RONISCLEY PEREIRA SANTOS

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DE VIDEIRAS CULTIVADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES *IN VITRO*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

RONISCLEY PEREIRA SANTOS

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DE VIDEIRAS CULTIVADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES *IN VITRO*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 20 de julho de 2007

Profª. Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)

Prof. Marco Antonio Oliva Cano
(Co-orientador)

Dr. Rogério Ferreira Ribas

Prof. Ricardo Motta Miranda

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

À toda minha família querida, pelo incentivo e confiança durante todos esses anos.

À minha mãe Alexandrina e ao meu pai José (*in memoriam*), pelo carinho, apoio e compreensão da ausência em determinados momentos. Em especial ao meu irmão Raimundo pelo incentivo e apoio em toda a minha vida estudantil.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo a todos os momentos e por sua infinita bondade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), Departamentos de Biologia Vegetal e de Fitotecnia pelo apoio e infra-estrutura disponibilizada.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pela orientação, atenção e amizade.

Aos Professores Marco Antonio Oliva Cano e Luzimar Campos da Silva, pela participação valiosa no trabalho realizado.

Aos Professores desta instituição de ensino, pela atenção recebida e pela participação em minha formação acadêmica.

A todos os colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela ajuda.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal.

Ao Professor Sérgio Motoike e funcionários do Setor de Fruticultura da UFV, pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV-BIOAGRO), em especial à Lourdes Iarema e Ana Cláudia Ferreira da Cruz, pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos Alan Carlos, Eduardo Gusmão e Kacilda Naomi e aos demais colegas da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP).

Aos meus amigos e irmãos “PIRIGOSO” Claudinei, Edson e Maurel, pelo convívio, amizade, pelas conversas enriquecedoras e descontraídas e pelo apoio recebido.

A todos os colegas da Pós-Graduação, pela amizade e pelos momentos compartilhados.

BIOGRAFIA

RONISCLEY PEREIRA SANTOS, filho de José Barbosa dos Santos (*in memoriam*) e Alexandrina Pereira da Silva Santos, nasceu no dia 25 de Junho de 1977, na cidade de Santa Izabel do Pará.

Em dezembro de 1998, concluiu o curso de Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Castanhal-PA.

Em dezembro de 1999, concluiu o curso Pós-técnico com especialização em Zootecnia e o curso de Técnico em Meio Ambiente pela Escola Agrotécnica Federal de Santa Teresa-ES.

Em março de 2001, ingressou no Curso de Licenciatura em Ciências Agrícolas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), graduando-se em junho de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Prof. Wagner Campos Otoni.

CONTEÚDO

	Pág.
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1	
EFEITO DE VEDAÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO DE *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* CULTIVADA *in vitro*	
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Material experimental e condições de crescimento	8
2.2. Montagem do experimento	8
2.3. Características avaliadas	9
2.4. Mensuração da área foliar, comprimentos e massas secas	8

2.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 39
2.5. Comprimento da parte aérea e radicular, massas frescas e secas 39
2.6. Pigmentos foliares 40
2.7. Mensuração de etileno acumulado 40
2.8. Delineamento experimental 40
3. RESULATDOS E DISCUSSÃO 41
3.1. Produção e acúmulo de etileno..... 41
3.2. Características morfofisiológicas 44
3.2.1. Parâmetros de crescimento 44
3.2.2. Pigmentos foliares 52
3.3. Análises estruturais 55
3.3.1. Morfometria..... 55
3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 61
4. CONCLUSÕES..... 65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 66

CAPÍTULO 3.....
COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO DE *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* NORMAIS E HIPERÍDRICAS SOB NÍVEIS DE IRRADIÂNCIA *in vitro*
1. INTRODUÇÃO..... 72
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 73
2.1. Material experimental e condições de crescimento 75
2.2. Implantação do experimento..... 75
2.3. Características avaliadas..... 76
2.4. Comprimentos e massa seca total..... 76
2.5. Análises morfométricas..... 77
2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 77
2.7. Pigmentos foliares 78
2.8. Fluorescência da clorofila 78
2.9. Delineamento experimental 78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 79
3.1. Características morfométricas 79

3.1.1. Parâmetros de crescimento 79
3.2. Pigmentos foliares 84
3.3. Análises estruturais..... 91
3.3.1. Morfometria..... 91
3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 98
3.4. Fluorescência da clorofila 103
4. CONCLUSÕES..... 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 109

RESUMO

SANTOS, Roniscley Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2007. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro*.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Eny Iochevet Segal Floh, Luzimar Campos da Silva e Marco Antonio Oliva Cano.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento morfofisiológico de dois porta-enxertos de videiras, *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* 'VR 043-43' e *Vitis riparia*, quando cultivadas sob condições de estresse *in vitro*, para isso foram realizados três espxperimentos distintos. No primeiro foi avaliado o efeito de quatro tipos de vedações: 1) filme plástico de PVC transparente; 2) tampa rígida de polipropileno autoclavável sem orifício (TN); 3) tampa rígida de polipropileno com um (TMF1) ou dois (TMF2) orifícios de 10 mm, cobertos por membranas de 0,22 μm de poro, permeáveis às trocas gasosas, associadas à concentrações de sacarose (0; 10; 20 e 30 $g.L^{-1}$), em experimento fatorial 4 x 4, em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as características número de folhas, área foliar (mm^2), comprimento da parte aérea das plantas (cm), comprimento do sistema radicular (cm), teores de clorofila *a, b,* totais e de carotenóides, volume final do meio de cultivo (mL) e massa seca das plantas (g). No segundo experimento foi estudado o efeito do etileno sobre o comportamento morfofisiológico dessas videiras pela adição do promotor (ACC) ou do inibidor (STS) de etileno no meio de cultivo ($^1/_2$MS; $^1/_2$MS + 10 μM de STS e $^1/_2$MS + 3 μM de ACC). Para tal, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas, número de entrenó, área foliar, comprimento da parte aérea, comprimento do sistema radicular, massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz, porcentagem de investimento em massa para a parte aérea e raiz, determinação de clorofilas *a, b*, totais e carotenóides, mensuração de etileno acumulado (aos 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49 e 56 dias após inoculação dos explantes - DAI), massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, análises anatômicas

irradiâncias e dois meios de cultivo, com objetivo de valiar o comportamento de plantas hiperídricas e plantas normais de videiras em distintas irradiâncias. A interação entre as concentrações de sacarose até 20 $g.L^{-1}$ e as vedações TMF1 e TMF2, permeáveis às trocas gasosas, infuenciou positivamente nos parâmetros fisiológicos de crescimento das plantas propagadas *in vitro*, conferindo-as características favoráveis à aclimatização *ex vitro*. O conteúdo de clorofilas totais, número de folhas, área foliar, comprimento da parte aérea, massas frescas e secas foram significativamente reduzidos quando ambas as cultivares foram desenvolvidas em meio de cultivo contendo ACC, assim como aumento na altura das estruturas anatômicas das folhas e deformações nos estômatos. Plantas induzidas à hiperidricidade apresentaram características morfofisiológicas alteradas em relação às normais, sendo que elevados níveis de irradiâncias induziram alterações em ambas as plantas. Níveis elevados de irradiância favorecem a fotoinibição em videiras cultivadas *in vitro*.

ABSTRACT

SANTOS, Roniscley Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2007. **Morphophysiological behavior of cultured grapevine plants as affected by *in vitro* stress conditions**. Adviser**:** Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Eny Iochevet Segal Floh, Luzimar Campos da Silva and Marco Antonio Oliva Cano.

The present work aimed to study the morphophysiological behavior of two grapevine rootstocks *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* 'VR 043-43' and *Vitis riparia*, as affected by different stressful conditions. Initially, four types of flask sealing were tested: 1) transparent PVC plastic film; 2) rigid polypropylene closure (TN); 3) rigid polypropylene closure with one (TMF1) or two (TMF2) 10 mm holes, covered with 0.22 μm pore membranes, associated to sucrose concentrations (0; 10; 20, and 30 $g.L^{-1}$). The experiment followed a completely randomized design in a 4 x 4 factorial scheme. After 60 days, the following characteristics were evaluated: number of leaves, leaf area (mm^2), aerial shoot length (cm), root length (cm), contents of chlorophylls *a, b,* total and carotenoids, final medium volume (mL), and fresh dry weight (g). The effect of ethylene upon morphogenesis was also evaluated by adding the promoter (ACC) or the ethylene inhibitor (STS) to the culture medium ($^1/_2$MS; $^1/_2$MS + 10 μM STS and $^1/_2$MS + 3 μM ACC). For that, the following characteristics were used: number of leaves, number of internodes, leaf area, shoot length, root system length, aerial fresh mass, root fresh mass, investment percentage in mass for the aerial part and root, content of chlorophylls *a, b*, total and carotenoids, accumulated ethylene (at 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49, and 56 days after explant inoculation), dry mass of shoots, dry mass of roots, and anatomical aspects. Inductive and non-inductive medium to hyperhydricity, combined with five irradiance levels were also tested. The interaction between sucrose concentrations up to 20 $g.L^{-1}$ and type of sealing (TMF1 and TMF2), positively influenced in the growth parameters of *in vitro* propagated plants, though conferring higher survival rates when acclimatized to *ex vitro* conditions. The total chlorophyll content, number of leaves, leaf area, shoot length, and fresh and dry masses were significantly reduced when both cultivars were grown in ACC-supplemented medium. Hyperhydric

shoots presented typical features, such as stomata deformation and increase in leaf blade width, moreover when cultured under higher irradiance levels. Higher irradiances also led to a marked photoinibition in *in vitro* cultured plants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de uva no Brasil tem apresentado uma tendência crescente, sendo a videira é uma das espécies frutíferas mais importantes no Brasil, onde a produção nacional atingiu 1.228.390 toneladas em 2006, numa área plantada de 87.792 hectares e comercialização de 267,33 milhões de litros de vinho, 131,32 milhões de litros de suco, 8,76 milhões de litros de espumantes e 35,72 milhões de litros de outros derivados. Com uma renda estimada em aproximadamente 120,87 milhões de dólares em 2005 (Mello, 2006).

Apesar de ser uma cultura de inquestionável importância e retorno econômico, a videira de uma forma geral, tanto cultivares copa para mesa ou para vinho, quanto cultivares porta-enxerto, são muito suscetíveis ao ataque de pragas e de doenças. As doenças que incidem na videira reduzem a qualidade, a produção e promovem a elevação dos custos de produção. As doenças mais sérias causadas por fungos debilitam e podem até matar a videira (Dias *et al.,* 1998). As pragas também causam grandes prejuízos à cultura da videira, sendo as de solo as mais danosas e de difícil controle, como a pérola da terra e os nematóides (Reis *et al.,* 1998; Sousa, 1996).

A forma mais eficiente e econômica para o controle das pragas e doenças é, sem dúvida, a utilização de cultivares resistentes. Entre as dezenas de cultivares desenvolvidas, os porta-enxertos de videira 'VR 043-43'(*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) e *Vitis riparia*, desenvolvido pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina, Videira, Santa Catarina) destacam-se por sua resistência à fusariose (*Fusarium oxysporum* Sch. f. sp. *herbemontis*) e alta tolerância a margarodes ou pérola-da-terra (*Eurhizococcus brasilensis*) (Borghezan *et al*., 2003; Bouquet *et al.,* 2000; Schuck *et al.,* 2001; Schuck, 2003).

O método de propagação mais empregado no Brasil consiste no plantio de porta-enxertos no local definitivo do futuro vinhedo para posterior enxertia no campo das variedades de interesse (Sousa, 1996). A propagação vegetativa do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) pelo enraizamento de estacas lenhosas não é viável, devido à sua dificuldade de enraizamento (Botelho *et al.,* 2005). O mesmo

também ocorre com cultivares da espécie *Vitis rotundifolia* (Pires & Biasi, 2003). Neste sentido, as técnicas de micropropagação são uma importante alternativa visando à multiplicação de cultivares e à obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária.

A cultura de tecidos, mediante a técnica de propagação *in vitro*, tem sido de ampla aplicação em várias espécies de interesse agrosilvicultural, dentre elas a videira. Na década de 90, esta técnica foi de fundamental importância em trabalhos de seleção, propagação *in vitro*, produção e certificação de plantas matrizes e mudas de videiras, em virtude da ocorrência de viroses, fusariose e margarodes no Estado de Santa Catarina (Schuck *et al.,* 1993; Silva *et al.,* 1997; Moreira, 2000; Silva, 2002).

Na viticultura, as técnicas de micropropagação são uma importante alternativa para a obtenção em larga escala, de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária (Dzazio *et al.,* 2002; Biasi, 2003). Além da eliminação de microrganismos, conservação e intercâmbio de germoplasma, de muitas espécies vegetais.

Entretanto, durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais de redução das trocas gasosas, alta umidade do ar, elevadas concentrações de etileno (Park *et al*., 2004), baixa irradiância e uso de açúcares como fonte de energia (Saher *et al.,* 2004). Estas condições podem causar inibição da fotossíntese, anomalias nos estômatos, maior acúmulo de reservas ou biomassa, dificultando a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (Biasi, 2003; Bouquet & Torregrosa, 2003).

Segundo Bouquet & Torregrosa (2003), o cultivo *in vitro* induz a adaptações anatômicas e morfológicas, sendo a drástica redução no tamanho dos órgãos a mais evidente. A organização histológica dos tecidos é fortemente alterada. Alterações anatômicas e bioquímicas são também características responsáveis por danos em cerca de 60% dos brotos micropropagados comercialmente (Ziv, 1991; Fontes, 1998; Park *et al.,* 2004).

Nesse sentido, o estudo do ambiente de cultivo *in vitro* sobre as características morfofisiológicas desses genótipos podem ter como

contribuição atender as demandas de plantas matrizes e de mudas de qualidade genética e fitossanitária comprovadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIASI, L. A. Micropropagação de videiras. In: POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 320-350, 2003.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L.K.A.; MOREIRA, F.M. & SILVA, A.L. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:783-789, 2003.

BOTELHO, R.V.; MAIA, A.J.; PIRES, E.J. P.; TERRA, M.M. & SCHUCK, E. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 6-8, 2005.

BOUQUET, A.; DANGLOT, Y.; BONGIOVANNI, M.; CASTAGNONE SERENO, P.; TORREGROSA, L. & BOURSIQUOT, J.M. Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf virus spread, using *Vitis* x *Muscadinia* hybridization. **Acta Horticulturae**, n. 528, p. 517-526, 2000.

BOUQUET, A. & TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: JAIN, S. M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 319-352, 2003.

DIAS, M.S.C.; SOUZA, S.M.C. & PEREIRA, A.F. Principais doenças da videira. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 194, p. 76-84, 1998.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A. & ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 759- 764, 2002.

FONTES, M.A. **Morfogênese** *in vitro***, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão** (*Capsicum* **sp**.). Viçosa:UFV, 167p. Dissertação (Mestrado em Botânica), 1998.

MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2006**. EMBRAPA Uva e Vinho. Bento Gonçalves, RS. Artigo técnico disponível em http://www.cnpuv.embrapa.br/. Acessado 20/04/2007.

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

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

PIRES, E.J.P. & BIASI, L.A. Propagação da videira. In: POMMER, C. V (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 295-350, 2003.

REIS, P.R.; SOUZA, J.C. & GONÇALVES, N.P. Pragas da videira tropical. **Informe Agropecuário**, v. 19, n. 194, p. 92-95, 1998.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. & OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 120:152-161, 2004.

SCHUCK, E. Porta-enxertos para a videira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6, 2003, Fraiburgo. **Anais**. Fraiburgo: Parque da Maçã. p. 185, 2003.

SCHUCK, E.; ANDRADE, E.R. de; GALLOTTI, G.J. M. & DALBÓ, M.A. Novas alternativas na busca de soluções para o controle do declínio da videira. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 6, n. 4, p. 48-50, 1993.

SCHUCK, E.; DALBÓ, M.A.; ROSIER, J.P. & DUCROQUET, J.P.H.J. Porta-enxertos para a cultura da videira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4, Fraiburgo. **Anais**. Caçador: p. 122-132, 2001.

SILVA, A.L. da. Programa de certificação de mudas de videira em Santa Catarina. In: Viticultura e enologia: atualizando conceitos. Caldas: **Epamig**, p. 215-231, 2002.

SILVA, A.L. da; SCHUCK, E.; HARISCAIN-LAFITTE, P. & PARIZZOTTO, A. Cultura *in vitro* do porta-enxerto de videira var. 04343 resistente a fusariose. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1, 1997, Jaboticabal. **Anais**... Jaboticabal: Unesp, p. 51-53. 1997

SOUZA, J. S. I. de. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, p.791,1996.

ZIV, M. Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.) **Micropropagation: Technology and Applications.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 45–69, 1991.

CAPÍTULO 1

EFEITO DE VEDAÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO DE *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* CULTIVADA *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

Durante as fases da cultura *in vitro*, as células, tecidos e plantas cultivadas, muitas vezes não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO_2 e não apresentam teores de clorofilas suficientes para realizarem fotossíntese que sustente seu crescimento. O uso de fontes exogênas de carbono ao meio de cultivo, como a sacarose, favorece maior acúmulo de reservas ou biomassa (Saher *et al.,* 2004). Esta condições podem dificultar a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (Biasi, 2003; Bouquet & Torregrosa, 2003).

Segundo Barrueto Cid, (2001) os componentes orgânicos do meio são importantes, principalmente a sacarose, fazendo-se indispensável e garantindo uma maior permanência do explante *in vitro*, já que não são suficientemente autotróficos. Por outro lado, Mosaleeyanon *et al.* (2004) afirmam que plantas crescidas sob condição fotomixotrófica ou heterotrófica *in vitro*, em meio contendo sacarose, possuem pouca habilidade fotossintética. Entretanto, a concentração de sacarose é um fator importatnte a ser determinado e ajustado, de acordo com o tipo de explante e as condições de cultivo.

Outro fator de importância a ser observado no cultivo *in vitro* de plantas, refere-se ao microambiente no interior dos frascos de cultivo, que podem estar diretamente relacionados ao tipo de vedação utilizada. Na maioria dos casos o tipo de vedação é quem vai determinar o nível de trocas gasosas com o ambiente externo, que por sua vez pode está relacionada com a variabilidade no comportamento das culturas.

Kozai & Nguyen (2003) sugerem a necessidade de se aumentar a difusão de CO_2 e a umidade na atmosfera do frasco de cultivo, para

promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca nas plantas. O tipo de vedação utilizada pode afetar as trocas gasosas, disponibilidade de água, micronutrientes, e o equilíbrio de hormônios no recipiente de cultivo (Kataeva *et al.,* 1991).

O cultivo de plantas *in vitro*, em recipientes completamente fechados, pode conduzir a modificações dramáticas da composição gasosa. Produtos voláteis como etileno podem se acumular e inibir o crescimento de plantas e o desenvolvimento de habilidades fotossintéticas (Park *et al*., 2004). Em cravos, foi mostrado que a ventilação em recipientes de cultivo minimizou a desordem morfofisiológica conhecida como hiperidricidade (Jô *et al.,* 2002).

Para favorecer a sobrevivência e crescimento das plantas na aclimatização, Kozai & Nguyen (2003) e Hoffmann *et al.* (2001) sugeriram uma etapa de pré-tratamentos *in vitro*, que consiste de técnicas e condições que permitam tornar o ambiente *in vitro* mais semelhante ao ambiente natural. Podendo ser utilizada para aperfeiçoar os protocolos de micropropagação e, por consequência, aumentar o rendimento na produção de mudas.

