença de sacarose, os valores da condutância estomática variaram em média de 0,16 a 0,40 mol m⁻² s⁻¹. Em relação aos frascos fechados, os valores desta variável foram menores nas plantas cultivadas nos frascos ventilados (Quadro 7). A troca gasosa no interior do frasco ventilado promoveu um maior ajustamento estomático. Ou seja, a movimentação de ar em torno das plantas pode ter proporcionado maior regulação na abertura e fechamento dos estômatos. Tal movimentação permite a remoção da camada de ar limítrofe, o que pode tornar os estômatos mais responsivos à ação do ar externo às células estomáticas da epiderme das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. Plantas micropropagadas em frascos que não permitem as trocas gasosas podem apresentar elevada transpiração cuticular e estomática (Ziv, 1995). De fato, em plantas micropropagadas na ausência de trocas gasosas, os estômatos estão freqüentemente abertos (Preece e Sutter, 1991, Ziv et al, 1987). Nestas condições, tais alterações anatômicas estariam associadas à elevada umidade relativa no interior dos frascos e limitadas trocas de CO₂ (Ziv, 1995). De fato, as plantas que foram micropropagadas nos frascos fechados apresentaram maior transpiração (Quadro 7).

Quadro 7 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V0 e V1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da liberação de CO₂ (A), da condutância estomática (g_s), da transpiração (E) e do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV). Características avaliadas em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Médias ^{1/}	A (μmol de CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)		g _s (mol m ⁻² s ⁻¹)	
	Ventilação (V)		Ventilação (V)	
Sacarose (S.)	V0	V1	V0	V1

	-10,44 a	-8,42 b	S.	0,33 a	0,23 b	S.	
S. 1,5%	-9,95 <u>ab</u>	-6,93 <u>a</u>	-8,44 a	0,40 <u>a</u>	0,27 <u>b</u>	0,34	a
S. 3%	-10,32 <u>ab</u>	-10,19 <u>ab</u>	-10,25 a	0,29 <u>b</u>	0,16 <u>c</u>	0,23	b
S. 4,5%	-11,05 <u>b</u>	-8,14 <u>ab</u>	-9,59 a	0,30 <u>b</u>	0,27 <u>b</u>	0,28	b
T. Amostra (n)	30			30			

Continua...

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não-sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os tratamentos ($V_0S_{1,5\%}$; $V_0S_{3\%}$; $V_0S_{4,5\%}$; $V_1S_{1,5\%}$; $V_1S_{3\%}$ e $V_1S_{4,5\%}$) não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

A condutância estomática apresentou interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores ventilação e teor de sacarose. É sabido que a presença de sacarose no meio promove uma diminuição no potencial hídrico. Tal diminuição poderá promover uma maior limitação na absorção de água, podendo, assim, promover um pequeno déficit hídrico nas plantas cultivadas nos meios com maiores concentrações de sacarose. Entretanto, a abertura de estômato foi inferior no teor intermediário de sacarose (3%) e na combinação deste com a presença da ventilação. A redução na transpiração nas folhas das plantas micropropagadas nestes meios poderá ser explicada pelas reduzidas condutâncias estomáticas nas folhas das plântulas cultivadas.

Apesar de Desjardins et al. (1995) citarem que maiores concentrações de sacarose no meio de cultivo podem elevar a taxa respiratória de plantas micropropagadas, por meio de uma maior disponibilidade de substrato metabólico. No quadro 7, foi observado que as concentrações de sacarose adotadas no meio de cultivo promoveram uma liberação similar de CO_2 nas condições fluxo de fótons fotossintéticos ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estes resultados também mostraram que, nas condições em que foi realizado este presente trabalho, as plantas micropropagadas não apresentaram assimilação fotossintética quando estas foram submetidas a $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Como estas plântulas de cana-de-açúcar foram micropropagadas em $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em todo o período de cultivo (30 dias), tais plantas apresentaram o comportamento heterotrófico.

Quadro 7 - continuação.

Médias ^{1/}	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)			DPV (kpa)		
	Ventilação (V)		S.	Ventilação (V)		S.
	V0	V1		V0	V1	
Sacarose (S.)	10,68 a	8,80 b		3,78 a	3,87 a	
S. 1,5%	12,46 <u>a</u>	9,64 <u>ab</u>	11,05 A	3,73 <u>b</u>	3,78 <u>ab</u>	3,75 b
S. 3%	9,40 <u>b</u>	7,30 <u>b</u>	8,35 Ab	3,83 <u>ab</u>	3,94 <u>a</u>	3,89 a
S. 4,5%	10,18 <u>a</u>	9,46 <u>b</u>	9,82 B	3,78 <u>ab</u>	3,90 <u>ab</u>	3,84 ab
T. Amostra (n)	30			30		

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não-sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhada entre os tratamentos (V₀S_{1,5%}; V₀S_{3%}; V₀S_{4,5%}; V₁S_{1,5%}; V₁S_{3%} e V₁S_{4,5%}) não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05).