Estudos 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 até as condições *ex vitro* do material vegetal. Portanto, a utilização de fatores ambientais como trocas gasosas no ambiente de cultivo e a adequação de compostos orgânicos como a sacarose, podem possibilitar adequar as condições *in vitro*, com o objetivo de aproximar ao ambiente *ex vitro*.

A cultura de tecidos oferece a possibilidade de investigar o comportamento sob a fisiologia e o crescimento de plantas, visto que o processo de aclimatação envolve estresses de naturezas variadas (hídrico, térmico e luminoso), torna-se necessário a adequação das condições *in vitro* para reduzir o comprometimento na sobrevida das plantas. Diante disto, o presente trabalho teve por objetivo adequar metodologias que favoreçam a obtenção de plantas *de Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* cultivadas *in vitro* com características favoráveis a serem aclimatizadas *ex vitro.*

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais (LCTII), do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, Brasil.

2.1 - Material experimental e condições de crescimento

Como fonte de explantes, foram utilizadas plantas de videira do porta-enxerto 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* X *Vitis rotundifolia*), provenientes do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Paraná/PR.

Os explantes foram micropropagados por subcultivos mensais, sob condições assépticas, sendo utilizados segmentos nodais contendo uma ou duas gemas. Os explantes foram cultivados em meio de cultura constituído pelos minerais e nutrientes de ½MS (com os sais reduzido à metade) (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas B5 (Gamborg *et al*., 1968), acrescido de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose (Vetec, Brasil), 100 $mg.L^{-1}$ de inositol e solidificado com 6,5 $g.L^{-1}$ de ágar (Merck, Germany). O meio teve pH ajustado para 5,8 e foi autoclavado a 121°C e pressão de 1,5 kg cm^{-2}, durante 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 $\pm$ 2 ºC, sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 36 µmol m^{-2} s^{-1}, por um período de 45 a 60 dias.

2.2 – Montagem do experimento

Foram utilizados explantes assépticos de segmentos nodais de 'VR 043-43' contendo uma ou duas gemas e uma folha. Os explantes foram cultivados em meio de cultura ½ MS e vitaminas B5, acrescido de 100 mgL^{-1} de inositol e solidificado com 6,5 $g.L^{-1}$ de ágar. Foram acrescidos ao meio, 0; 10; 20 e 30 $g.L^{-1}$ de sacarose. O meio teve o pH ajustado para 5,8, acondicionado em frascos de vidro de volume de 315 mL, altura de 12 cm e

diâmetro da boca de 5 cm, cada um contendo 50 mL de meio de cultura. Estes foram vedados com tampas rígidas de polipropileno autoclavável, e autoclavados a 121°C e pressão de 1,5 kg cm^{-2}, durante 20 minutos. Sob câmara de fluxo laminar foram inoculados os explantes nos diferentes meios de cultura propostos e os frascos vedados com quatro diferentes vedações descritas a seguir no delineamento experimental (Figura 1).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 ºC, sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 36 µmol m^{-2} s^{-1}.

2.3 – Características avaliadas

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas, área foliar (mm^2), comprimento da parte aérea (cm), comprimento radicular (cm), determinação de pigmentos: clorofilas *a, b* e totais e carotenóides, volume final do meio de cultura (mL) e massa seca total das plantas (g).

2.4 – Mensuração da área foliar, comprimento e massa seca das plantas

A área foliar por planta foi medida utilizando-se realizada um medidor de área foliar (modelo AT DELTA-T DEVICES LTD.) na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa.

O comprimento das plantas foi mensurado com o uso de um paquímetro digital (Digimess).

Para a medida da massa seca, as plantas foram secas em estufa a 70 ºC por 48 horas e pesadas em balança analítica (Sartorius – SBP10S).

2.5 – Determinação dos pigmentos foliares

Para a determinação dos pigmentos foliares, após os 60 dias de cultivo *in vitro*, foram retirados 5 discos foliares de 5 mm de diâmetro, perfazendo uma área de 0,98 cm^2, a partir da terceira ou quarta folhas. Os discos foram incubados em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) por um período de 48 horas em solução saturada com carbonato de cálcio

($CaCO_3$). Após o período de incubação, determinou-se a absorbância das amostras utilizando-se cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo Hitachi U-2000). Os comprimentos de ondas foram 663, 645 e 470 nm e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenóides foram baseadas em metodologia descrita por Wellburn (1994).

2.6 – Delineamento experimental

Experimento do tipo fatorial 4 x 4, em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo quatro concentrações de sacarose (0,0; 10; 20 e 30 $g.L^{-1}$) e quatro tipos de vedações: 1) filme plástico de PVC transparente (Goodyear, Brasil); 2) tampa rígida de polipropileno autoclavável com 56 mm de diâmetro interno, 3 mm de espessura e 12 mm de altura, sem furos (TN); 3) tampa rígida de polipropileno autoclavável com 56 mm de diâmetro interno, 3 mm de espessura e 12 mm de altura, com um orifício de 10 mm (TMF1) e 4) tampa de polipropileno com dois orifícios de 10 mm (TMF2), cobertos por membranas permeáveis (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão) de 0,22 μm (Figura 1).

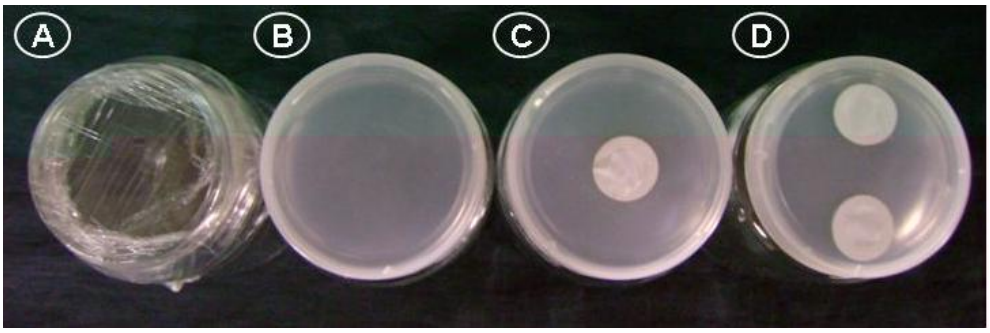


Figura 1. Tipos de vedações usados na propagação *in vitro* de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*. **A)** filme plástico de PVC (PVC), **B)** tampa plástica de polipropileno (TN), **C)** tampa plástica de polipropileno contendo um furo cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (TMF1) e **D)** tampa plástica de polipropileno contendo dois furos cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas (TMF2).

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para se verificar a significância dos dados e então procedeu-se à análise de regressão com uso do programa de análises estatísticas e genética -SAEG 8.0 (UFV-MG, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante análise de variância (ANOVA), pode-se constatar interação significativa, a 5% de probabilidade, no efeito dos dois fatores estudados entre todas as variáveis, com exceção do número de folhas e da razão entre clorofilas *a* e *b*, onde foram significativos somente para os tipos de vedações utilizados.

A avaliação realizada após os 60 dias, ao término do experimento, mostrou que a altura das plantas foi significativamente influenciada tanto pelos tipos de vedações como pelas concentrações de sacarose.

Nos tratamentos com vedações usando-se filme PVC as plantas apresentaram comportamento de crescimento linear positivo, ou seja, houve aumento na altura à medida que aumentava a concentração de sacarose no meio de cultivo (Figuras 2 e 3). Entretanto, as plantas vedadas com filme PVC apresentaram menor altura em relação aos vedados com tampas contendo um e dois orifícios cobertos com membranas permeáveis a trocas gasosas.

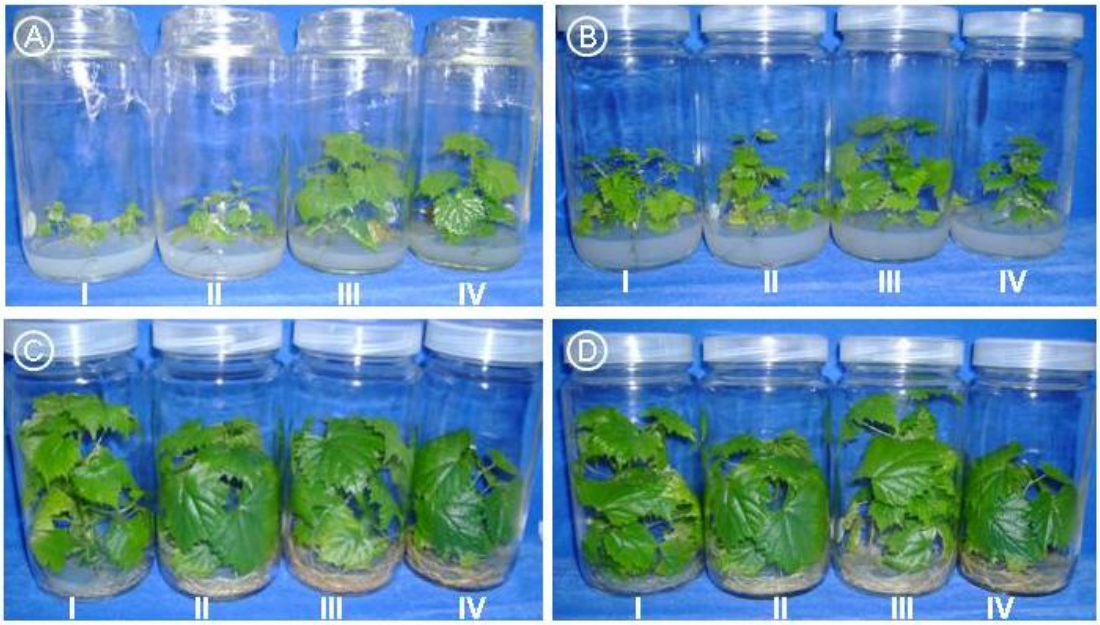
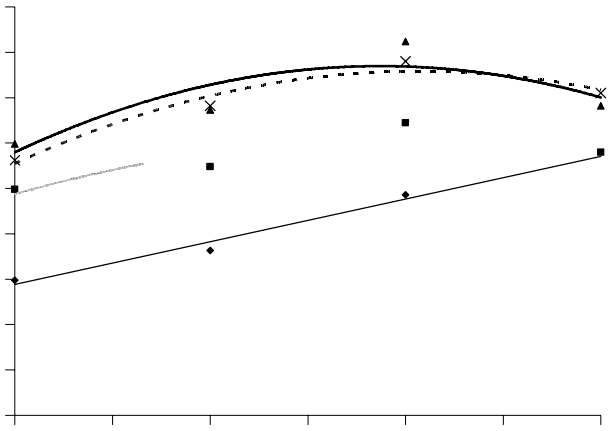


Figura 2. Desenvolvimento das plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: **A)** filme plástico de PVC (PVC), **B)** tampa plástica de polipropileno (TN), **C)** tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e **D)** tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas e concentrações de sacarose: **I)** 0 $g.L^{-1}$, **II)** 10 $g.L^{-1}$, **III)** 20 $g.L^{-1}$ e **IV)** 30 $g.L^{-1}$.

Vedações com tampa de polipropileno (TN), tampa de polipropileno contendo um furo (TMF1) e tampa de polipropileno contendo dois furos (TMF2) cobertos com membrana permeável a trocas gasosas, apresentaram comportamento quadrático de crescimento das plantas, com pontos máximos de 6,45 cm; 8,24 cm e 7,80 cm no tratamento contendo 20 $g.L^{-1}$ de sacarose, respectivamente (Figura 3). Entretanto, Claumann *et al.* (2004) obtiveram maior crescimento da parte aérea de *Vitis* spp. cultivares Paulsen 1103 e Merlot, com a concentração de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose. Porém, *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo apresentou maior crescimento da parte aérea em ambiente de cultivo com trocas gasosas, em relação ao controle (Gribaudo *et al.,* 2003).



com consequente redução do potencial osmótico e do potencial hídrico do meio, dificultando a absorção de água e nutrientes pelas plantas.

Estes resultados são compatíveis com os obtidos por Alexandre (2002) ao estudar ápices caulinares de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, com melhor desempenho da parte aérea sob a influência da concentração de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e 25 µmol m^{-2} s^{-1} de irradiância. Resultados estes coerentes aos relatados por Couceiro (2002), em que se obteve maior número de estruturas formadas em meio MS suplementado com 30 $g.L^{-1}$ de sacarose, sob a exposição de 60 µmol m^{-2} s^{-1}.

O sucesso da aclimatização implica em alto grau de sobrevivência das plantas e está, muitas vezes, na dependência da etapa de pré-acondicionamento *in vitro.*

Alguns trabalhos mostram a influência positiva da sacarose no crescimento das plantas mesmo que se tenha enriquecido o ambiente com CO_2. Em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), o crescimento foi ótimo quando as condições de enriquecimento de CO_2 foram combinadas com o meio de cultivo contendo 20 $g.L^{-1}$ de sacarose (Solarova *et al.,* 1989). Em *Dendrobium*, Lim *et al.* (1992) também verificaram que o crescimento das plantas foi maior na presença de sacarose.

O efeito dos tratamentos para a variável número de folhas foi significativo apenas para os tipos de vedações estudadas, sendo que nas vedações com PVC e TN apresentaram o número de folhas relativamente maiores que as demais vedações, onde as imposições às trocas gasosas eram menores, respectivamente (Figura 4). Em contraste com os resultados apresentados, o número de folhas por planta aumentou até a concentração de 34,2 $g.L^{-1}$ de sacarose, na intensidade luminosa de 18 µmol m^{-2} s^{-1} (Machado, 2006).

Mosaleeyanon *et al.* (2004) obtiveram maior número de folhas por planta de *Samanea saman* na ausência de sacarose no meio de cultura do que com sacarose.

O maior número de folhas nos tratamentos utilizando-se vedações com PVC e TN se deve, provavelmente, à maior restrição às trocas gasosas entre o ambiente interno nos frascos de cultivo e o meio externo. Esses tipos de vedações também podem estar associados à maior umidade relativa

dentro dos frascos, assim como acúmulo de etileno a níveis prejudiciais às plantas.

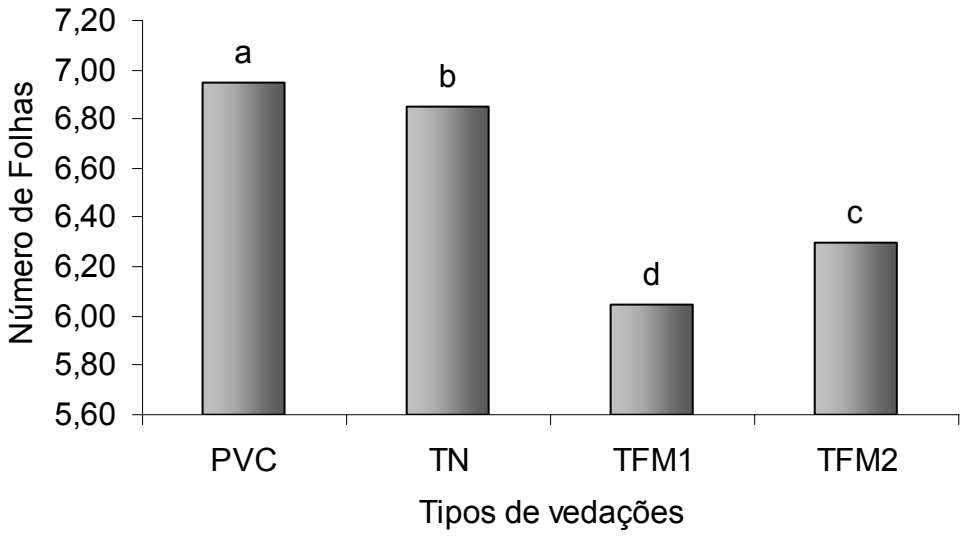


Figura 4. Número médio de folhas em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas. Comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando-se as figuras 5 e 6, observa-se claramente a importância de estudos de outros fatores ambientais, além da fonte de carbono ao cultivo *in vitro*, como é o caso de um ambiente permeável a trocas gasosas. Nota-se que mesmo nas plantas controle (sem adição de sacarose) foram obtidas maiores médias de áreas foliares nas condições onde foram favorecidas as trocas gasosas, com valores de 262,08; 175,63 e 140,70 mm^2 para as vedações com TMF2, TMF1 e TN, respectivamente, contrastando-se com o valor de 38,53 mm^2 na vedação com filme PVC. Estes valores foram 85, 78 e 75% maiores, respectivamente, que o PVC (Figura 5).

Foi observado aumento linear positivo na área foliar de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* nos tratamentos PVC e TN, associado à suplementação crescente de sacarose ao meio de cultivo. Para TMF1 e TMF2, o aumento foi quadrático negativo para o primeiro e quadrático positivo para o segundo,

com valores de 441,90 e 527,30 mm^2 de área foliar, respectivam

5).

Assim como para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, for

valores de área foliar total em estudos com tabaco (

Kadlecek *et al*. (2001), quando submetidos a

irradiância e alta concentração de sacarose n

A ausência de sacarose no meio d

a área foliar das plantas de videir

testadas (Machado, 2006).

Segundo Tsay (2006

apresentaram folhas men

pouca troca gasosa e m

Vitis vinifera x

Para promover fotoautotrofia nas plantas *in vitro,* Debergh (1991) sugere a omissão de sacarose no meio. Entretanto, os resultados aqui encontrados sugerem que outros fatores ambientais, como as trocas gasosas, devem está associados a omissão de sacarose, para que esta hipótese seja confirmada. Neste estudo, são observadas características de fotoautotrofismo, pois nos tratamentos controle (sem sacarose) para cada tipo de vedação em estudo, foram obtidos áreas foliares significantemente maiores nos tratamentos sem restrição a trocas gasosas.

Langford & Wainwright (1987) afirmaram que o cultivo fotoautotrófico de células e órgãos *in vitro* foram buscados por muitos pesquisadores, mas poucos resultados foram encontrados neste sentido. Provavelmente, seria necessário modificar a intensidade de luz e concentração de CO_2. Estas características são condizentes ao proposto por Arai *et al.* (1991), Yue *et al*. (1993) e Desjardins *et al.* (1987), em trabalhos realizados com morangueiro.

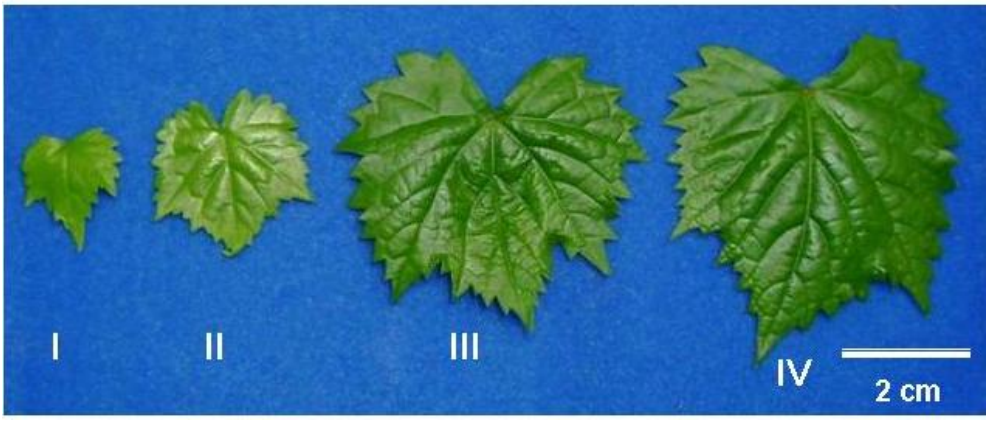


Figura 6. Área foliar de plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: **I)** filme plástico de PVC; **II)** tampa plástica de polipropileno (TN); **III)**II)e. e concentrac□as gasosas]TJETEMC /Span

TN e PVC, respectivamente, deixando evidente a influência das trocas gasosas para essa característica (Figuras 7 e 8).

Foi observado aumento linear positivo do sistema radicular das plantas, quando desenvolvidas nos tratamentos PVC, TN e TMF1, associados ao incremento crescente de sacarose ao meio de cultivo.

Somente no tratamento TFM2 foi observado comportamento quadrático no crescimento do sistema radicular, com incremento quando se passou de 0 $g.L^{-1}$ até 20 $g.L^{-1}$ de sacarose; no entanto permaneceu constante ao se aumentar a concentração para 30 $g.L^{-1}$ de sacarose ao meio (Figuras 7 e 8). Fica evidente a participação da sacarose no crescimento radicular de plantas propagadas *in vitro*, visto que, na maior concentração de sacarose associada à PVC, TN, TFM1 e TMF2 foram obtidos 6,72; 10,60; 17,24 e 14,66 cm, respectivamente (Figura 7).

Para a formação das raízes é necessário energia, a qual pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de açúcar. O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos (Calvete *et al.,* 2002).

Semelhante aos resultados deste trabalho, Machado (2006) relatou que a sacarose aumentou o número de raízes principais por planta do porta-enxerto de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* na concentração máxima de 27,7 $g.L^{-1}$.

Em contraste, para *Vitis* spp*.* cv. Merlot, a ausência de sacarose no meio de cultura, levou à não emissão de raízes (Claumann *et al.,* 2004). Em nossos trabalhos, o maior enraizamento na omissão de sacarose, ocorreu em ambientes com trocas gasosas (Figura 7).

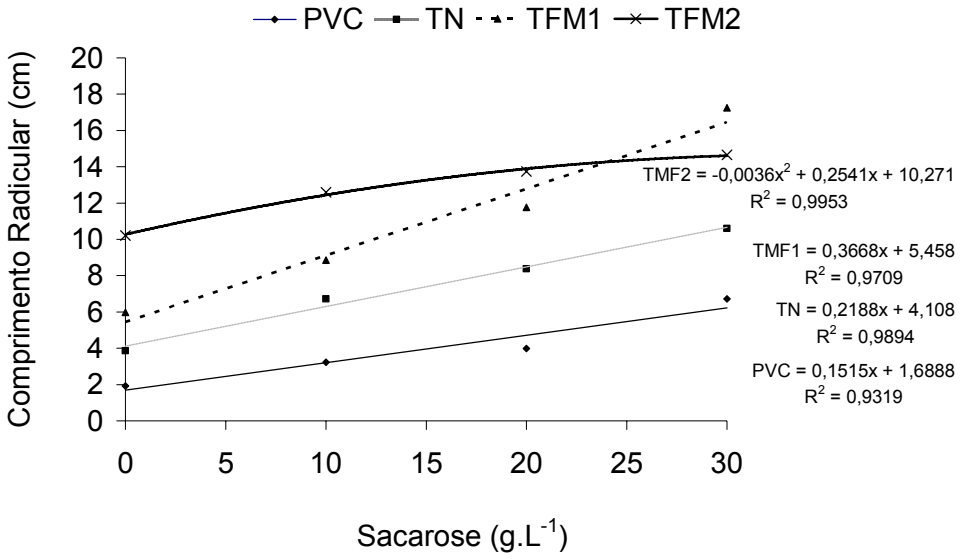


Figura 7. Comprimento radicular em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), TN contendo um orifício (TMF1) e TN contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas x concentrações de sacarose.

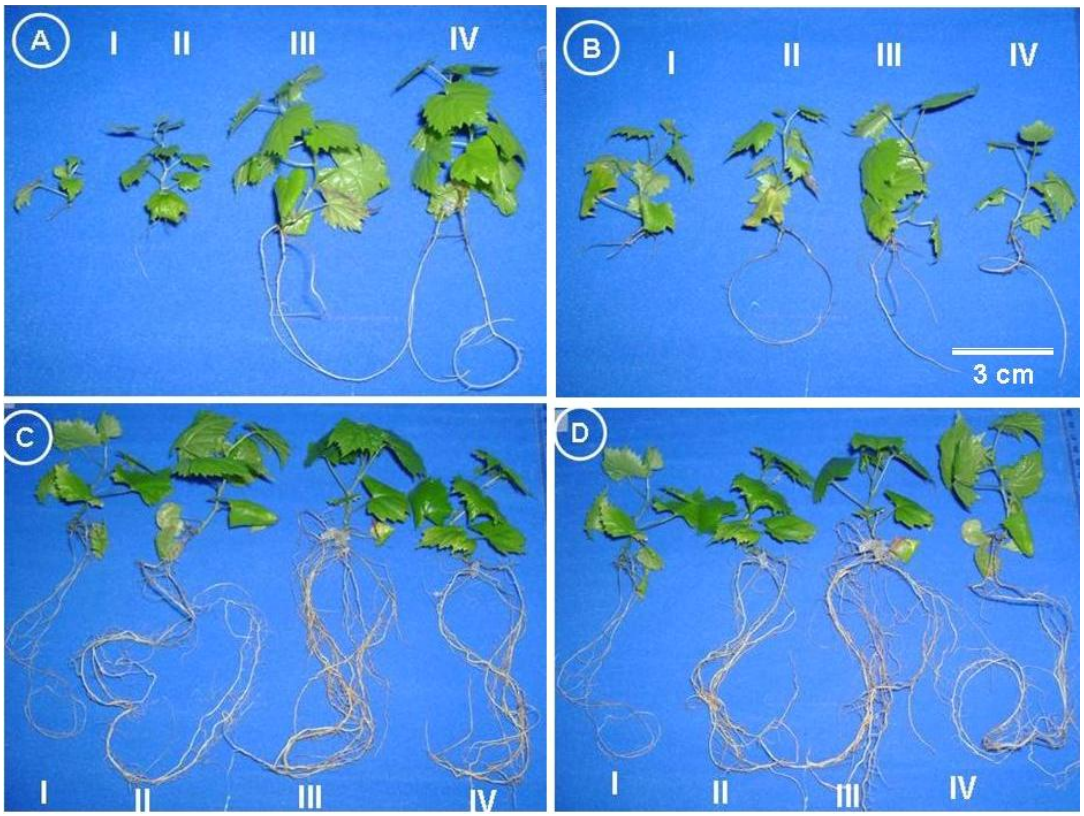


Figura 8. Desenvolvimento do sistema radicular em de plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: **A)** filme plástico de PVC; **B)** tampa plástica rígida de polipropileno (TN), **C)** TN com um orifício coberto por membrana de trocas gasosas (TMF1), **D)** TN com dois orifícios cobertos por membranas de trocas gasosas (TMF2) e concentrações de sacarose: **I)** 0 $g.L^{-1}$, **II)** 10 $g.L^{-1}$, **III)** 20 $g.L^{-1}$ e **IV)** 30 $g.L^{-1}$ de sacarose.

Neste estudo, os tratamentos testemunhas (sem sacarose) também produziram raízes, principalmente em TMF1 e TMF2. Os resultados sugerem que as condições encontradas no ambiente de cultivo foram eficientes para promover quantidades suficientes de fotossíntese. Todavia, o número de raízes favorecido pelo aumento da sacarose adicionada ao meio de cultivo.

Estes resultados concordam com McCown (1988), segundo o qual quando o suprimento de fotossintatos é insuficiente, não há formação de raízes *in vitro*.

O aumento na porcentagem de enraizamento com o incremento da concentração de sacarose foi relatado em alguns protocolos de aclimatização *ex vitro*. Riquelme *et al.* (1991) estudaram o efeito de várias concentrações de sacarose (0 a 60 $g.L^{-1}$) na etapa de pré-acondicionamento

in vitro de plântulas de morangueiro, batata, menta e videira, onde os resultados demonstraram que doses de 30 a 45 $g.L^{-1}$ foram as mais adequadas durante o pré-acondicionamento *in vitro* e posterior sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Da mesma forma, Aldrufeu (1987) estudando plântulas de *Pelargonium zonale* var. Rubin multiplicadas *in vitro,* verificou que, com a adição de 20 $g.L^{1}$ de sacarose no meio aumentou a quantidade de plantas enraizadas, bem como o número de raízes por planta. O aumento da produção de biomassa da raiz para a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) foi crescente até 45 $g.L^{-1}$ de sacarose (Calvete, 1998). Já para a samambaia espada (*Nephrolepis exaltata* L. Schott) propagada *in vitro,* o aumento de sacarose tendeu a apresentar os piores rendimentos (Guimarães *et al.,* 1999).

Entretanto, esses autores estudaram apenas o efeito da sacarose no meio de cultivo. No presente estudo, foram avaliadas os efeitos fisiológicos na interação da sacarose com diferentes tipos de vedações.

A concentração dos pigmentos foliares foi influenciada tanto pelos tipos de vedações como pelas concentrações adicionadas ao meio de cultivo. O aumento ou o decréscimo nos teores de clorofilas e carotenóides demonstram uma sensibilidade dos tecidos de videira aos níveis de trocas gasosas e concentrações de sacarose utilizados.

Quando se aumentou a concentração de sacarose os teores de clorofilas *a* (Chl *a*) e *b* (Chl *b*) permaneceram praticamente inalterados na vedação com filme PVC. Tiveram, todavia, comportamento contrário nos demais tratamentos, onde com o aumento de sacarose ao meio de cultivo foi acompanhado por um incremento linear no teor destes pigmentos. Os maiores teores de Chl *a* (Figura 9) e Chl *b* (Figura 10) foram obtidos nas combinações das maiores concentrações de sacarose com as vedações, onde as trocas gasosas foram facilitadas (TMF2 e TMF1).

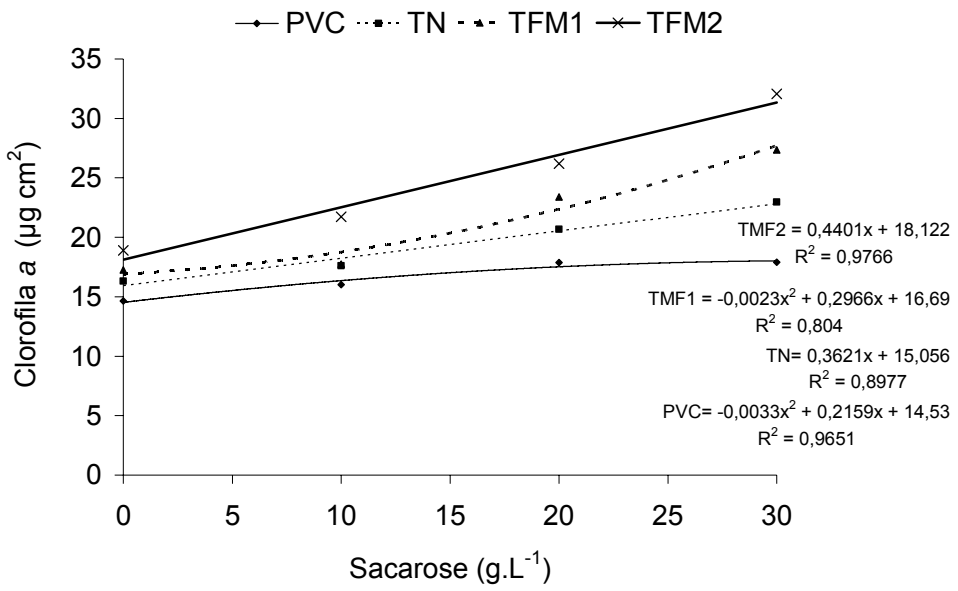


Figura 9. Teores de clorofila *a* (Chl *a*) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas x distintas concentrações de sacarose.

Segundo Viña *et al*. (1999), as plantas cultivadas *in vitro* desenvolvem-se melhor em meios contendo altas concentrações de sacarose e incubadas em menores irradiâncias e CO_2. Provavelmente, ocorre uma ação conjunta desses fatores, resultando num reduzido desempenho fotossintético. Edelman & Hanson (1971) e Yamada & Sato (1978) afirmam que a presença de carboidratos no meio de cultivo inibe a síntese de clorofila, reduzindo, por conseguinte, a capacidade fotossintética das culturas. Neste trabalho, ao contrário do esperado, o aumento da sacarose no meio induziu uma maior síntese de clorofila.

Assim como neste trabalho, Tsay (2006) e Gribaudo *et al.* (2003) observaram que ambientes de cultivo permeáveis a trocas gasosas favoreceram o incremento no conteúdo de clorofilas em *Scrophularia yoshimurae* e *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo, respectivamente.

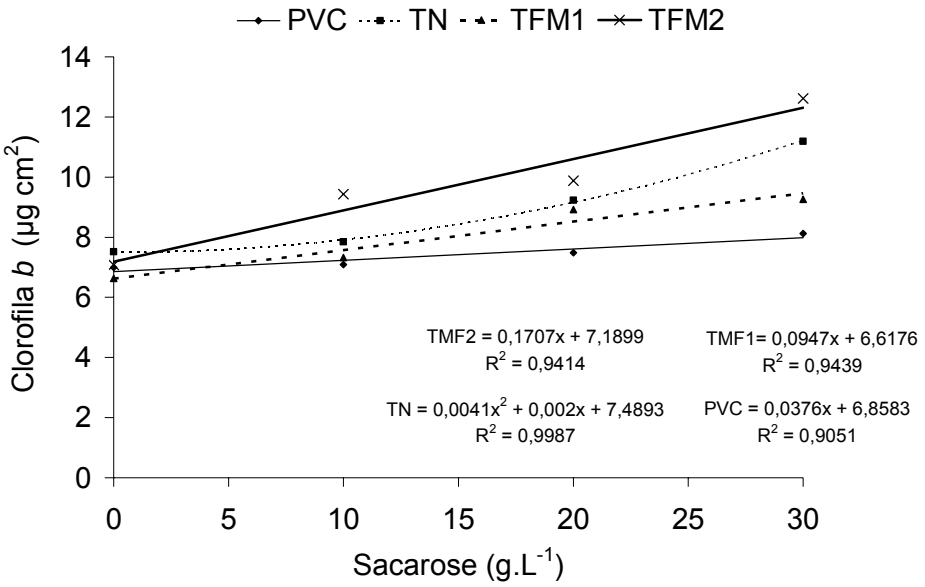


Figura 10. Teores de clorofila *b* (Chl *b*) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas x distintas concentrações de sacarose.

As exigências de sacarose variam com a espécie. Por exemplo, Kadlecek *et al*. (2001), trabalhando com tabaco (*Nicotiana tabacum*), obtiveram menores valores da relação clorofila *a*/*b* em meios de cultivo com ausência de sacarose, independentemente da irradiância. Essa clorose também pode ter sido provocada por concentrações baixas de sacarose, pois Sriskandarajah & Mullins (1981) e Langford & Wainwright (1987), ao cultivarem *in vitro* explantes de macieiras e roseiras, respectivamente, observaram a morte dos explantes em meios de cultivo pobres em sacarose.

A adição de sacarose ao meio de cultivo também favoreceu a obtenção de maiores teores de pigmentos acessórios, como é o caso dos carotenóides. Observa-se aumento nos teores deste pigmento nas vedações com TMF1 e PVC associados ao aumento de 0 $g.L^{-1}$ até 20 $g.L^{-1}$ de sacarose ao meio, mantendo-se estável a partir de 20 $g.L^{-1}$. Para TMF2 e TN

houve aumento no teor de carotenóides até as maiores concentrações de sacarose (Figura 11).

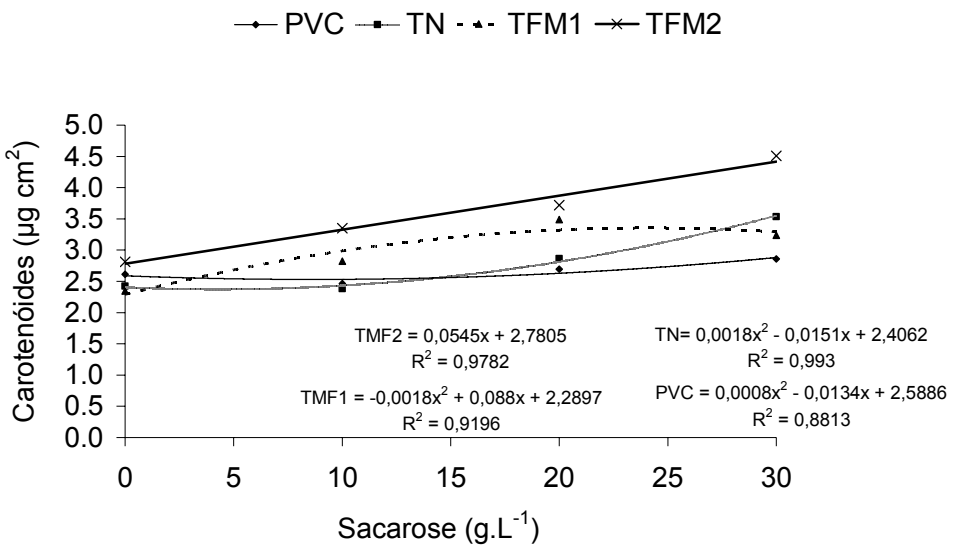


Figura 11. Teor de carotenóides em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas x distintas concentrações de sacarose.

Em todos os tratamentos estudados, a combinação da adição continua de sacarose favoreceu o incremento no conteúdo de clorofilas totais (Chl *a* + Chl *b*) sendo maiores respectivamente em TMF2, TMF1, TN e PVC (Figura 12). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Alexandre (2002) em estudos com maracujazeiro, com maior conteúdo de pigmentos foliares quando as plantas foram cultivadas em meio contendo 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e irradiância de 25 µmol m^{-2} s^{-1}.

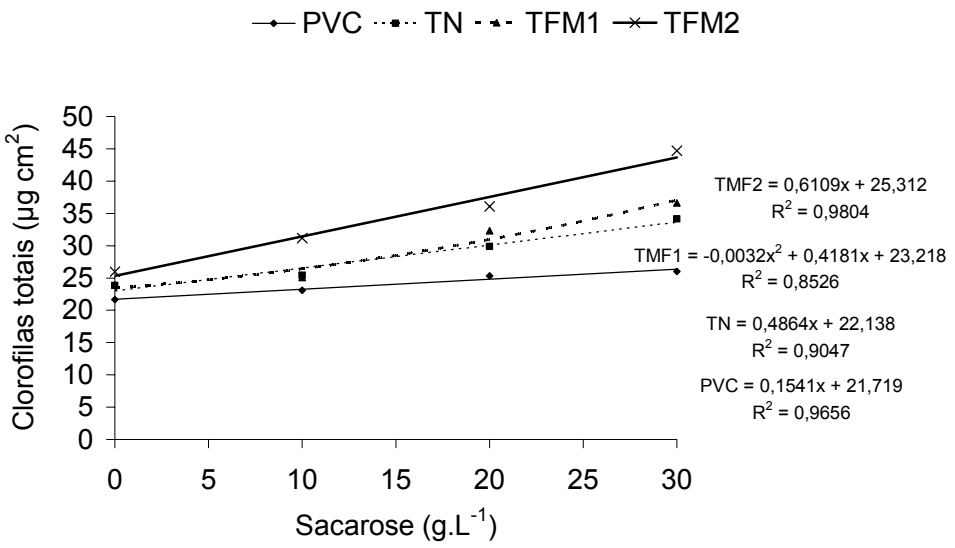


Figura 12. Teores de clorofilas totais (Chl *a* + Chl *b*) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas x distintas concentrações de sacarose.