Segundo Langford e Wainwright (1987), a sacarose pode inibir a assimilação fotossintética do carbono por meio de uma “down-regulation” da enzima rubisco. Segundo Desjardins et al. (1995), uma outra forma de inibição da enzima rubisco seria a inibição do tipo “feedback”. Segundo este autor, a presença da sacarose causa uma menor atividade desta enzima. Em adição, Capelades et al. (1990) relatam que a elevada concentração de sacarose no meio de cultivo pode inibir as reações da fase bioquímica da fotossíntese. Tais informações podem explicar a ausência da assimilação fotossintética do carbono nas plantas de cana-de-açúcar micropropagadas nas três concentrações de sacarose no meio de cultivo.

A ventilação nos frascos de cultivo promoveu menor taxa de liberação de CO₂ pelas folhas das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, quando estas folhas foram submetidas a 300 μmol m⁻² s⁻¹ de FFF (Quadro 7). Esta menor liberação de CO₂ poderá estar associada a uma menor condutância estomática verificada nas folhas das plantas crescidas nestas condições em que se promoveram as trocas gasosas nos frascos.

Quadro 8 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V0 e V1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da taxa de perda de água (TPA) da folha (média de

seis observações sucessivas a cada trinta minutos), da fluorescência inicial (F_0), do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) e da área proporcional à quantidade de aceptores localizados na parte redutora do PSII (ÁREA). Características avaliadas em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Médias ^{1/}	TPA			F_0		
	Ventilação (V)		S.	Ventilação (V)		S.
	V0	V1		V0	V1	
Sacarose (S.)	54% a	31% b	S.	511 b	564 a	S.
S. 1,5%	60% <u>a</u>	33% <u>c</u>	46% a	491,1 <u>d</u>	545,3 <u>b</u>	518 b
S. 3%	47% <u>b</u>	33% <u>c</u>	40% b	513,3 <u>cd</u>	549,3 <u>b</u>	531 b
S. 4,5%	55% <u>a</u>	28% <u>c</u>	41% b	528,5 <u>bc</u>	598,9 <u>a</u>	564 a
T. Amostra (n)	288			48		

Continua...

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não-sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os tratamentos ($V_0S_{1,5\%}$; $V_0S_{3\%}$; $V_0S_{4,5\%}$; $V_1S_{1,5\%}$; $V_1S_{3\%}$ e $V_1S_{4,5\%}$) não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

O déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar não apresentaram valores com diferenças significativas entre os tratamentos (Quadro 7). Este resultado pode mostrar que não foram verificadas diferenças entre as temperaturas das folhas entre todos os tratamentos avaliados, uma vez que a temperatura influencia significativamente na pressão de vapor de saturação dentro da folha.

Quadro 8 - continuação.

Médias ^{1/}	F_v/F_m			ÁREA		
	Ventilação (V)		S.	Ventilação (V)		S.
	V0	V1		V0	V1	
Sacarose (S.)	0,76 a	0,77 a	S.	26225 a	23679 a	S.
S. 1,5%	0,76 <u>a</u>	0,77 <u>a</u>	0,77 a	24213 <u>a</u>	23400 <u>a</u>	23806 a
S. 3%	0,76 <u>a</u>	0,78 <u>a</u>	0,77 a	26538 <u>a</u>	24788 <u>a</u>	25663 a
S. 4,5%	0,76 <u>a</u>	0,76 <u>a</u>	0,76 a	27925 <u>a</u>	22850 <u>a</u>	25388 a
T. Amostra (n)	48			48		

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não-sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhadas entre os tratamentos ($V_0S_{1,5\%}$; $V_0S_{3\%}$; $V_0S_{4,5\%}$; $V_1S_{1,5\%}$; $V_1S_{3\%}$ e $V_1S_{4,5\%}$) não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos no quadro 7 e relacionados à condutância estomática e à transpiração, esses resultados mostraram que as plântulas cultivadas em frascos fechados podem exigir maiores cuidados durante a retirada destas dos frascos para o ambiente externo, uma vez que estas podem ter maior facilidade em perder água. De fato, ao se analisar o quadro 8 e a figura 3, pode-se verificar que as plantas micropropagadas nos frascos em que se permitiram as trocas gasosas apresentaram uma menor taxa de perda de água. Esta resposta pode estar relacionada com a menor condutância estomática e menor transpiração determinada nas folhas dos explantes de cana-de-açúcar (Quadro7). Segundo Jeong et al. (1995), a micropropagação de plantas em sistemas em que não se permitem as trocas gasosas (geralmente com umidade relativa em torno de 90 a 100%) pode produzir plantas superídricas (vitrificadas). Tais plantas apresentam reduzida formação de cera cuticular e epicuticular (Fuchigami et al.; 1981), não apresentam controle na abertura estomática e na perda de água (Brainerd et al., 1981; Reuther 1988). Reuther (1988) comparou a anatomia de plantas cultivadas em frascos fechados com plantas cultivadas em casa-de-vegetação. Neste trabalho, Reuther (1988) observou que, quando as plantas micropropagadas em sistema fechado foram cultivadas em condição *ex vitro*, foi verificada uma substancial perda de água seguida de uma intensa desidratação. Segundo o autor, tal perda elevada de água foi devido à falta de cera e a um ineficiente controle estomático. Com base nestas informações, as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas em frascos fechados podem ter tido uma alteração na anatomia, o que pode justificar os resultados obtidos. Obviamente, durante a transferência para o ambiente *ex vitro*, maior atenção relacionada às relações hídricas deve ser dada a essas plântulas.