Estas são características que se deseja obter para a indução do fotoautotrofismo em plantas cultivadas *in vitro* e assim favorecer a taxa de sobrevivência quando aclimatizadas *ex vitro*.

Grout & Millan (1985) e Kozai & Iwabuchi (1991), induziam o fotoautotrofismo nas plantas de morango pela não adição de sacarose ao meio de cultivo. Desta forma, aumentaram a taxa de sobrevivência das plantas, reduzindo custos e a contaminação na produção. Entretanto, foram encontradas menores taxas de sobrevivência em plantas de abacate propagadas *in vitro,* em meios com menores concentrações de sacarose em ambiente com elevada concentração de CO_2 (Viña *et al.*, 1999).

Os crescentes níveis de sacarose associados aos diferentes tipos de vedações resultaram em aumento da biomassa *in vitro*, de forma semelhante tanto para a parte aérea como para a raiz.

A magnitude do efeito dos resultados obtidos nas variáveis: altura da planta (Figura 1), área foliar (Figura 3), comprimento radicular (Figura 7) e clorofilas totais (Figura 12), associado às maiores concentrações de

sacarose. Provavelmente, estes aumentos estão relacionados ao maior acúmulo de massa seca e maior capacidade fotoautotrófica das plantas, sendo mais expressivos nos tratamentos TMF2 e TMF1 (Figura 13).

Capellades *et al.* (1991) e Hdider & Desjardins (1994) sugerem que *in vitro* não há fotossíntese em presença de altas concentrações de sacarose, devido ao acúmulo de amido ou à inibição da enzima Rubisco. Nas plantas cultivadas *in vitro* sob altas concentrações de sacarose, a síntese reduzida dos açúcares favorece o acúmulo de carboidratos no tecido.

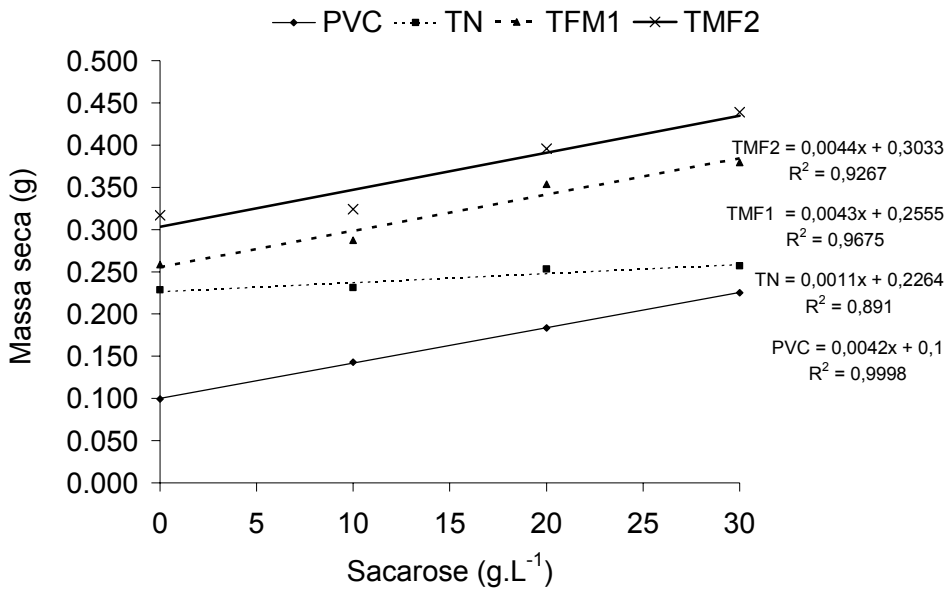


Figura 13. Massa seca total (g) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de diferentes vedações: filme plástico de PVC (PVC), tampa plástica de polipropileno (TN), tampa plástica de polipropileno contendo um orifício (TMF1) e tampa plástica de polipropileno contendo dois orifícios (TMF2) de 10 mm, cobertos por membranas permeáveis a trocas gasosas x distintas concentrações de sacarose.

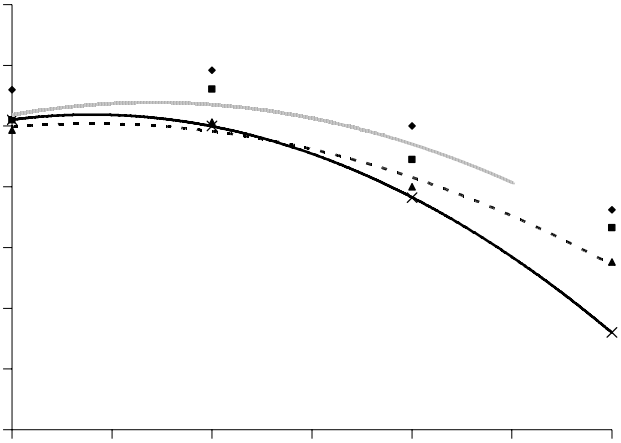
Quando as plantas são cultivadas *in vitro*, em meio de cultura sem açúcar, torna-se necessário o aumento da intensidade luminosa, da difusão de CO_2 e da umidade (vapor d'água) em volta da planta para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (Aitken-Christie *et al.,* 1995; Kitaya *et al.,* 1997; Kozai & Nguyen, 2003). Provavelmente, tenha ocorrido melhorias na difusão de CO_2, menor umidade relativa, menor

acúmulo de etileno e maior transpiração das plantas, ao se usar vedações permeáveis a trocas gasosas (TMF1 e TMF2).

Neste estudo, a avaliação do volume final do meio de cultivo foi importante para se ter uma noção real do tempo em que se pode deixar as plantas sob tais tratamentos.

Nos tratamentos TMF2 e TMF1, onde as condições de trocas gasosas foram favorecidas, as plantas apresentaram melhor desenvolvimento; entretanto, podem ter ocorrido perdas razoáveis mediante a evaporação, acelerando a redução do volume do meio (Figura 14).

Conforme relatado por Kozai & Nguyen (2003) e Santana *et al*. (2003), o aumento da concentração de CO_2 e, simultaneamente, a redução da umidade relativa e da concentração de etileno ao redor da planta, tem sido conseguido utilizando-se tampas de fechamento dos frascos de cultivo mais permeáveis (filtros permeáveis a gases ou chumaços de algodão, por exemplo), ou então, por meio do enriquecimento da sala de crescimento com CO_2 (Kozai & Nguyen, 2003). O acréscimo da concentração de CO_2 promove o aumento da fotossíntese, em função de seu efeito direto sobre a enzima Rubisco (Bowes, 1993; Arigita *et al.,* 2002), promove a regulação estomática, prepara as plantas para as condições autotróficas (Arigita *et al.,* 2002), e possibilita encurtar ou eliminar totalmente a necessidade de aclimatização *ex vitro* (Kozai, 1991; Arigita *et al.,* 2002). O decréscimo na umidade relativa com a maior troca gasosa no frasco, aumenta significativamente a taxa de transpiração da planta, e conseqüentemente a absorção de água e de nutrientes (Aitken-Christie *et al.,* 1995).



4. CONCLUSÕES

✓ *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* desenvolvida em sistema permeável a trocas gasosas, tanto com uma (TMF1) ou duas membranas (TMF2), associado a 20 $g.L^{-1}$ de sacarose, apresentam alturas similares e superiores as demais vedações.

✓ Vedações permeáveis a trocas gasosas TMF1 associado a 20 $g.L^{-1}$ de sacarose e TMF2 a 30 $g.L^{-1}$, foram mais eficientes para obtenção de maiores áreas foliares em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia.*

✓ O comprimento do sistema radicular e maior conteúdo de clorofilas totais foram favorecidos por ambientes com menor restrição a trocas gasosas, como TMF1 e TMF2, associados a concentrações crescentes de sacarose.

✓ Apesar de videiras desenvolvidas no sitema TMF2 apresentarem caracteristicas favoráveis a aclimatização, este não apresentou diferenças significativas ao sitema TMF1. Não sendo indicado para subcultivos por tempo elevados e nem para meios com altas concentrações de sais, pois este tende a favorecer a redução do potencial osmótico do meio.

✓ Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o tipo de vedação usado parece estar associado com a indução da nutrição fotoautotrófica em plantas de videira cultivadas *in vitro,* sob estas condições.

✓ A interação entre concentrações crescentes de sacarose e vedações permeáveis as trocas gasosas trouxe efeitos favoráveis nos parâmetros fisiológicos de crescimento em videira propagada *in vitro*, conferindo características favoráveis à aclimatização *ex vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S. **Germinação** *in vitro* **e organogênese em explantes do maracujazeiro (***Passiflora edulis* **f.** *flavicarpa* **Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Mestrado em Fitotecnia. 94 p. 2002.

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

AITKEN-CHRISTIE, J.; ZOBAYED, T. & SMITH, M. A. L. (Eds). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, Kluwer Academic, p. 574, 1995.

ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of *Pelargonium zonale* plantlets. **Acta Horticulturae**, 221:361-366, 1987.

ARAI, S.; ASAO, H. & KOBATAKE, H. The effect of CO_2 enrichment on the growth and quality of strawberry plantlets regenerated from a shoot-tip culture. **Bulletin of the Nara Agricultural Experiment Station**, 22: 9-16, 1991.

ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A. & TAMÉS, R. S. Influence of CO_2 and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, 115:166-173, 2002.

BARRUETO CID, L.P. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 3:6-21, março/abril, 2001.

BIASI, L.A. Micropropagação de videiras. In: POMMER, C.V. (Ed.) **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 320-350, 2003.

BOUQUET, A. & TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis spp.*). In: JAIN, S. M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 319-352, 2003.

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

CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose** *in vitro* **e seleção de substratos para aclimatização** *ex vitro* **de morangueiro cv. Campinas (***Fragaria ananassa* **Duch.).** 1998. 108 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CALVETE, E.O.; KÄMPF ,A.N. & SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

CAPELLADES, M.; LEMEUR, R. & DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch acumulation and rate of photosyntesis in *Rosa* cultured *in vitro.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 25: 21-26, 1991.

COUCEIRO, M.A. **Organogênese** *in vitro* **em segmentos de hipocótilo de maracujazeiro amarelo (***Passiflora edulis* **f.** *flavicarpa* **Deg.).** Viçosa: UFV, 95 p. Tese de Mestrado. 2002.

CLAUMANN, A.D.; MIRANDOLA, D; STEINMACHER, D.A.; BORGHEZAN, M.; GUERRA, M.P. & SILVA, A.L. da. Efeito da sacarose no crescimento e nos parâmetros fotossintéticos de plântulas de videiras cultivadas *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Resumos Expandidos**. CD-ROM.

DEBERGH, P.C. Aclimatization techniques of plants from *in vitro.* **Acta Horticulturae,** 289: 291-300, 1991.

DESJARDINS, Y.; GROSSELIN, A. & YELLE, S. Acclimatization of *ex-vitro* strawberry plantlets in CO_2 - enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 112: 846-851, 1987.

EDELMAN, J. & HANSON, A.D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. **Planta**, 98:150-156, 1971.

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

GROUT, B.W.W. & MILLAM, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany**, 55:129-131, 1985.

GUIMARÃES, P.T.C.; PASQUAL, M. & MIRANDA, A.M.P. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação “in vitro” da samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, 23:309- 316,1999.

HDIDER, C. & DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell,Tissue and Organ Culture**, 1:27-33, 1994.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N.N.J. & PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’, durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, 25:31-37, 2001.

KADLECEK, P., TICHÁ, I., HAISEL, D., CAPKOVÁ, V. & SCHAFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science,** 161: 695-701, 2001.

KATAEVA, N.V.; ALEXANDROVA, I.G.; BUTENKO, R.G. & DRAGAVTCEVA, E.V. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 14:31–40; 1991.

KITAYA, Y.; ARIMA, K. & TAKAHASHI, A. Visualization and analysis of air currents on plant tissue culture vessels. **Environment, Control in Biology**, 35:139-141, 1997.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.447-469, 1991.

KOZAI, T. & IWABUCHI, K. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 25:107-115, 1991.

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

LANGFORD, P.J. & WAINWRIGHT, S. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro.* **Annals of Botany**, 60:633-640, 1987.

LIM, L.; JOSEPH, C. V. & YELENOSKY; G. Effects of light intensity, sugar and CO_2 concentrations on growth and mineral uptake of *Dendrobium* plantlets. **Journal of Horticultural Science**, 67:601-611, 1992.

McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. IN: DAVIS, T.; HAISSIG, B.E. & SANKLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland-Oregon: Dioscorides, v. 2, p. 289-299, 1988.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S. & KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO_2–enriched condition with decresed sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, 103: 51-63, 2004.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, H.S.; PARK, Y.M.; ASWATH, C. & JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the

hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99: 199–205, 2004.

RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M.E. & TIZIO, R. Pre-acondicionamento y aclimataccion en condicciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, 52:73-82, 1991.

SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I. & LEMOS, E. E. P.. Enraizamento de *Annona glabra* L. em condições autotróficas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. Anais... Lavras, MG: UFLa/FAEPE. p.296, 2003.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. & OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 120:152-161, 2004.

SOLAROVA, J.; DIMITROVA, V. & SLAVTCHEVA, T. Photosynthesis and growth of tobacco plants in dependence on carbon supply. **Photosynthetica**, 23:629-637, 1989.

SRISKANDARAJAH, S. & MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple factors affecting root formation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, 56:71-76, 1981.

TSAY, H.S.; LEE, C.Y.; AGRAWAL, D.C. & BASKER, S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 42:445–449, 2006.

YAMADA, Y. & SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, 19:691-699, 1978.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Programa de Análises Estatísticas e Genética. SAEG 8.0, **UFV-MG**, 2000.

VIÑA, G. de la; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.L.; PARRY, M.A. & LOWLOR, W. Effects of CO_2 and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. **Plant Physiology & Biochemistry**, 37:587-595, 1999.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO PRECURSOR (ACC) E DO INIBIDOR (STS) DE ETILENO NO COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO DE *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* E *Vitis riparia* CULTIVADAS *in vitro*

1- INTRODUÇÃO

Durante o cultivo de plântulas *in vitro* em recipientes fechados ocorrem alterações da composição gasosa e ambiente. Produtos voláteis como etileno podem se acumular e inibir o crescimento de plantas e o desenvolvimento de habilidades fotossintéticas (De Proft *et al.,* 1985). Além disto, podem ocorrer anomalias nos estômatos, maior acúmulo de reservas ou biomassa, dificultando a micropropagação e a aclimatização, que proporcionam elevadas perdas de plantas no processo de transferência para as condições *ex vitro* (Sciutti & Morini, 1993; Desjardins, 1995; Pospísilová *et al.,* 1999).

O etileno é um hormônio gasoso que pode ser produzido em quase todos os tecidos vegetais. Embora a taxa de produção dependa do tipo de tecido e do estádio de desenvolvimento da planta, em geral, as regiões meristemáticas e as regiões dos nós são as mais ativas na síntese de etileno (Taiz & Zeiger, 2004).

Apesar de ser freqüentemente associado ao amadurecimento, o etileno está envolvido em diversas etapas do ciclo da planta, tais como, germinação de sementes, crescimento de plântulas, abscisão de folhas e pétalas, senescência de órgãos, respostas a estresses bióticos e abióticos (Schaller & Kieber, 2002). As propriedades do etileno são complexas, pois há interação de diversos outros hormônios e cascatas de sinalização (Taiz & Zeiger, 2004).

A metionina é a precursora da biossíntese do etileno, ocorrendo à partir da sua conversão a S-adenosil-metionina (SAM). A conversão do SAM à ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é a etapa limitante da rota, a qual é catalisada pela enzima sintase do ACC. A ultima etapa é a

conversão do ACC em etileno, onde há necessidade de O_2 e é catalisada pela enzima oxidase do ACC (Buchanan *et al.*, 2000).

No entanto, algumas medidas podem ser adotadas a fim de amenizar a ação ou a síntese do etileno. O aminoetóxi-vinil-glicina (AVG) é um potente inibidor do etileno, atuando na sintase do ACC que é a enzima-chave da síntese de etileno. Altas concentrações de íons cobalto inibem a conversão do ACC para etileno. Além desses, a síntese de etileno é inibida pelos inibidores da oxidação, acetilcolina e agentes quelantes, que reduzem o oxigênio necessário para a conversão do ACC em etileno (George, 1993).

Os íons prata são potentes inibidores da ação do etileno, tendo uma ação bem específica, não induzida por nenhum outro íon metálico. O íon prata pode substituir o cobre na ligação de alta afinidade impedindo as alterações que normalmente ocorrem na proteína quando o etileno liga-se ao receptor (Taiz & Zeiger, 2004).

George (1993) e Pua (1999) sugeriram, como via de regra, que o etileno não seja suplementado nos meios de cultivo, pois invariavelmente se acumula nos recipientes de cultivo. A quantidade acumulada é dependente da taxa de produção dos tecidos e das taxas de trocas gasosas nos recipientes, pois, embora os recipientes utilizados permitam a saída relativa de etileno, sua produção freqüentemente excede à perda, resultando em acúmulo.

Os processos morfogênicos podem ser fortemente influenciados pelo etileno, promovendo ou inibindo a regeneração do material vegetal em várias espécies, tais como: *Nicotiana tabacum* (Biondi *et al.*, 1998), *Malus domestica* (Ma *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Carvalho *et al.*, 2000), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Barbosa *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2003), *Carica papaya* (Magdalita *et al*., 1997; Koehler, 2004), *Bixa orellana* (Paiva Neto, 2002) e *Arachis hypogaea* (Ozudogru *et al*., 2005).

O etileno pode ter efeitos inibitórios ou promotores dependendo de sua concentração, existindo um ponto ótimo e um nível limite de concentração em cada caso (Hatanaka *et al.*, 1995). Algumas das dificuldades no estudo do etileno se devem ao fato que o etileno liberado pode tanto ativar autocataliticamente sua produção, como inibí-la (Arigita *et al.*, 2005). Segundo estudos realizados por Alexander & Grierson (2002) e

Wild *et al.,* (2005), são propostos dois sistemas para a regulação do etileno em plantas climatéricas: 1) durante o crescimento vegetativo normal, sendo o etileno produzido em nível basal em todos os tecidos, mesmo em frutos não climatéricos, com a produção auto-inibitória; 2) durante o amadurecimento e senescência, sendo a produção autocatalítica.

A sensibilidade de plântulas ao etileno está relacionada às características climatéricas do fruto (Jona *et al.,* 2002).

Tem se observado alta sensibilidade do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) ao etileno, afetando o desenvolvimento de ápices caulinares, rizogênese, segmentos nodais e regeneração *de novo* de ramos a partir de explantes de hipocótilo (Faria & Segura, 1997; Barbosa, 1999; Barbosa *et al.,* 2001; Reis, 2001; Reis *et al.,* 2003).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo dos efeitos do etileno sobre as características morfofisiológicas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* e *Vitis riparia* cultivadas *in vitro*, pela suplementação do promotor ACC (ácido 1-carboxílico1-aminociclopropano) e do inibidor STS (tiosulfato de prata) de etileno ao meio de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de cultivo *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos Vegetais (LCTII), do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, Brasil.

2.1 - Material experimental e obtenção das plantas

Como fonte de explantes, foram utilizadas plantas de videira do porta-enxerto 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* X *Vitis rotundifolia*) e *Vitis riparia*, provenientes do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Paraná/PR.

Os explantes foram micropropagados por subcultivos mensais, sob condições assépticas, sendo utilizados segmentos nodais contendo uma ou duas gemas vegetativas. Os explantes foram cultivados em meio de cultura constituído por minerais e nutrientes de ½ MS (com os sais reduzidos à metade) (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas, acrescidos de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose, 100 $mg.L^{-1}$ de inositol e solidificado com 6,5 $g.L^{-1}$ de ágar (Merck, Germany). O meio teve pH ajustado para 5,8 e foi autoclavado a 121°C e pressão de 1,5 kg cm^{-2}, durante 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 $\pm$ 2 ºC, sob fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 36 µmol m^{-2} s^{-1}, por um período de 45 a 60 dias.

2.2 – Implantação do experimento

Foram utilizados explantes assépticos de segmentos nodais de 'VR043-3' e *Vitis riparia*, contendo uma ou duas gemas e uma folha. Os explantes foram cultivados em três meios de culturas diferentes, um meio contendo os sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) reduzido à metade (MS/2), MS/2 + 10 µM de STS (tiosulfato de prata, agindo como inibidor da ação do etileno) e MS/2 + 3 µM de ACC (ácido 1-carboxílico1-aminociclopropano, agindo como promotor da síntese de etileno) (Reis, 2001) e vitaminas, acrescidos de 100 $mg.L^{-1}$ de inositol, 30 $g.L^{-1}$ de sacarose

e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar (Merck, Germany). O meio teve o pH ajustado para 5,8 e acondicionado em frascos de vidro com capacidade para 240 mL, e contendo 40 mL de meio de cultura e ,então, autoclavado a 121°C e 1,1 Pa por 20 minutos.

As substâncias foram filtro-esterilizadas em filtro Millex-GS (Millipore, USA) com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro, sendo, então, acrescidas ao meio de cultura durante o resfriamento (aproximadamente 45°C), em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro previamente autoclavados. O STS foi preparado vertendo-se uma solução de tiosulfato de sódio em cristais de nitrato de prata a uma proporção molar final de 4:1 (tiossulfato:prata) (Reid *et al.*, 1980).

O experimento foi conduzido em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2°C, com regime luminoso de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 µmol m^{-2} s^{-1} (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil)

2.3 – Características avaliadas

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas (NF), número de entrenó, área foliar, comprimento da parte aérea (CPA), comprimento radicular (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), percentagem de alocação em massa para a parte aérea e raiz (%), determinação de pigmento: clorofilas *a, b* e totais e carotenóides, mensuração de etileno acumulado aos (7; 14; 21; 28; 35; 42; 49 e 56 dias após inoculação dos explantes -DAI), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), análises anatômica: microscopia de luz (morfometria) e microscopia eletrônica de varredura**.**

2.4 – Análises morfométricas

Foram realizados estudos anatômicos em cada tratamento a fim de monitorar os efeitos sobre as estruturas celulares. Para isso, foram usadas a terceira folha de cada planta. As amostras foram coletadas e fixadas em Karnovsky (1965). Após lavagem em solução-tampão, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica) e

polimerizadas por 15 horas a 70 °C, em estufa. Os blocos foram cortados em secções de 8 µm de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica). A coloração foi feita com Azul de Toluidina a pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981), por 10 minutos e as lâminas foram montadas em resina sintética Permount®. As observações e os registros fotográficos foram realizados em microscópio de luz (Olympus – AX 70) conectado ao sistema de fotomicrografia (Olympus U–Photo, Japão), do Laboratório de Anatomia Vegetal localizado no Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

As análises micromorfométricas foram realizadas com o auxílio do programa Image Pro Plus 4.5, utilizando-se nove repetições e seis medições por estrutura anatômica.

2.4.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965), lavadas em tampão cacodilato três vezes por 10 minutos cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e desidratadas em série etílica. Após, foram secas ao ponto crítico com CO_2 líquido (Bozzolla e Russel, 1992), utilizando um equipamento Balzers (Modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), fixadas em "stubs" e submetidas à deposição metálica com ouro, por pulverização catódica em equipamento Balzers (Modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (Modelo 1430VP), no Núcleo de Microscopia e de Microanálises da UFV.

2.5 – Comprimento da parte aérea e radicular, massas frescas e secas

O comprimento das plantas foram mensurados com o auxílio de paquímetro digital (Digimess).

Para a mensuração da massa seca, as plantas foram secas em estufa a 70 ºC por um período de tempo de 48 horas, após esse tempo, foram pesadas em balança analítica (Sartorius – SBP10S).

2.6 – Pigmentos foliares

Na determinação dos pigmentos foliares, foram utilizadas as mesmas metodologias empregadas no capítulo 1.

2.7 – Mensuração de etileno

A mensuração dos níveis de etileno foi realizada no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Para tal, foi utilizado equipamento de cromatografia gasosa Hewlett-Packard 5890, series II, equipado com coluna de aço inoxidável empacotado com Poropak-Q (80-100 mesh), de 3,2 mm de diâmetro interno e 1,5 m de comprimento, tendo como fase móvel o nitrogênio, com fluxo de 30 ml s^{-1}. A temperatura da coluna foi de 60 °C, 75 °C a do injetor e 135 °C no detector de ionização da chama, e temperatura ambiente de 25 ± 1°C. A injeção da amostra no equipamento foi feita utilizando-se seringa para insulina de 1cm^3 com agulha tipo 29G de ½ polegada (B-D, Becten Dickinson and Company, EUA). O etileno acumulado foi expresso em pmol g^{-1} de matéria fresca (MF).

2.8 – Delineamento experimental

Experimento do tipo fatorial 3 x 2, sendo três tipos de meio de cultura (MS/2; MS/2 + 10 µM de STS e MS/2 + 3 µM de ACC) e duas cultivares de videira (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *Vitis rotundifolia*), com cinco repetições.

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para se verificar a significância dos fatores estudados e então a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa de análises estatística Sisvar 4.3 (UFLA-MG, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Produção e acúmulo de etileno

A produção e acúmulo de etileno nos meios de cultura apresentou-se bastante expressivo para as duas cultivares de videira ao longo do tempo de cultivo. Analisando-se a produção e acúmulo de etileno para *Vitis riparia*, cultivada em meio contendo o promotor de etileno ACC, observa-se que seu pico se deu ao sétimo dia após a inoculação dos explantes (DAI) com concentrações em torno de 4000 $pmol.g^{-1}$MF, decaindo abruptamente e permanecendo constante até o 35 DAI, aumentando bruscamente após o 42 DAI, devido, provavelmente, à senescência natural das plantas após este tempo de cultivo (Figura 1).

O etileno é um hormônio gasoso, que está envolvido em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a germinação até a morte. Apesar de estar freqüentemente associado ao amadurecimento e à senescência, a ele também são atribuídos outros efeitos fisiológicos, como abscisão de folhas, flores e frutos, crescimento de plântulas, germinação de sementes e respostas a estresses bióticos e abióticos (Barbosa, 1999).

V. riparia cultivada no meio MS apresentou pico de produção de etileno no 21 DAI com concentrações de 580 $pmol.g^{-1}$ MF, permanecendo praticamente constante até a ultima avaliação do experimento, aos 56 DAI. No meio de cultivo acrescido de tiosulfato de prata (STS) apresentou acumulo de etileno relativamente baixa quando comparada ao meio MS, até o 14 DAI, com produção e acúmulo de 250 $pmol.g^{-1}$MF de etileno, decaindo e permanecendo constante até o 42 DAI, onde a partir de então aumentou bruscamente, chegando a se igualar aos níveis de 470 $pmol.g^{-1}$ MF de etileno acumulado no meio MS. Este fato evidencia que a partir de então o STS adicionado ao meio de cultivo já não se apresentava eficiente para conter os elevados níveis de etileno acumulado ao meio (Figura 1).

Este aumento da produção de etileno durante o desenvolvimento de plantas pode estar relacionado às aicio das(codiaçõestamcienai0s)Tj/TT3 1 Tf-0.0021

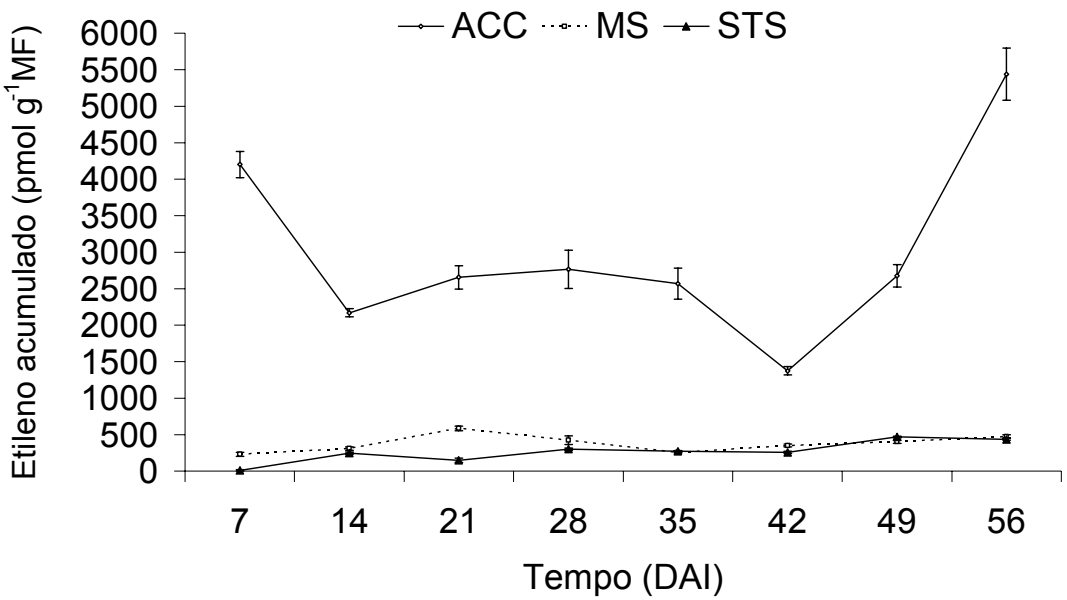


Figura 1. Acúmulo do etileno em frascos de cultivo contendo plantas de *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Barras indicam o erro padrão da média ao longo dos tempos de avaliação.

Diferentemente ao observado em videiras, Barbosa (2006) ao estudar meios de cultivo indutor e não indutor de hiperidricidade em morangueiro 'Dover', observou maior nível de acúmulo de etileno após o quinto dia de cultivo em meio indutor de hiperidricidade, e somente ao décimo dia para o meio não indutor.

Para a *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* cultivada em meio contendo ACC, o pico de etileno se deu ao sétimo DAI (Figura 2), com concentração em torno de 3000 pmol.g^{-1} MF, permanecendo constante até 21 DAI; decrescendo e voltando a aumentar após 42 DAI, provavelmente pelo mesmo motivo de senescência ocorrido em *V. riparia.*

Os resultados de acúmulo de etileno no cultivo de videiras, foram semelhantes aos observados por Dias (2006), que obteve 300 pmol.g^{-1}MF para *P. cincinnata*, ao nono dia de cultivo e 2000 pmol.g^{-1}MF para *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Assim como para a *V. riparia*, em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* cultivada no meio MS o pico de produção e acúmulo de etileno se deu aos 21 DAI; com concentração de 750 pmol.g^{-1} MF de etileno, decrescendo e

voltando a aumentar após 42 DAI, chegando a 56 DAI com acúmulo significativamente elevado em torno de 940 pmol.g^{-1} MF de etileno (Figura 2), superior ao acumulado pela *Vitis riparia*, que foi aproximadamente 470 pmol.g^{-1} MF.

O pico de produção e acúmulo de etileno quando a *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* foi cultivada em meio contendo STS, se deu a 21 DAI; com concentrações em torno de 180 pmol.g^{-1} MF, decaindo assim como nos demais meios e incrementando seu acúmulo após 42 DAI (Figura 2). No entanto, essas concentrações foram inferiores às acumuladas no meio MS. Este fato se deve a maior eficiência do STS no controle dos níveis de etileno produzido, devido ao fato de que esta cultivar pode produzir quantidades significativamente menores de etileno ou por ambas as possibilidades.

Resultados encontrados por Zhu & Chen (2005) indicam que grande parte do etileno produzido pelas plantas pode ser redundante para o crescimento e desenvolvimento durante a formação de ramos adventícios. No entanto, este comportamento não foi observado em videiras, onde apresentaram crescimento e desenvolvimento inibidos, quando cultivadas em meio suplementados com ACC.

O etileno afeta a transcrição de genes envolvidos em inúmeros processos biológicos, do metabolismo à transdução de sinais, incluindo degradação de proteínas, transporte de água, de peptídeos e de íons, metabolismo de parede celular e metabolismo de lipídios (Chen *et al.*, 2005).

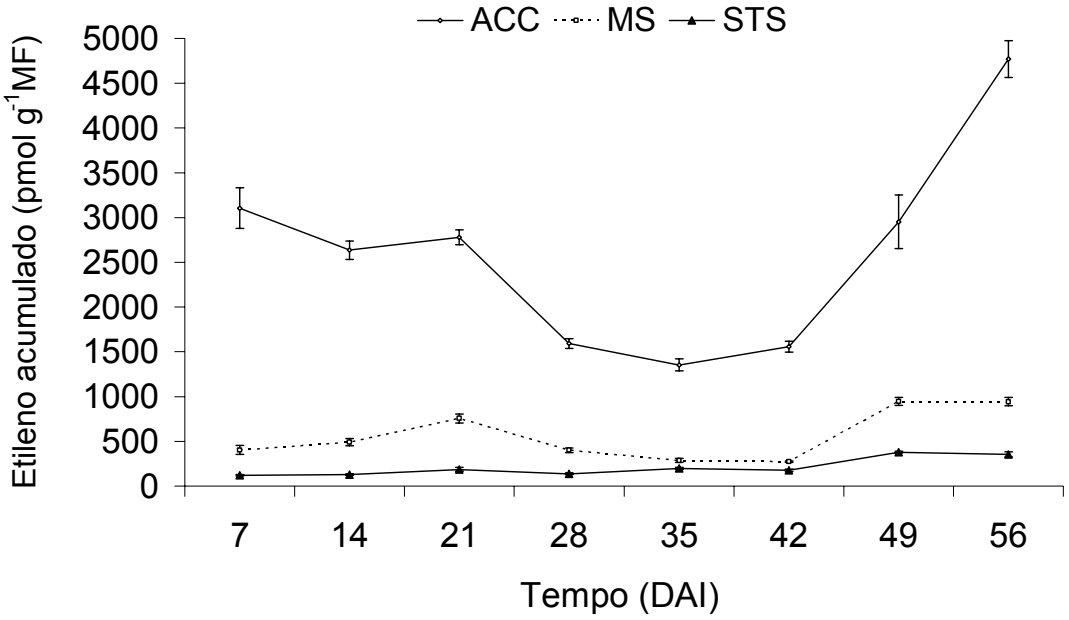


Figura 2. Acúmulo do etileno em frascos de cultivo com plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Barras indicam o erro padrão da média ao longo dos tempos de avaliação.

3.2 – Características Morfofisiológicas

3.2.1 – Parâmetros de crescimento

A influência dos meios de cultivo sobre o comportamento morfofisiológico de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* foi bem evidente nos parâmetros avaliados. O número de folhas e de entrenós foi severamente reduzido quando essas videiras foram desenvolvidas em meio contendo o promotor de etileno ACC, não sendo verificada diferença estatística entre os meios MS e o meio contendo tiosulfato de prata (STS); no entanto, esses meios apresentaram maior número de folhas e de entrenós (Figura 3A - B).

Analisando-se as características mensuradas de comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CR), pôde-se verificar que as cultivares apresentaram comportamentos diferenciados nos meios de cultivo, no entanto, com as mesmas tendências para as duas características em

questão. Tanto o CPA como o CR de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* quanto de *V. riparia* foram severamente influenciados pelos elevados níveis de etileno acumulado nos frascos de cultivo contendo o promotor ACC. *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* apresentou melhores resultados de comprimento da parte aérea e de raiz no meio MS (Figura 3C - D), onde foi observado maior acúmulo de etileno, em relação ao meio com STS. *V. riparia*, ao contrário, teve melhor desempenho para essas características em meio contendo STS.

Brotos de mamoeiro apresentaram maior crescimento e maior área foliar, quando o meio de cultivo foi suplementado com AVG (Magdalita *et al.,* 1997)

Foi observado que ambas as videiras apresentam sensibilidades diferenciadas aos níveis de etileno acumulado no ambiente de cultivo, parecendo ser *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* a mais tolerante aos níveis mais elevados de etileno produzidos e acumulados no meio MS.

Em concentrações acima de 0,1 $\mu L.L^{-1}$, o etileno altera o padrão de crescimento de plântulas pela redução da taxa de alongamento e aumento da expansão lateral, devido a reorientação dos microtúbulos (Taiz & Zeiger, 2004), podendo-se supor que níveis acima dos ideais podem ser responsáveis pela recalcitrância de várias culturas *in vitro* (Magdalita *et al*., 1997), alterando dessa forma, o padrão de crescimento das plantas.

Os resultados obtidos neste estudo com videiras, são coerentes aos relatados por Zobayed *et al.,* (2001) e Jeffrey (1998), onde observaram redução na concentração de etileno e aumento no comprimento em brotos de plantas de batata, quando se usou nitrato de prata como adsorvente de etileno.