Os tratamentos em que se utilizou a menor concentração (1,5%) de sacarose no meio de cultivo apresentaram uma taxa de perda de água (TPA) superior comparado com os de 3% e 4,5% (Quadro 8). Possivelmente, a presença

em maiores concentrações deste composto osmoticamente ativo no meio pode ter contribuído para uma pequena rusticidade *in vitro* dos explantes, uma vez que a sacarose contribui para a redução do potencial osmótico do meio de cultivo (Williams, 1995).

A ventilação nos frascos de cultivo influenciou a variável da fluorescência F_0 da fluorescência versus o tempo (Quadro 8). Segundo Havaux et al., (1998), a elevação nos valores de F_0 está relacionada à dissociação física entre os centros de reação do fotossistema II (PSII) e os complexos de coleta de luz no sistema antena do PSII. Este fato pode mostrar que, em relação às plântulas cultivadas no frasco fechado, as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas no frasco ventilado apresentaram um comprometimento na estrutura física do PSII. Esta modificação poderia estar relacionada a um pequeno estresse causado pela movimentação de ar no interior dos frascos.

Entretanto, esta alteração não causou modificação no rendimento quântico máximo do PSII avaliado pela relação F_v/F_m (Quadro 8). A concentração de sacarose não influenciou nas variáveis F_v/F_m e a área sobre a curva entre F_0 até F_m (Quadro 8). Aitken–Christie et al. (1992) obtiveram os mesmos resultados relacionados à relação F_v/F_m com *Pinus radiata* cultivado *in vitro*. Entretanto, Hdider e Desjardins (1994) mostraram que, em relação às plantas de morango cultivado na concentração de 0% e 1% de sacarose, as plantas micropropagadas na concentração de 3% e 5% apresentaram o valor do rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) menor. Resultados semelhantes aos encontrados por Hdider e Desjardins (1994) foram encontrados por Capelades et al. (1990).