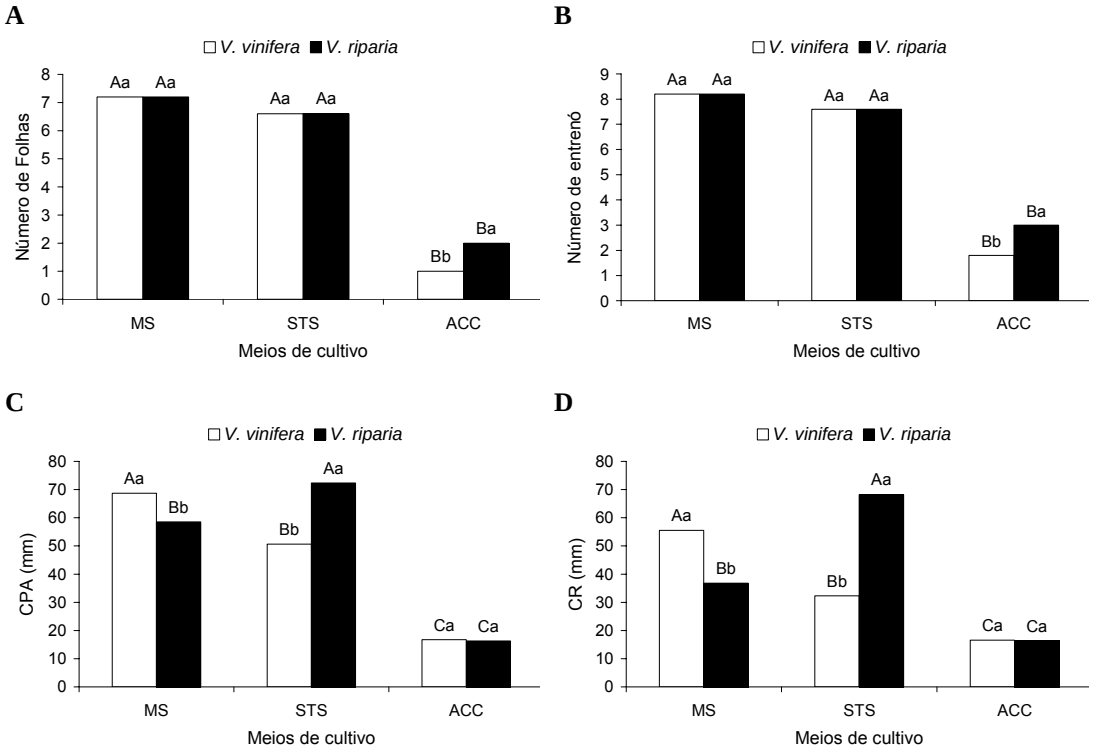
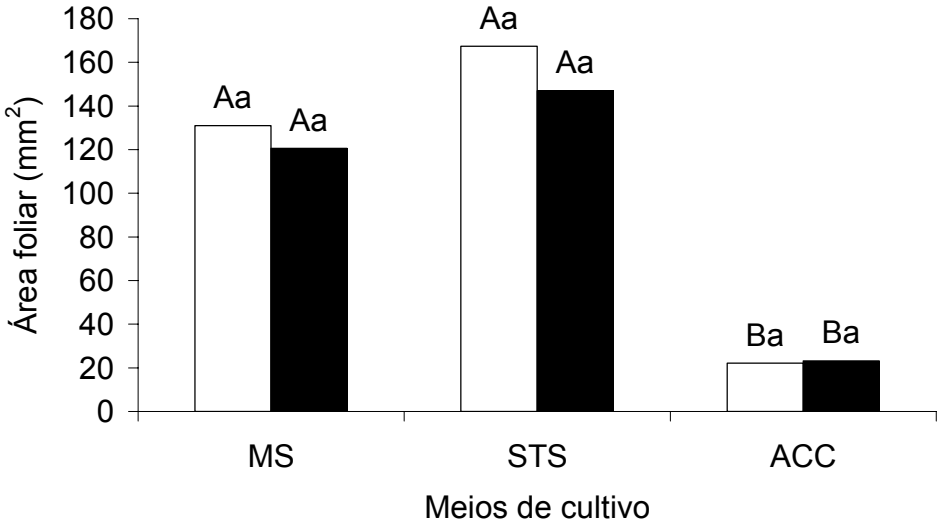


Figura 3. Número de folhas **(A**), número de entrenós (**B**), comprimento da parte aérea (CPA) (**C**) e comprimento radicular (CR) (**D**) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* e *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada tipo de meio de cultivo e letras maiúsculas comparam os tipos de meio para cada cultivar, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

A área foliar seguiu a mesma tendência do número de folhas para ambos os cultivares, quando crescidas no meio MS e STS, sendo estatisticamente diferentes apenas quando *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* foram cultivadas em meio contendo ACC, apesar de que em valores de área foliar o meio contendo STS foi visivelmente superior aos demais (Figura 4). A adição de STS mostrou-se eficiente, inibindo a ação do etileno sem que houvesse reflexos negativos nas respostas organogênicas.

A rota biossintética do etileno é bastante conhecida, tendo diversos estudos em cultura de tecidos com inibidores e promotores, caracterizando o seu papel nas respostas morfogênicas (Cameron *et al*., 1979; Katoh *et al*., 1987, Kumar *et al*., 1987; Chi *et al*., 1991; Adkins *et al*., 1993; Sarkar *et al*., 2002; Naik & Chand, 2003, Reis *et al*., 2003, Koehler, 2004).


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Área foliar (mm2)
Aa
Aa
Aa
Aa
Ba
Ba
MS
STS
ACC
Meios de cultivo

fresca de folhas e incremento significativo no tamanho das raízes (Zobayed *et al*., 2001)

Biondi *et al.* (1998) trabalhando com camadas subepidérmicas de tabaco observaram que com o bloqueio da ação do etileno, promovido pela ação do STS, o crescimento organizado foi inibido, mas o crescimento proliferativo indiferenciado não.

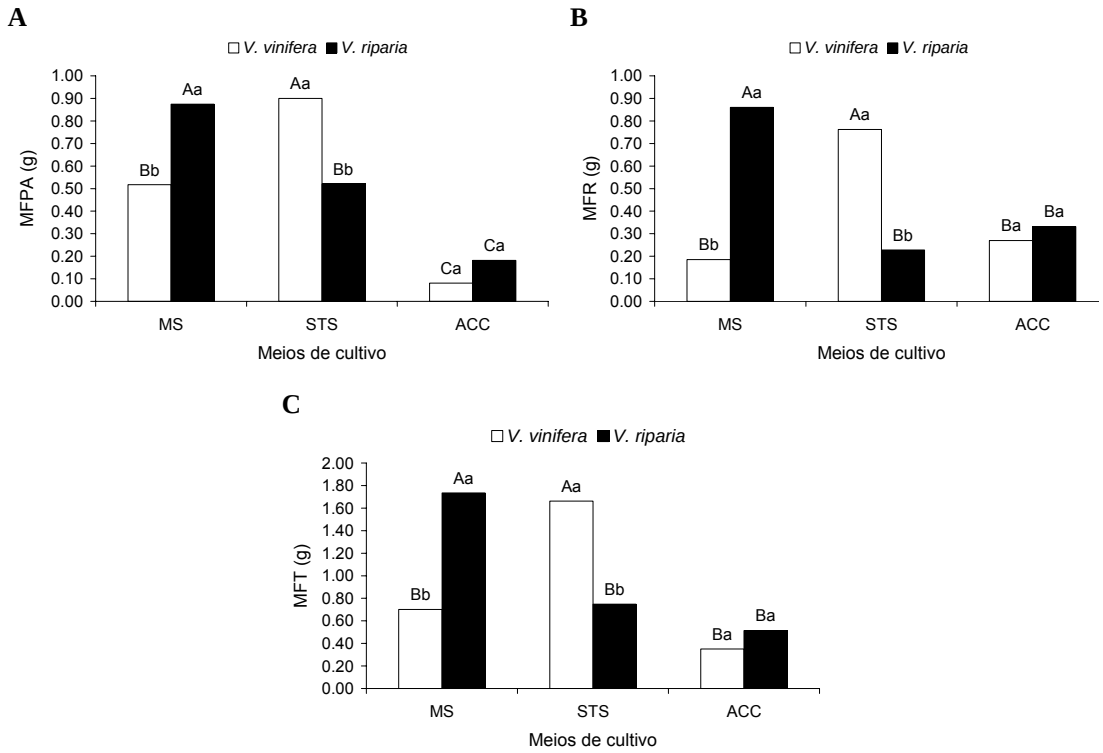


Figura 5. Massa fresca da parte aérea (MFPA) (**A**), massa fresca da raiz (MFR) **(B)** e massa fresca total (MFT) **(C)**, em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia e Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada tipo de meio de cultivo e letras maiúsculas comparam os tipos de meio para cada cultivar, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

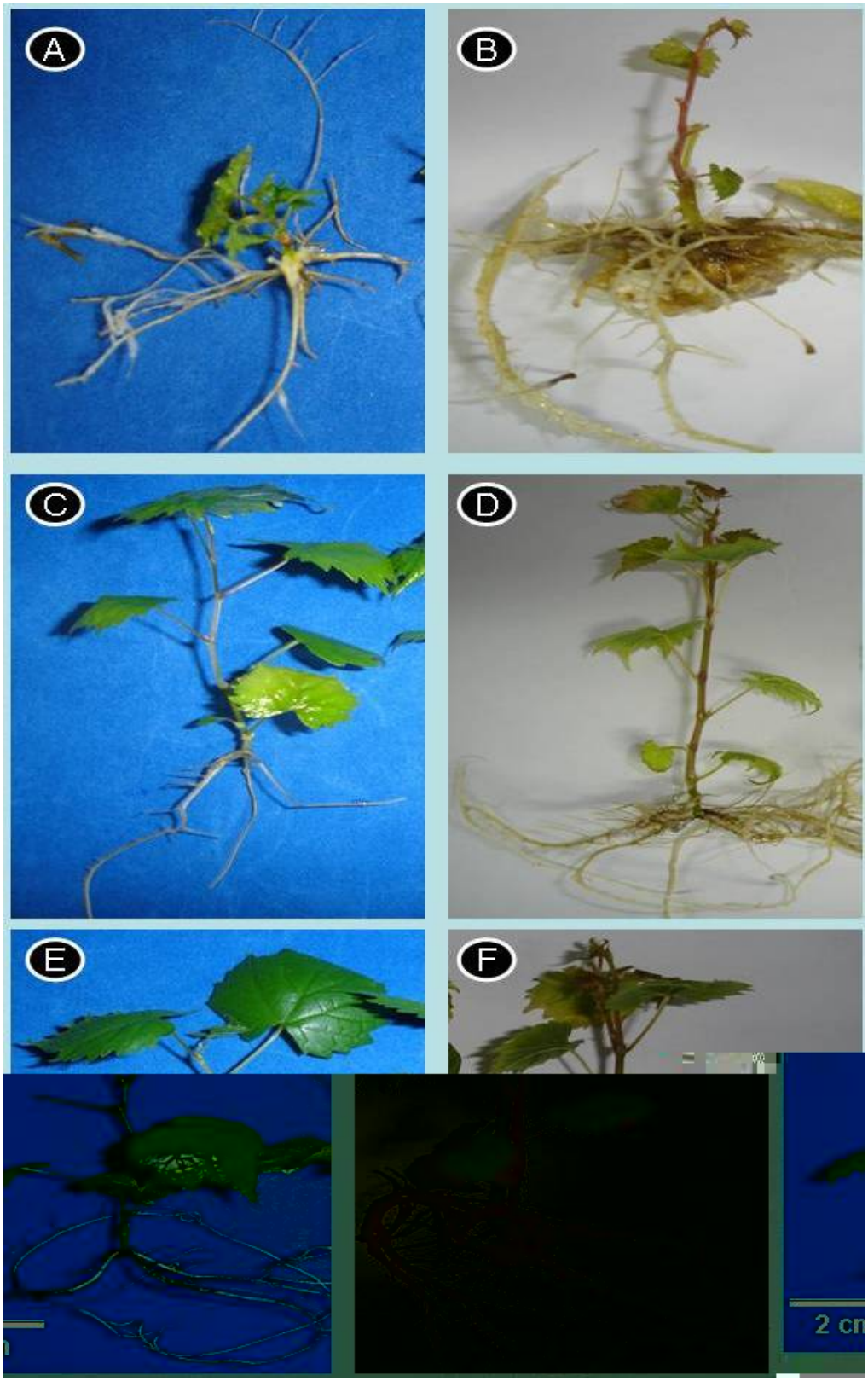


Figura 6. Plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (**A**, **C**, **E**) *e Vitis riparia* (**B**, **D**, **F**) propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: **A, B)** 1/2 MS + 3 µM de ACC; **C, D)** 1/2 MS; **E, F)** 1/2 MS + 10 µM de STS, após 60 dias de cultivo.

Através da mensuração dos dados de massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR) e massa fresca total (MFT), pode-se calcular a percentagem de alocação de nutrientes para a formação das respectivas massas, em ambas as cultivares sob os diferentes meios de cultivo.

Observou-se que *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* quando cultivada no meio MS, 73% dos nutrientes assimilados foram destinados para a formação da MFPA em relação à MFR, enquanto *Vitis riparia* investiu apenas 50% para a formação da MFPA, sob as mesmas condições (Figura 7B). Mostrando que as cultivares apresentam respostas distintas aos elevados, porém, tolerados níveis de etileno acumulado no meio MS, no qual *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* priorizou a formação da parte aérea em relação ao sistema radicular.

Em ambiente com menor acúmulo de etileno; no caso do meio de cultivo contendo STS, as cultivares apresentaram comportamento oposto ao meio MS. Sendo que para a *Vitis riparia* 70% dos nutrientes assimilados foram para a formação da MFPA, enquanto a *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* investiu apenas 50% (Figura 7B). No entanto quando ambas as cultivares foram desenvolvidas em meio de cultivo contendo ACC, onde foi verificado elevado acúmulo de etileno neste ambiente, foram obtidos investimentos significativamente superiores para a formação do sistema radicular, com 77 % e 64 % para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia*, respectivamente (Figura 7A).

Huxter *et al.* (1981) constataram que as respostas ao etileno ocorrem de diversas maneiras nos tecidos, dependendo do período de cultivo. Ao contrário do encontrado neste estudo, no início da cultura de calo de tabaco (primeiros cinco dias) o etileno derivado da aplicação de ACC e Ethephon inibiu a organogênese, enquanto que do 5° ao 10° dias o etileno endógeno favoreceu a formação de gemas.

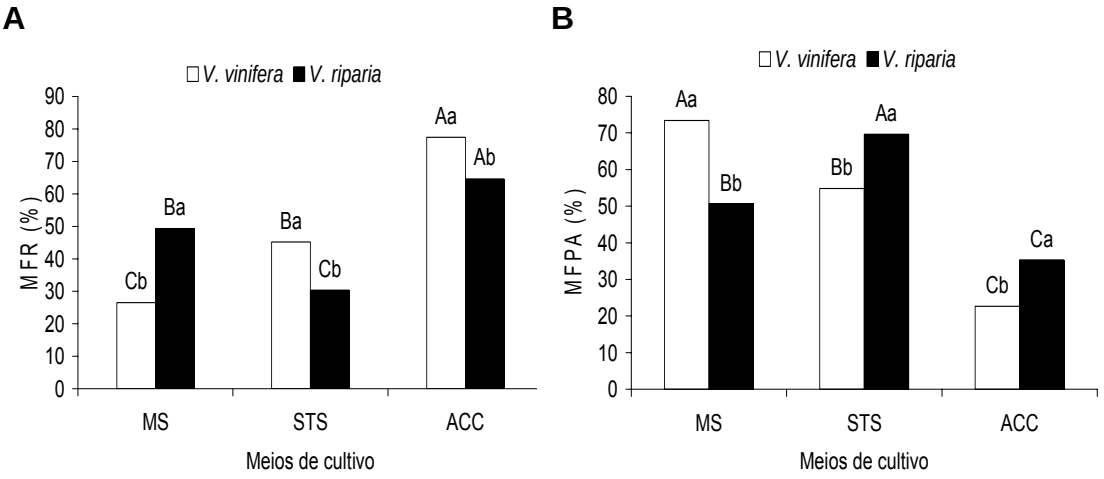


Figura 7. Percentagem de investimento de nutrientes para a formação do sistema radicular (MFR) **(A)** e percentagem de investimento de nutrientes para a formação de massa fresca da parte aérea (MFPA) **(B)**, em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia e Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada tipo de meio de cultivo e letras maiúsculas comparam os tipos de meio para cada cultivar, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Apesar da *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* ter apresentado maior investimento de nutrientes para a formação de MFPA quando cultivada no meio MS, a mensuração da massa seca da parte aérea (MSPA), do sistema radicular (MSR) e massa seca total (MST), mostram que a *V. riparia* apresentou melhores resultados em relação à *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, em todos os meios de cultivo. Isso se deve provavelmente pelo menor conteúdo de água, maior conteúdo de carbono, devido a *V. riparia* apresentar folhas mais espessas, caules de maior diâmetro e mais lignificados (Figura 6). Não sendo observada diferença estatística em massa seca, quando a *Vitis riparia* foi cultivada nos meios MS e STS (Figura 8 A-C).

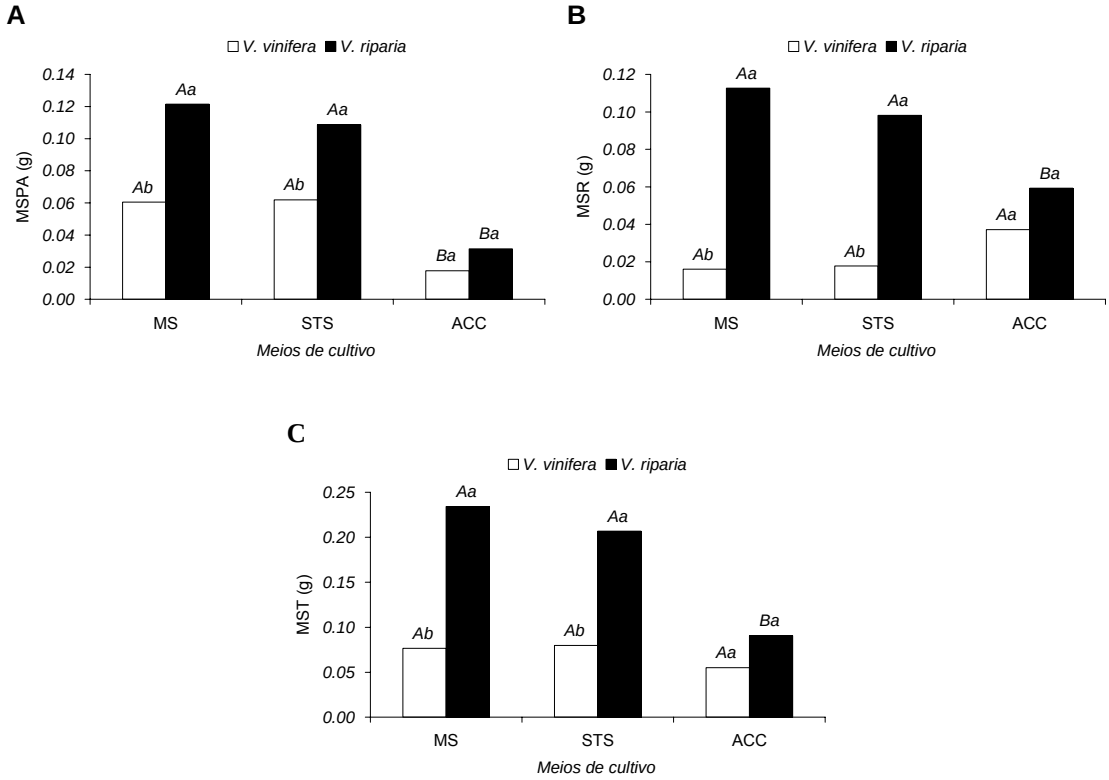


Figura 8. Massa seca da parte aérea (MSPA) **(A)**, massa seca da raiz (MSR) **(B)** e massa seca total (MST) **(C),** em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia e Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada tipo de meio de cultivo e letras maiúsculas comparam os tipos de meio para cada cultivar, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.2.2 – Pigmentos foliares

O conteúdo de pigmentos foliares foi influenciado diretamente pela interação dos fatores, meios de cultivo e cultivares. Sendo que o conteúdo de pigmentos variou de uma cultivar para outra quando submetidas aos diferentes meios de cultivo.

Quando se compara apenas *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* para os distintos meios de cultivo, observa-se que nos meios MS e STS o conteúdo de clorofila *a (*Chl *a)* foram praticamente os mesmos, não apresentando diferença estatística significativa entre eles. No entanto, quando a mesma foi submetida ao meio contendo ACC, com excessivos níveis de etileno acumulado, o conteúdo de Chl *a* foi reduzido de forma significativa. Nota-se que o acumulo expressivo de etileno no meio de cultivo MS não apresentou

efeito danoso sobre o conteúdo de Chl *a* para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, visto que apresentou conteúdo similar quando exposta ao meio de cultivo contendo STS com baixos níveis de etileno (Figura 9A).

O conteúdo de pigmentos foliares é fortemente influenciado pelo ambiente ao qual a planta foi desenvolvida. Borghezan *et al.* (2003) relatam que o teor de clorofila variou entre genótipos e entre os ambientes de cultura *in vitro* e *ex vitro*, sendo que os porta-enxertos VR039-16 e Paulsen 1103 apresentaram teores superiores *in vitro*, enquanto nos porta-enxertos VR043-43, R110, SO4 e Kober 5BB, os maiores valores de clorofila foram obtidos em casa de vegetação.