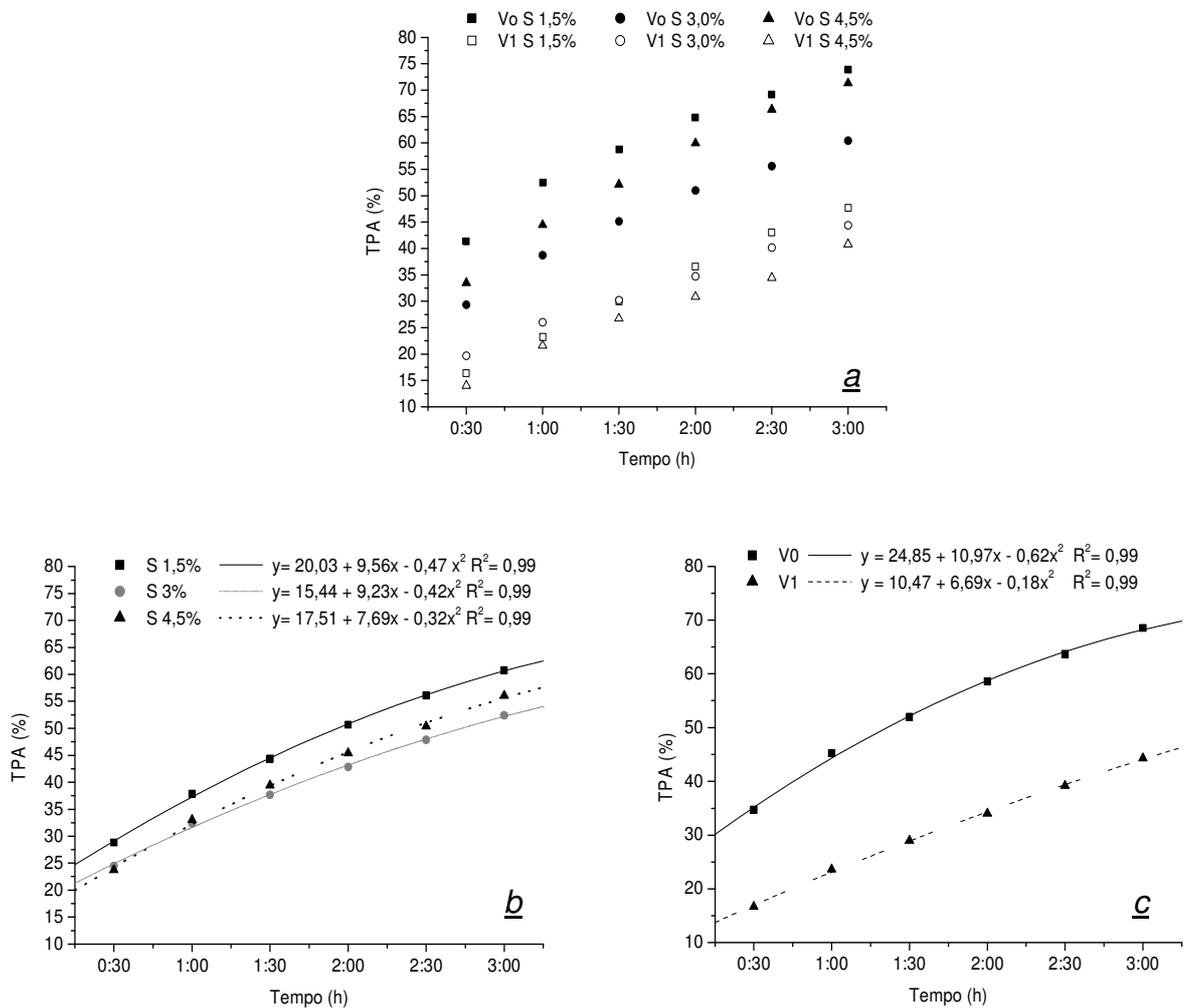


Figura 3 - Taxa de perda de água (TPA) aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas de cana-de-açúcar em três níveis (1,5%; 3% e 4,5%) de sacarose adicionada ao meio e aos dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1) (n= 288). Valores médios das combinações (tratamentos) (a); valores médios e regressão dos níveis de sacarose (b) e valores médios e regressão dos níveis de ventilação (c) (p < 0,05).

Estes últimos autores relataram que as reduções na relação F_v/F_m nas plantas micropropagadas em altas concentrações de sacarose estariam relacionadas a

uma possível inibição das reações bioquímicas da fotossíntese proporcionadas pelo acúmulo de amido no cloroplasto.

Com relação à variável F_0 , a maior concentração de sacarose (4,5%) no meio de cultivo promoveu a elevação nos valores desta variável, o que mostra efeito desta concentração sobre a estrutura do PSII (Quadro 8).

O quadro 9 mostra, pelas médias, que não ocorreu liberação positiva de oxigênio. Entretanto, nas figuras 4; 5 e 6, ao analisarem as médias entre os níveis de FFF (0 a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), observa-se que as folhas das plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas no meio com menor concentração de sacarose (1,5%) apresentaram uma liberação positiva do gás em valores acima de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF. A concentração de 3% de sacarose a partir de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF também apresentou liberação positiva. A concentração de 4,5% não houve liberação de oxigênio, mas sim um consumo deste gás pelas folhas das plântulas (respiração). Tal consumo de oxigênio mostrou que, na concentração de 1,5% de sacarose, até o FFF de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não houve quantidade de luz suficiente no fotossistema II para que o processo fotoquímico no lado do PSII acontecesse, uma vez que, no quadro 8, é mostrado que o PSII estava com estrutura e atividade suficientes. Nos demais tratamentos (3% e 4,5% de sacarose), as folhas das plântulas micropropagadas apresentaram apenas respiração em $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF. Estes resultados mostraram que, nas condições em que as folhas das plântulas de cana-de-açúcar foram formadas (FFF de $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e na concentração de 1,5% de sacarose, a quantidade de luz em que se tem uma baixa fotossíntese potencial ($\pm 3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) está num FFF em torno de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A metodologia da determinação da fotossíntese potencial (Delieu e Walber, 1983) preconiza que, durante as medidas, a câmara do equipamento seja saturada com $5000 \mu\text{L L}^{-1}$ (5%). Ou seja, nestas condições, não há limitação de CO_2 , e a rubisco, quando funcional, apresenta apenas atividade carboxilase. Uma vez que o fotossistema II das plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas estava com o PSII com boa estrutura e atividade (relação F_v/F_m acima de 0,75) (Quadro 8), a reduzida fotossíntese potencial das plântulas cultivadas na concentração de 1,5% de sacarose e a ausência desta fotossíntese nas plântulas micropropagadas nas concentrações de 3% e 4,5% de sacarose, pode ser devido

à inatividade da rubisco e/ou outras enzimas do Ciclo de Calvin, causada pela elevada concentração de sacarose e a reduzida atividade das enzimas envolvidas na fase bioquímica da fotossíntese nas plântulas cultivadas na concentração de 1,5%. Resultados semelhantes sobre o efeito da concentração da sacarose no meio de cultivo na fotossíntese potencial foram encontrados por Hider e Desjardins (1994). Estes autores verificaram uma redução em torno de 50% na fotossíntese potencial máxima quando a concentração de sacarose passou de 0% para 5%. Estes autores relataram\ que a elevada concentração de sacarose no meio poderia ter promovido uma maior concentração de amido no cloroplasto (Capellades et al., 1991) e, ainda, os carboidratos, em elevada concentração, poderiam ter comprometido a regeneração da ribulose 1,5 bisfosfato (Azcòn-Bieto, 1986).

Quadro 9 - Estimativa das médias dos níveis do fator ventilação (V0 e V1) e sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) e das seis respectivas combinações (tratamentos) da liberação de O₂ (A_{Pot.}; Fotossíntese Potencial). Característica avaliada em meio com plântulas de cana-de-açúcar aos trinta dias de cultivo *in vitro*.

Médias ^{1/}	A _{Pot.} (μmol de O ₂ m ⁻² s ⁻¹)		
	Ventilação (V)		S.
	V0	V1	
Sacarose (S.)	-3,26 <u>b</u>	-1,04 <u>a</u>	
S. 1,5%	-1,50 <u>b</u>	1,43 <u>a</u>	-0,03 <u>a</u>
S. 3%	-3,17 <u>c</u>	-2,42 <u>bc</u>	-2,62 <u>b</u>
S. 4,5%	-5,13 <u>c</u>	-2,27 <u>b</u>	-3,80 <u>c</u>
T. Amostra (n)	180		

^{1/}As médias seguidas da mesma letra não-sublinhada entre os níveis de cada fator (V e S) e as médias seguidas pela mesma letra sublinhada entre os tratamentos (V₀S_{1,5%}; V₀S_{3%}; V₀S_{4,5%}; V₁S_{1,5%}; V₁S_{3%} e V₁S_{4,5%}) não diferem estatisticamente entre si (p < 0,05).

Os valores acima de 300 até 750 μmol m⁻² s⁻¹ promoveram uma pequena liberação de oxigênio nas folhas das plântulas micropropagadas nos frascos ventilados. Este fato mostra que as trocas gasosas nos frascos de cultivo

propiciaram uma otimização da fotossíntese potencial. Uma vez que as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas nos frascos ventilados apresentaram uma maior intensidade de cor verde, e esta coloração está relacionada com maior teor de clorofilas totais (Torres Netto et al, 2005). Esta pequena fotossíntese potencial pode ser explicada pelo incremento no teor de clorofilas, confirmado pelo índice SPAD (quadro 5), que também foi superior em frascos ventilados.

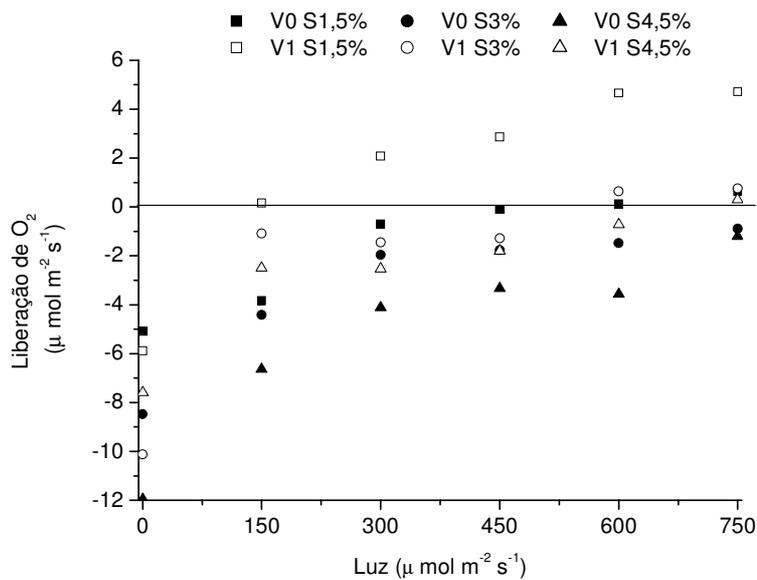


Figura 4 - Liberação de oxigênio aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar com três níveis de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) adicionada ao meio nos dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1) (n= 180).

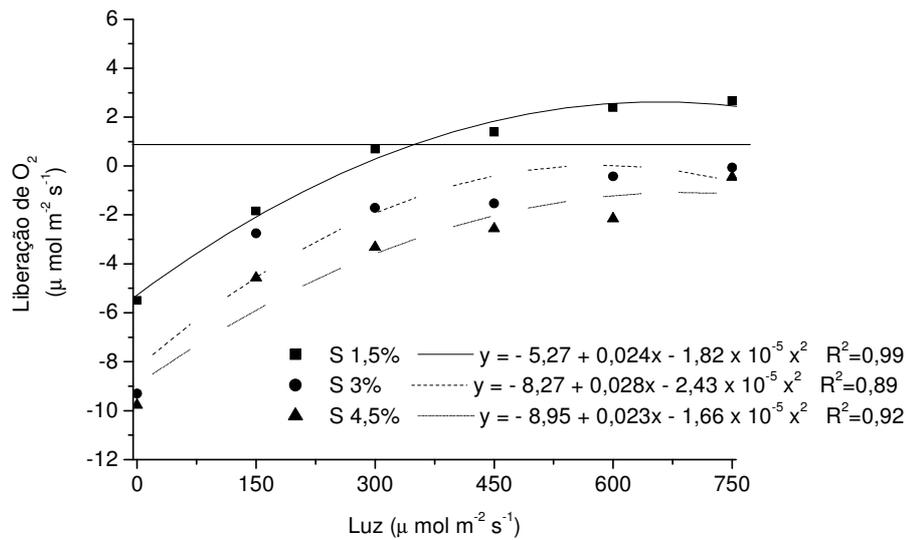


Figura 5 - Liberação de oxigênio aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar em três níveis de sacarose (1,5%; 3% e 4,5%) adicionada ao meio (n= 180).