Vitis riparia parece ter maior sensibilidade aos elevados níveis de etileno acumulado, pois tanto no meio MS com moderados níveis de etileno acumulado, quanto no meio contendo ACC, foram obtidos conteúdos de Chl *a* e Chl *b* significativamente reduzidos (Figura 9 A-B). Contudo, se obteve melhor desempenho em conteúdo de Chl *a* quando esta cultivar foi mantida em meio com baixos níveis de etileno acumulado (STS). Estes resultados são condizentes com os obtidos por Magdalita *et al.* (1997), que trabalhando com segmentos nodais de mamão, observaram que a adição de 1,2 µM de AVG melhorou significativamente o conteúdo de pigmentos foliares e o desempenho da cultura.

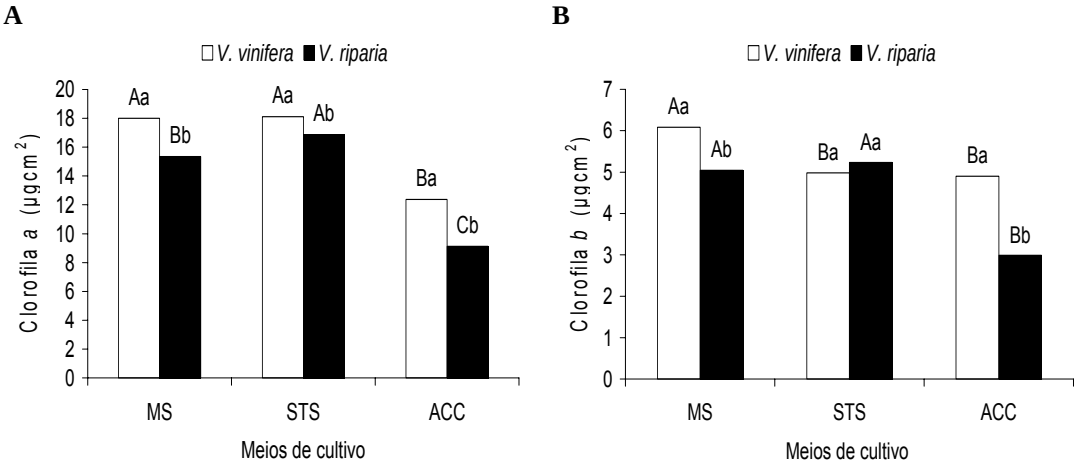


Figura 9. Teores de clorofila *a* **(A)** e clorofila *b* **(B)** em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* e *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada tipo de meio de cultivo e letras maiúsculas comparam os tipos de meio para cada cultivar, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os resultados da quantificação de clorofilas mostram uma significativa redução de clorofila *a* e *b*, principalmente para a *V. riparia*, o que poderia levar à diminuição da capacidade fotossintética dessas plantas. Resultados semelhantes foram relatados por Olmos *et al.* (1997). em tecidos hiperídricos de cravo.

Chama a atenção o expressivo conteúdo de carotenóides produzido pela *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* quando exposta a elevados níveis de etileno acumulado (Figura 10A), podendo ter uma estreita relação com os conteúdos de Chl *a* e Chl *b* nos meios MS e ACC (Figura 9A e 9B). Resultados semelhantes foram relatados por Paiva *et al.* (2003), ao estudarem diferentes intensidades luminosas em *Tradescantia pallida* cv. *purpurea,* onde o conteúdo de carotenóides foi elevado quando as plantas foram desenvolvidas em irradiâncias de 200 a 800 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Segundo Krause (1988) estes pigmentos foram associados à proteção do aparato fotossintético contra as ações de radicais livres de oxigênio, potencialmente formados em elevadas irradiâncias. Esta proteção da integridade das membranas dos tilacóides é fundamental à atividade da fotossíntese (Siefermann, 1987; Niyogi, 1999).

O conteúdo de clorofilas totais (Chl *a* + Chl *b*) mostra o efeito negativo de altos níveis de etileno acumulado sobre ambas as cultivares, porém no caso de concentrações de etileno pouco menos expressivas (MS), a *V. riparia* foi mais afetada; comparativamente a *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* (Figura 10B).

Plantas cultivadas sob determinados níveis de estresse podem ter seu conteúdo de pigmentos foliares reduzidos, o que pode também acarretar em problemas durante o processo de aclimatização, no caso de plantas cultivadas *in vitro*, comprometendo seu desempenho fotossintético. Assim como observado por Barbosa (2006), a hiperidricidade afetou significativamente os níveis de clorofila, sendo que, em brotos hiperídricos, os níveis de clorofila *a*, *b* e totais foram, respectivamente, em torno de 26, 36 e 29% dos níveis em plantas aparentemente normais.

A degradação de clorofila pode ocorrer por ação de clorofilases, lipoxigenases e, ou peroxidases. Isoenzimas de peroxidases são encontradas no interior dos cloroplastos e, na presença de peróxido de

hidrogênio e compostos fenólicos, catalisam a reação de degradação de clorofila (Niyogi, 1999). É possível que o etileno, que tem efeito sobre o aumento da produção de hidroperóxidos, também esteja relacionado com a degradação de clorofila pelo aumento da atividade da peroxidase.

A degradação dos pigmentos foliares envolve, por um lado, a degeneração das membranas tilacoidais e, por outro lado, ao efeito do etileno na senescência, como um fator desencadeador do processo (Matile *et al*., 1996).

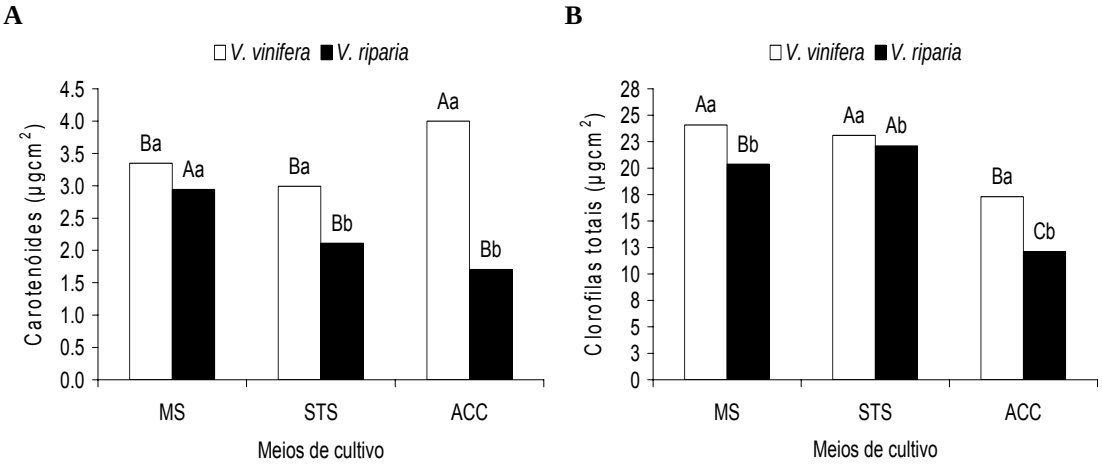


Figura 10. Teores de carotenóides **(A)** e clorofila totais **(B)** em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* e *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Letras minúsculas comparam as cultivares dentro de cada tipo de meio de cultivo e letras maiúsculas comparam os tipos de meio para cada cultivar, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.3 – Análises estruturais

3.3.1 – Morfometria

Através da análise de variância (ANOVA) para os dados das análises micromorfométricas, pôde-se verificar o efeito significativo da interação dos fatores: meios de cultivo x cultivares, sobre a estrutura anatômica das plantas estudadas.

O efeito dos meios de cultivo sobre a epiderme das videiras foi bem marcante e evidente. Verificou-se que *Vitis riparia* apresentou maior altura da face superior da epiderme ou adaxial quando cultivada em ambiente com elevados níveis de acúmulo de etileno, meio contendo ACC (17,6486 µm), seguido pelo meio MS (13,3964 µm) onde também acumulou expressivos níveis de etileno (Figuras 11A, 13 e 14). No entanto, quando cultivada em meios contendo STS (9,3262 µm), a altura da epiderme da face adaxial foi menor.

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

Para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, observa-se que a altura da epiderme adaxial foi significativamente menor do que em *V. riparia*, quando cultivadas em meio contendo ACC (13,7342 µm), e assim como na cultivar *V. riparia*, a altura foi menor quando as plantas cresceram em ambiente com baixo acúmulo de etileno (8,6530 µm). Este fato dá suporte às características morfofisiológicas já descritas anteriormente, em que *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* tolera níveis mais elevados de etileno acumulado (Figura 11A).

A altura da face inferior da epiderme ou face abaxial em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* foi significativamente inferior à de *V. riparia*, quando crescidas em meio contendo ACC e estatisticamente superior em comparação aos meio MS e STS, para ambas as cultivares (Figura 11B).

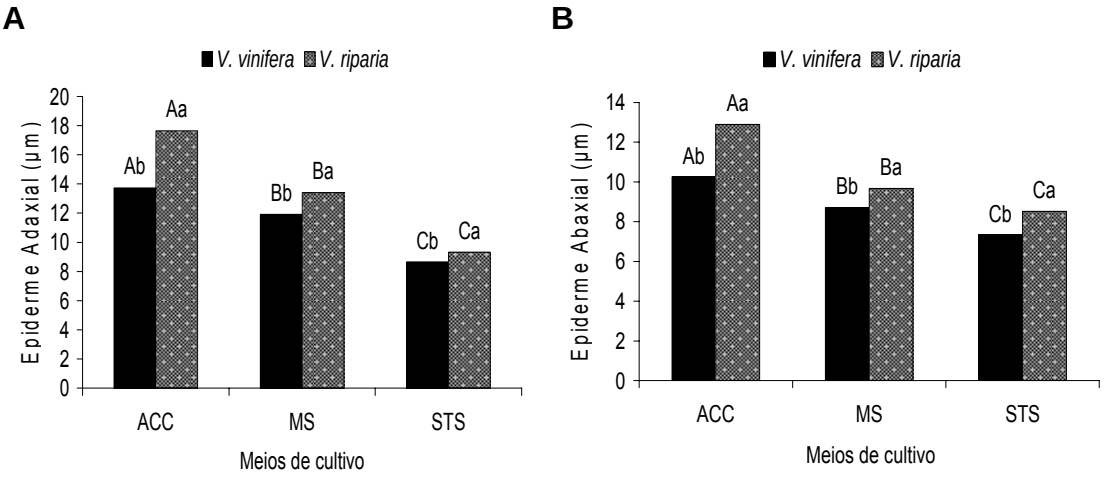


Figura 11. Morfometria da epiderme, face adaxial **(A)** e face abaxial da epiderme **(B)** em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia e Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. As letras minúsculas indicam a comparação entre cultivares, dentro de cada tipo de meio de cultivo, e as maiúsculas comparam cada cultivar nos distintos meios de cultivo, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O parênquima paliçádico é formado por uma única camada de células longas, dispostas em forma de paliçada e o parênquima lacunoso apresenta duas ou três camadas de células arredondadas, com abundância de espaços intercelulares e mais largas (Figura 13).

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

Foram obtidas maiores alturas do parênquima paliçádico e parênquima lacunoso, para *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* e *V. riparia* nos meios de cultivo ACC, MS e STS, respectivamente. Observa-se uma relação de maior altura de parênquimas, com os maiores níveis de etileno acumulado no ambiente de cultivo, podendo esta relação ser um artifício usado pela planta para proteger o citoplasma das células do mesofilo e,ou, aumentar a superfície de contato para captação de energia luminosa (Figuras 12A-B e 13).

Parece que o etileno é fundamental na diferenciação dos tecidos da folha. Quando a síntese e,ou ação do etileno é bloqueada, há uma menor

diferenciação dos tecidos: epiderme, das duas faces, parênquima paliçádico e parênquima lacunoso.

Segundo Apezatto-da-Gloria & Carmello-Guerreiro (2006) as células do parênquima clorofiliano podem se dispor de modo a favorecer uma grande superfície de contato com as outras células, facilitando à captação de energia luminosa e dos elementos gasosos necessários à realização da fotossíntese.

Observou-se aumento na altura do mesofilo e consequentemente maior altura do limbo foliar, para ambas as cultivares estudadas, quando desenvolvidas em ambiente com elevado acúmulo de etileno (Figuras 12C-D e 13). Segundo Bjorkman (1981) o aumento em espessura das células do parênquima paliçádico é resultante de um alongamento deste tecido no sentido abaxial, o que aumenta significativamente o volume do mesofilo por área foliar e o volume do mesofilo por volume foliar. Klich (2000) afirma que esta característica reflete um mecanismo estrutural que potencializa a fotossíntese por unidade de área foliar e habilita a uma maior eficiência no uso da água.

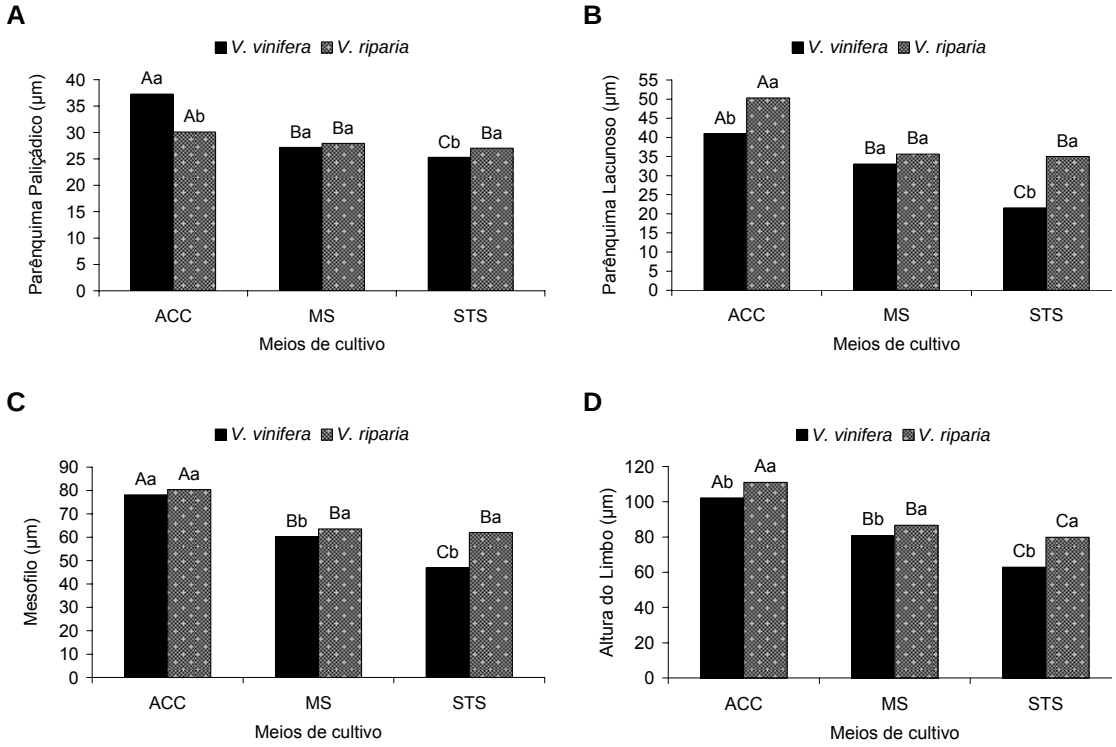


Figura 12. Análises morfométricas das estruturas celulares em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* e *Vitis riparia* propagadas *in vitro*, em diferentes tipos de meios de cultivo: 1/2 MS, 1/2 MS + 10 µM de STS e 1/2 MS + 3 µM de ACC. Parênquima paliçádico **(A)**, parênquima lacunoso **(B)**, mesofilo **(C)** e altura do limbo **(D)**. As letras minúsculas indicam a comparação entre cultivares, dentro de cada tipo de meio de cultivo, e as maiúsculas comparam cada cultivar nos distintos meios de cultivo, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os resultados das análises micromorfométricas encontrados neste trabalho são condizentes com as caracterizações fotográficas (microscopia de luz) relatada por Barbosa (2006), que compara folhas hiperídricas e normais de videiras, mostrando que as folhas hiperídricas possuem um parênquima lacunoso desorganizado, com largos espaços intercelulares, reduzido número de células e elevada área celular. O autor sugere que o engrossamento da folha seja devido ao aumento no tamanho das células do mesofilo. Assim como em cravo (Olmos & Hellín 1998), as folhas hiperídricas de videira, apresentam células epidérmicas duas vezes maiores que as de folhas normais.

Nobel (1991) cita que os fatores ambientais podem afetar a anatomia foliar, especialmente durante o desenvolvimento deste órgão, podendo

causar mudanças no número de camadas do mesofilo. De acordo com Klich (2000) e Kürschner *et al.* (1998), o aumento da espessura da folha está relacionado ao aumento dos tecidos do mesofilo.

Através da microscopia de luz, pôde-se observar e distinguir claramante que o parênquima paliçádico e parênquima lacunoso encontram-se em lados opostos da folha nas videiras estudadas, sendo esta classificado como dorsiventral ou bilateral (Figura 13).

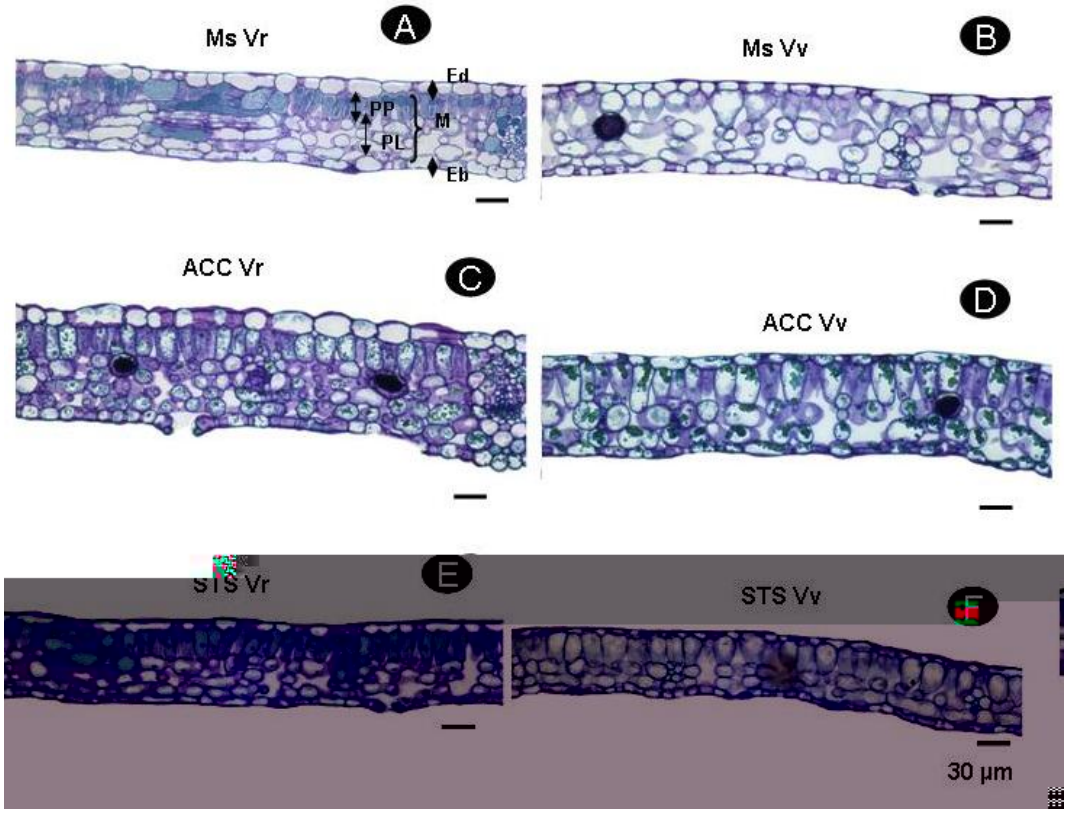


Figura 13. Comparação das estruturas celulares entre as cultivares *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (Vv) em B, D, F e *Vitis riparia* (Vr) em A, C, E nos diferentes meios de cultivo: **A, B)** 1/2 MS; **C, D)** 1/2 MS + 3 µM de ACC; **E, F)** 1/2 MS + 10 µM de STS. Epiderme da face adaxial **(Ead)**, parênquima paliçadico **(PP)**, parênquima lacunoso **(PL)**, epiderme da face abaxial **(Eab)** e mesofilo **(M)**. As barras indicam 30 µm.