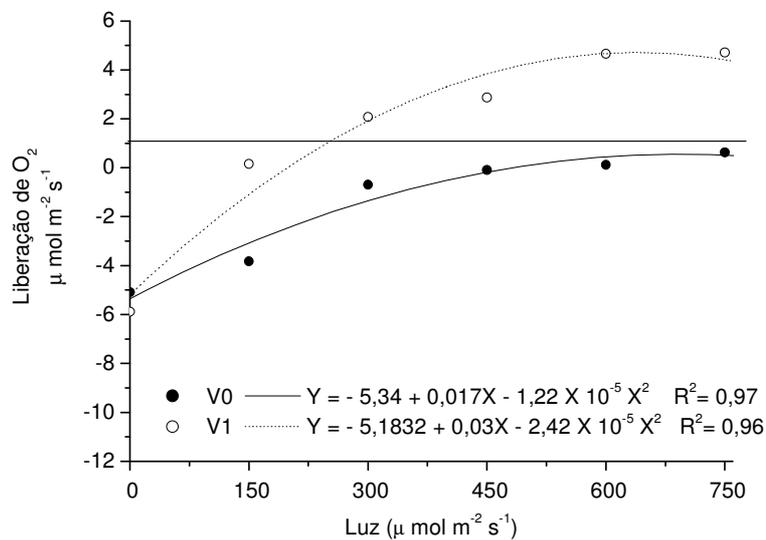


Figura 6 - Liberação de oxigênio aos 30 dias do cultivo *in vitro* de plântulas cana-de-açúcar em dois níveis do ambiente de cultivo, o frasco fechado (V0) e o com ventilação forçada (V1) (n= 180).

5. CONCLUSÕES

Neste experimento, nas condições em que foram micropropagadas as plântulas de cana-de-açúcar, foi verificado que, em todos os tratamentos estudados, tais plântulas não apresentaram competência fotossintética em FFF de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando avaliadas pela assimilação de CO_2 . A não-assimilação fotossintética do carbono estaria associada a comprometimentos na fase bioquímica da fotossíntese, causados pela presença da sacarose no meio, uma vez que as plântulas apresentaram significativas estrutura e atividade do PSII.

O complexo de liberação de oxigênio (CLO), representado pela fotossíntese potencial, apresentou atividade nas plântulas micropropagadas na concentração de sacarose de 1,5%, em fluxo de fótons fotossintéticos entre 300 e $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esta atividade do CLO também ocorreu nas folhas das plântulas cultivadas em frascos ventilados, em FFF acima de $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A intensidade de luz utilizada nas condições de cultivo (FFF igual a $135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não foi suficiente para estimular o metabolismo autotrófico, quando se tentou substituir a fonte de carbono via sacarose pela fonte de carbono via CO_2 ($370 \mu\text{L L}^{-1}$).

Nesta espécie, a ventilação nos frascos de cultivo com a presença de sacarose promoveu maior ganho de biomassa. Tal ganho pode estar associado à eliminação do etileno e de outros gases tóxicos, bem como pode ter evitado a depleção do oxigênio no interior dos frascos. Tal ventilação permitiu menor taxa

de perda de água, proporcionada pela menor condutância estomática e maior intensidade de cor verde nas folhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeles, F.B., Morganb, P.W., Saltveit Jr., M.E. (1992) *Ethylene in Plant Biology*. 2. ed. California, USA: Academic Press, 414p.
- Aitken–Christie, J., Davies, H.E., Holland, L. (1992) Effect of nutrient media composition on sugar-free growth and chlorophyll fluorescence of *Pinus radiata* shoots *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 319:125-130.
- Anna, W., Young, C. C., An, W. e Cy, C. (1999) Effect of photosynthetic foton flux density and sacarose on the photoautotrophy of rose explantes *in vitro*. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*. 45(4):345-352.
- Azcon-Bieto, J. (1986) The control of photosynthetic gas exchange by assimilate accumulation in whiat. *In: Marcelle, R., Chysters, H., Van Pouke, M. (eds.) Biological Control of Photosynthesis*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publischus, p. 231-240.
- Barrueto Cid, L.P. (2001) A propagação *in vitro* de plantas. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*. 3(19):16-21.
- Bauerle, W.L., Weston, D.J., Bowdena, J.D., Dudley, J.B. and Toler, J.E. (2004) Leaf absorptance of photosynthetically active radiation in relation to chlorophyll meter estimates among woody plant species. *Scientia Horticulturae*. 101:169-178.
- Bolhar-Nordenkampf, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic

- competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*. 3:497-514.
- Brainerd, K.E. & Fuchigami, L.H. (1981) Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:515-518.
- Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C. And Debergh, P. (1990) Environment influences anatomy of stomata and epidermical cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:141-145.
- Capellades, M., Lemeur, R. E Derbergh, P. (1991) Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in rosa cultured *in vitro*. *Plant cell tissue organ Cult.* 25:21-26.
- Cassells, A.C. E Walsh, C. (1994) The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in dianthus microplants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37:171-178.
- Catsky, J. E Solarová, J. (1992) Photosynthesis under conditions of *in vitro* culture. *Biol. Plantarum.* 34:502-503.
- Chamovitz, D. A., Deng, X-W. (1996) Light signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Science.* 15:455-478.
- Chang, S.X., Robison, D.J. (2003) Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *Forest Ecology and Management.* 6215:1-8.
- Clements, H.F. (1980) *Sugarcane crop logging and control: principles and practices*. London: Pitman Publishing, Honolulu. The University Press of Hawaii, 520p.
- Cui, Y., Hahn, E., Kozai, T., Paek, K., Cui, Y, Hahn, E. J., Paek, K. (2000) Number of air exchanges, saccharose concentration, photosynthetic fóton flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantas *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 62(3):219-226.
- Delieu, T.J. E Walker, D.A. (1983) Simultaneous measurement of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence from leaf pieces. *Plant Physiology.* 73:534-541.
- Deng, R. E Donnelly, D.J. (1983) *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Can. J. Plant Sci.* 73:1105-1113.

- Desjardins, Y., Hdider, C., Riek, J. (1995) Carbon nutrition *in vitro*: regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. *In: Akten-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.L. (eds.) Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, A.A. Dordrecht, The Netherlands, p. 441-471.
- Donnelly, D.J. E Vidaver, W.E. (1984) Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:177-181.
- Dubé, S.L. E Vidaver, W. (1992) Photosynthetic competence of plantlets grow *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physiol. Plant.* 84:409-416.
- Eliasson, M.K., Beyl, C.A., Barker, P. (1994) *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with paclobutrazol. *J. Plant Growth Regulation.* 13:137-142.
- Fuchigami, L.H., Cheng, T.Y., Soeldner, A. (1981) Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:519-522.
- Fujiwara, K., Kozai, T. Watanabe, I. (1987) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue culture plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *J. Agr. Met.*, 43:21-31.
- Genoud, C., Coudret, A., Amalric, C., Sallanon, H. (1999) Effects of micropropagation conditions of rose shootlets on chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica.* 36(1-2):243-251.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. (1998) Micropropagação. *In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (org) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, v.1, p.183-260.
- Grattapaglia, D. E Machado, M.A. (1990) Micropropagação. *In: Torres, A.C. & Caldas, L.S. (org). Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília, Embrapa, p.99-169.
- Haag, H.P., Arzolla, S., Mello, F.A.F., Brasil Sobrinho, M.O.C., Oliveira, E.R., Malavolta, E. (1963) Estudos sobre a alimentação mineral do abacaxi (*Ananas sativus*) Sch. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, Piracicaba: v.20, p.33-40.
- Hahn, E., Paek, K., Hahn, E., Paek, K. (2001) High photosynthetic foton flux and high CO₂ concentration under increased number of air exchanges promote

- growth and photosynthesis of four kinds of orchid plantlets *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 37(5):678-682.
- Havaux, M., Erne, M., Lannoye, R. (1998) Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence. *J. Plant. Physiol.* 133:555-560.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36:27-33.
- Hendre, R.R. (1983) Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. *Sugarcane*. 1:5-8.
- Hendry, G.A.F., Price, A.H. (1993) Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. *In: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (eds). Methods in comparative plant ecology*. London: Chapman e Hall, p.148-152.
- Jeong, B.R., Fujiwara, K., Kozai, T. (1995) Environmental Control and Photoautotrophic Micropropagation. *In: Kozai, T., Kitaya, Y., Keibotr, C. (eds.) Collected papers on Environmental Control in Micro propagation*. Japan, p. 826-873.
- Kadlecek, P., Tichá, I., Haisel, D., Capková, V., Schafer, C. (2001) Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science*. 161:695-701.
- Kodym, A. e Arias, F.J. Z., (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 55:141-145.
- Kozai, T. e Iwanami (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 57:279-288.
- Kozai, T., Ohde, N., Kubota, C. (1991) Similarity of growth patterns between plantlets and seedlings of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. *Plant cell Tiss. Org. Cult.* 24:181-186.
- Kozai, T. (1999) Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In: Deberg, P.C. & Zimmerman, R.H. (eds.) Micropropagation technology and application*. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers, p. 447-469

- Krause, G.H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.42, p. 313-349.
- La Rosa, P.C., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1984) Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiol. Plant.* 61:279-286.
- Langford, P.J. & Wainwright, S. (1987) Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.* 60:633-640.
- Lee, T.S.G. (1988) Produção de mudas sadias de cana-de-açúcar através da técnica de cultura de tecidos. *Álcool e Açúcar*. 45:20-29.
- Lee, N., Wezstein, N.H.Y., Sommer, H.E. (1995) Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*. 78:637-641.
- Magdalita, P.M., Godwin, I.D., Drew, R.A., Ad Kinis, S.W. (1997) Effect of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. *Plant Cell. Tissue and Culture*. 49:93-100.
- Marks, T.R., Simpson, S.E. (1999) Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth and Regulation*. 28(2):133-142.
- Matthys, D., Gielis, I, Debergh, P. (1995) Ethylene. In: Akten–Christie, J., Kozai, T., Smith, M.L. C. (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 473-491.
- Michalczuk, B., Michalczuk, L. (2000) The effect of light quality on regeneration rate and plantlet development in transgenic petunia 'revolution' (*Surfinia* type). *Acta Horticultural*. 530:397-401.
- Miocque, J. (1999) Multiplicação por cultura de meristema. *Açúcar e Álcool e Subprodutos*. STAB, 17:30-32.
- Mohammed, G. H., Binder, W. D., And Gillies, S. L. (1995) Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. For. Res.* 10:383-410.
- Murashige, T., Skoog F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.

- Noè, N., Eccher, T., Bonini, L. (1997) Effect of irradiance and spectral composition of radiation on *in vitro* shoot proliferation in *Malus domestica* Borkh. *Biologia Plantarum*. 39:491-497.
- Pasqual, M. (2001) *Cultura de Tecidos Vegetais*. Textos acadêmicos, Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu": Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 97p.
- Pospisilová, J., Solarová, Gatsky, J. (1992) Photosynthetic responses to stress during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*, 26:3-18.
- Preece, J.E., Sutter, E. (1991) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P. Zimmerman, R. (eds.) *Micropropagation: Technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 71-94.
- Pyke, K., López-Juez, E. (1999) Cellular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 18(4):527-546.
- Radochova, B., Vicankova, A., Kutik, J., Ticha, I. (2000) Leaf structure of tobacco *in vitro* grown plantlets as affected by sucrose and irradiance. *Biologia Plantarum*. 43(4):633-636.
- Rasai, S., Kantharajah, A.S., Dodd, W.A. (1994) The effect of growth-regulators, source of explants and irradiance on *in vitro* regeneration of atemoya. *Australian Journal of Botany*. 42(3):333-340.
- Reuther, G. (1988) Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. *Act Horticulture*. 226:91-98.
- Sampaio, E. V. S. B., Salcedo, I. H., Silva, V. M., Alves, G. D. (1995) Capacidade de suprimento de nitrogênio e resposta à fertilização de vinte solos de Pernambuco. Campinas, *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 19:269-279.
- Schreiber, H.A. (1998) Irrigation and nitrogen effects on sweet corn row number at various growth stages. *Soil Science*. 135(1):135-136.
- Souza, A.S. (1995) *Efeitos da sacarose e do fotoperíodo na propagação in vitro da cv. ebano de amora-preta e dos porta-enxertos de macieira "MM.111" e pereira Pyrus calleryana Deene*. Tese (Dissertação de Mestrado) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 36p.

- Strasser, R.J., Tsimilli- Michael, M., Srivastava, A. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *In: Yunus, M., Pather, U., Mohanly P. (eds.) Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation.* Taylor and Francis, London, p. 445-483.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Teixeira, S.L. (2001) *Cultura de tecidos Vegetais*. Notas de aula: Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, 53p.
- Torres, A.C., Teixeira, S.L., Pozzer, L. (1998) Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. *In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. (org) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* EMBRAPA: v. 1, p. 133-145.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G. de, Yamanishi, O. K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 14(3):203-210.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., de Oliveira, J.G. and Smith, R.E.B. (2005) Relationship between photosynthetic pigments, nitrogen and chlorophyll a fluorescence and the SPAD-502 in coffee. *Scientia Horticulturae*.104:199-209.
- ÚNICA (2007) - Parâmetros de produção. <http://www.portalunica.com.br> em julho de 2007 pagina mantida pela União da Indústria de Cana-de-açúcar – ÚNICA, São Paulo - Brasil, Cep. 01452 000.
- Veiga, C.F.M. (2006) *Diagnostico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro: relatórios de pesquisa*. Rio de Janeiro: FAERJ, SEBRAE-RJ, 107p.
- Veiga, C.F.M. (1997) *Cultura de tecidos em cana-de-açúcar*. Apostila de curso de aperfeiçoamento em cana-de-açúcar: Campos dos Goytacazes – RJ, UFRRJ, p. 100-109.
- Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Neskovic, M. (2001) Effect of irradiance, sugars and nitrogen on leaf size of *in vitro* grown *Ceratoria siliqua* L. *Biologia Plantarum*. 44(2):185-188.

- Wetzstein, H. e Sommer, H.E. (1982) Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (hamamelidaceae) during acclimatization. *Amer. J. Bot.*. 69:1579-1586.
- Williams, R.R. (1995) The chemical microeuviroment. *In: Akten–Christie, J., Kozai, T., Smith, M.L. (eds.) Automation and environmental control in plant tissue culture.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 405-439.
- Ziv, M., Schwartz, A., Fleminger, D. (1987) Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Sianthus caryopphyllus*) plants propagated *in vitro*: implications for hardening. *Plant. Sci.*. 52:127-134.
- Ziv, M. (1995) *In vitro* aclimatization. *In: Aitken-Christie, J., kozai, T., Smiith, M.L.A. (eds.) Automation and environmental control in plant tissue culture.* Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 493-516.