3.3.2 – Microscopia eletrônica de varredura

Através das análises da superfície foliar, na face adaxial da epiderme (Ead) e da face abaxial (Eab) de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (Vv) e *Vitis riparia* (Vr), pode-se confirmar a característica hipoestomática das folhas destas videiras.

As análises estruturais revelaram que os estômatos de ambas as cultivares sofreram drásticas alterações, quando as plantas foram submetidas ao meio contendo ACC, no qual foram mensurados excessivos níveis de etileno acumulado. Em *Vitis riparia*, verificou-se uma maior deposição de cera epicuticular na face adaxial da epiderme como resposta ao elevado nível de etileno no ambiente de cultivo (Figura 14A) e danos na superfície da epiderme. Na face abaxial da epiderme, ocorreram danos com células-guarda deformadas e estômatos mal formados (Figura 14B).

Para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*, não foi observado deposição de cera epicuticular quando as plantas foram submetidas aos meios de cultivo contendo ACC, porém ocorreram injúrias na superfície da epiderme adaxial, assim como células-guarda quebradas e estômatos mal formados (Figura 15A e 15B). Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de pimentão (Fontes *et al.,* 1999), cravo (Aiv & Ariel, 1994; Olmos & Hellìn, 1998), eucalipto (Louro *et al.,* 1999), jojoba (Apóstolo & Llorente, 2000) e em berinjela (Picoli *et al.,* 2002), onde foram observadas anormalidades na forma e no tamanho das células-guarda.

Tanto para *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* como para *Vitis riparia* desenvolvidas nos meios MS e STS os estômatos apresentavam-se aparentemente normais, com formato mais arredondado no meio MS (Figuras 14D e 15D) e elíptico no meio contendo STS (Figuras 14F e 15F). Os estômatos encontram-se acima do nível das demais células epidérmicas (Figuras 14D e 15D), o que também foi relatado por Barbosa (2006) ao estudar diferentes agentes gelificantes e tipos de vedação em videiras.

Olmos & Hellín (1998), trabalhando com plantas de cravo, observaram anormalidades no tamanho e forma de uma ou ambas células-guarda e no fechamento do estômato de células hiperídricas, além de estômatos mais circulares que alongados. A densidade de estômatos foi também

significativamente maior em plantas normais quando comparadas ás hiperídricas.

As alterações nos estômatos, associadas à redução ou ausência de cera epicuticular na superfície das folhas de plantas cultivadas *in vitro,* relacionaram-se à baixa capacidade fotossintética potencial dessas plantas, as quais podem ser algumas das causas que limitariam a sobrevivência das mesmas sob condições *ex vitro*.

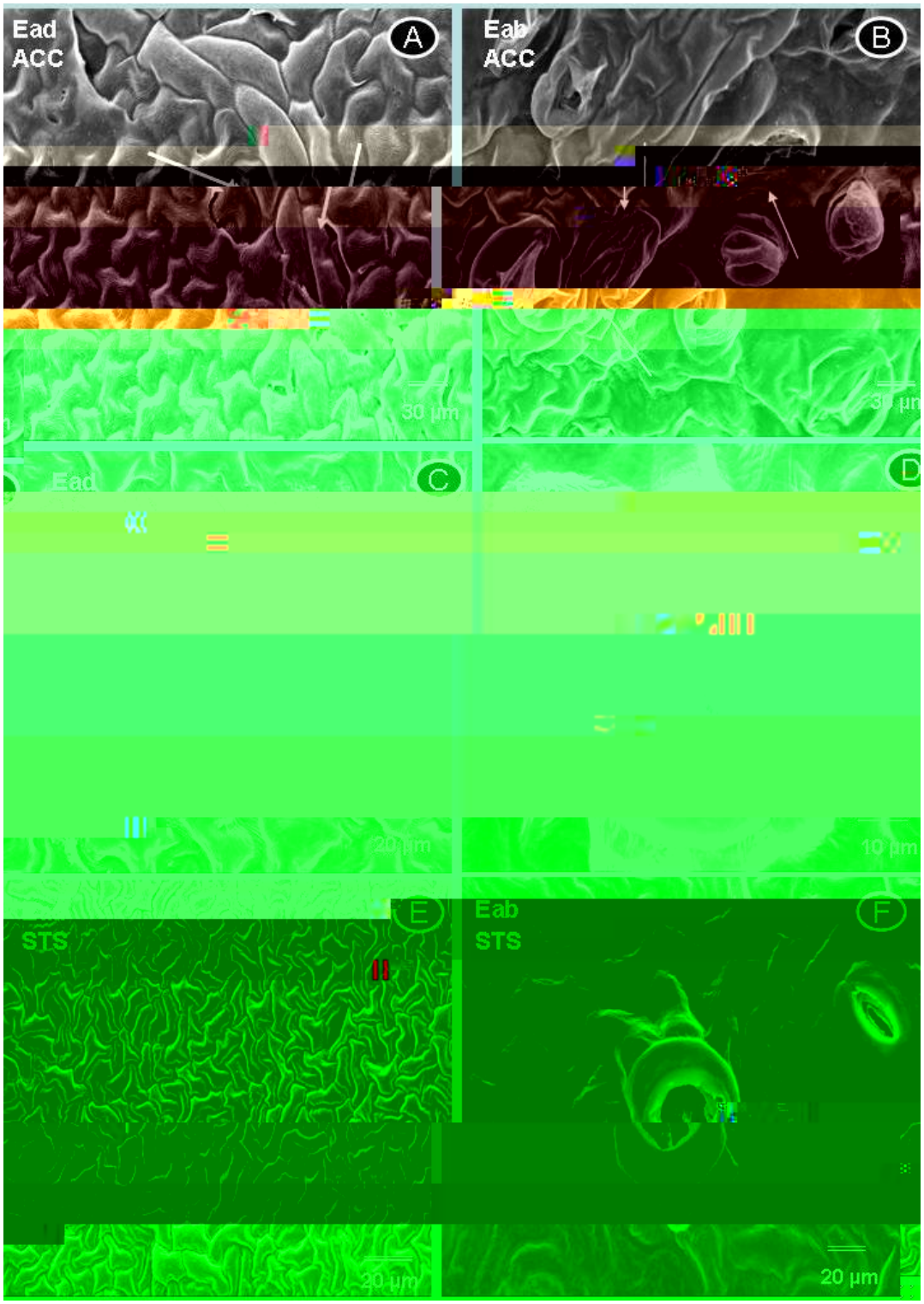


Figura 14. Eletromicrografias de varredura da face adaxial da epiderme **(A, C, E)** e da face abaxial da epiderme **(B, D, F)** em folhas *Vitis riparia* cultivada em diferentes meios de cultura: 1/2 MS + 3 µM de ACC **(A, B)**, 1/2 MS **(C, D)**, 1/2 MS + 10 µM de STS **(E, F), a**pós 60 dias de cultivo *in vitro*. Setas indicam em A, danos na superfície da epiderme; em B, anomalias nos estômatos e em C formação de sulcos na face adaxial da epiderme.

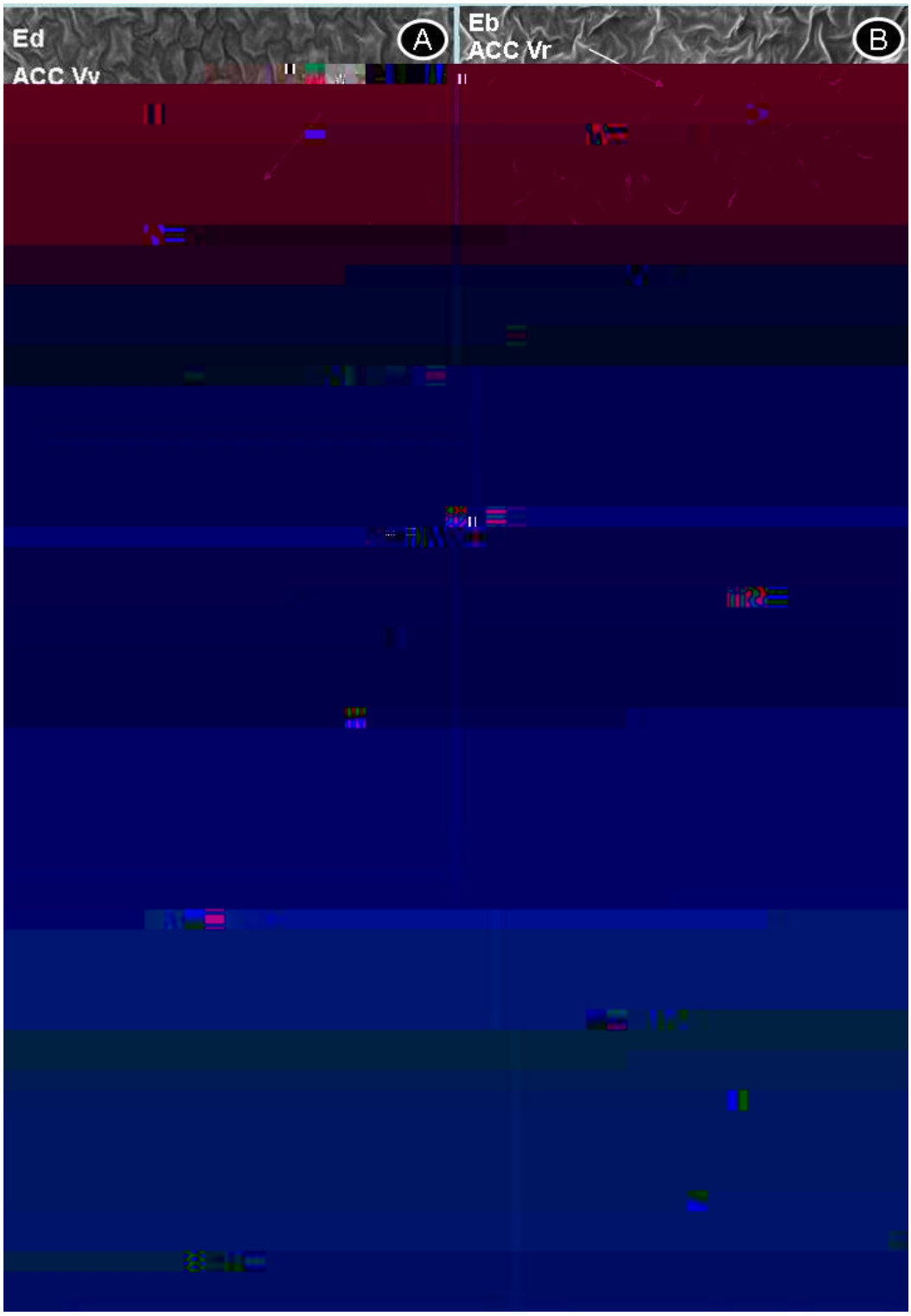


Figura 16. Eletromicrografias de varredura da epiderme adaxial **(A, C, E)** e epiderme abaxial **(B, D, F)** em folhas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* cultivada em diferentes meios de cultura: 1/2 MS + 3 µM de ACC **(A, B)**, 1/2 MS **(C, D)**, 1/2 MS + 10 µM de STS **(E, F), a**pós 60 dias de cultivo *in vitro*. Setas indicam em A, danos na superfície da epiderme e em B, anomalias nos estômatos.

4 – Conclusões

✓ Níveis elevados de etileno no ambiente de cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *Vitis riparia*, causam alterações nos aspectos morfológicos, tais como: redução do número de folhas, redução do comprimento da parte aérea e radicular e redução da área foliar.

✓ Plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* cultivadas em ambientes com elevados níveis de etileno acumulado, apresentam redução no conteúdo de clorofilas totais.

✓ As estruturas anatômicas de folhas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* e *V. riparia* sofreram alterações quando em ambientes com altas concentrações de etileno, com aumento na altura da face adaxial da epiderme, face abaxial da epiderme, mesofilo e altura do limbo.

✓ O etileno em altas concentrações favorece o aparecimento de injúrias na epiderme adaxial e deformações de estômatos em videiras, principalmente em *Vitis riparia*.

✓ O uso de STS como inibidor da ação do etileno favoreceu melhorias nas características morfofisiológicas de videiras desenvolvidas em ambiente *in vitro*.

✓ As alterações morfofisiológicas causadas pelos elevados níveis de etileno podem comprometer a sobrevivência das plantas quando transferidas para ambientes *ex vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, L & GRIERSON, D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. **Journal of Experimental Botany**, 53: 2039-2055, 2002.

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

APÓSTOLO, N.M. & LLORENTE, B. E. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 36:243-249, 2000.

ARIGITA, L., MAJADA, J.P., GONZALEZ, A. & SANCHEZ-TAMES, R. Controle Ambiental en cultivo *in vitro*: CO_2 y etileno. In: SANCHEZ-OLATE, M.E., LEAL, D.G.R. (Eds.). **Biotecnologia vegetal en especies leñosas de interés forestal**. Universidad de Concepcion, Concepcion-Chile. pp. 105-117, 2005.

BARBOSA, L. M. P. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiros (***Fragaria* ***x*** *ananassa* **Duch.) e videira (***Vitis vinifera* **L. x** *Vitis rotundifolia***) propagados** *in vitro*. Viçosa, MG: UFV, 140p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

BARBOSA, W.M. **Morfogênese** *in vitro* **de maracujá-amarelo (***Passiflora edulis* **f.** *flavicarpa* **Degener) associada a antibióticos e ao etileno**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV. 70p, 1999.

BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELLOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A. & VIEIRA, G. Rhizogenesis *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, 7: 47-51, 2001.

BIONDI, S.; SCARAMAGLI, S.; CAPITANI, F.; MARINO, G.; ALTAMURA, M.M. & TORRIGIANI, P.. Ethylene involvement in the vegetative bud formation in tabacco thin layers. **Protoplasma**, 202: 134-144, 1998.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B. & ZIEGLER, H. (Eds). **Encyclopedia of Plant Physiology: Physiological Plant Ecology,** I. New York, Springer-Verlag, V.12a. (New series), p.57-107. 1981.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A. DE; MOREIRA, F. M. & SILVA, A. L. DA Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:783-789, 2003.

BOZZOLA, J. J. & RUSSEL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 542 p. 1992.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. & JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** 1st ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. pp. 911-915, 2000.

CARVALHO, M.H.C.; LE, B.V.; ZUILY-FODIL, Y.; THI, A.T.P. & VAN, K.T.T. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. **Plant Science**, 159: 223-232, 2000.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S.Y.; ALI, M.B.; SHIN, K.S. & PAEK, K.Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, 26:377-388, 2005.

CHAZDON, R. L. & KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light aclimation. **Functional Ecology,** 7:385-394, 1993.

DE PROFT NIP, MAENE L. J. & DEBERGH, P.C. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of Magnolia cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, 65:375-379, 1985.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropagated plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). **Ecophysiology and photosynthesis *in vitro* cultures.** Saint-Paul-lez-Durance: Centre d'études de Cadarache, p.145-160, 1995.

DIAS, L. L. C. **Influência do etileno e poliaminas sobre a morfogênese** *in vitro* **de maracujá (***Passiflora* **sp.)**. Viçosa, MG: UFV, 83p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

FARIA, J.L.C. & SEGURA, J. *In vitro* control of adventitous bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa.* **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 33: 209-212, 1997.

FONTES, M.A.; OTONI, W.C.; CAROLINO, S.M.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; FÁRI, M. & LOURO, R.P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, 19:81–87, 1999.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by tissue culture. Part 1: The technology**. 2nd ed. Edington, Exegetics Limited, 574p, 1993.

HATANAKA, T.; SAWABEB, E.; AZUMA, T.; UCHIDAB, N. & YASUDAB, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora.* **Plant Science**, 107: 199-204, 1995.

IACONO, F. & MARTINELLI, L. CO_2 assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated *in vivo* and *in vitro*: estimation of stomatal and cuticular transpiration *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux**, 32: 91-97, 1998.

JONA, R.; CATTRO, A. & TRAVAGLIO, D. The climacteric feature of fruits is reflected in the sensitivity to ethylene of plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 94: 273–284, 2002.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27:137-138, 1965.

KLICH, M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, 44:171-183, 2000.

KOEHLER, A.D. **Embriogênese somática em mamoeiro (***Carica papaya* **L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC, AVG e STS e de pulsos de 2,4-D.** Dissertação (Mestrado em Botânica). Viçosa, UFV. 72p, 2004.

KRAUSE, G. H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damage and protective mechanisms. **Physiologia Plantarum,** 74:566-574, 1988.

KÜRSCHNER, W.M.; STULEN, I.; WADNER, F. & KUIPER, P.J. Comparison of paleobotanical observations with experimental data on the leaf anatomy of Durmast Oak, *Quercus petraea* (Fagaceae) in response to environmental change. **Annals of Botany**, 81: 657-664, 1998.

LOURO, R. P.; DOS SANTOS, A. V. & MACHADO, R. D. Ulstrastructure *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. L. shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media. **International Journal of Plant Sciences**, 160:217-227, 1999.

MA, J.H.; YAO, J.L.; COHEN, D. & MORRIS, B. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. **Plant Cell Reports**, 17: 211-214, 1998.

MAGDALITA, P.M.; GODWIN, I.D.; DREW, R.A. & ADKINS, S.W. Effects of ethylene and culture environment on development of papaya nodal cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 49: 93-100, 1997.

MATILE, P.; HORTENSTEINER, S.; THOMAS, H. & KRAUTLER, B. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. **Plant Physiology**, 46, p.1403-1409, 1996.

MIGUENS, F.C.; LOURO R.P. & MACHADO, R.D. A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura insignis* plantlets *in vitro.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 32:109-113, 1993.

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

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NIYOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50: 333-359, 1999.

NOBEL, P. S. **Physicochemical and Environmental Plant Physiology**. Academic Press, San Diego, 635 p. 1991.

OLMOS, E. & HELLÍN, E. Ultastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation shoots. **Scientia Horticulturae**, 75:91-101, 1998.

OLMOS, E.; PIQUERAS, A.; MARTINEZ-SOLANO, J.R. & HELLIN, E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. **Plant Science**, 130: 97–105, 1997.

OZODOGRU, E. A.; OZDEN-TOKATLI, Y. & AKCIN, A. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 41:151-156, 2005.

PAEK, K.-Y. & HAHN, E.J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoo-tip cultures of Lisianthus [(*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant,** 36:128-132, 2000.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese** *in vitro* **de urucum (***Bixa orellana* **L.).** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV. 127p, 2002.

PAIVA, E. A. S.; ISAIAS, R. M. DOS S.; VALE, F. H. A. & QUEIROZ, C. G. DE S. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom (Commelinaceae) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** 46:617-624, 2003.

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

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D. & PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, 42:481-497, 1999.

PUA, E.-C. Morphogenesis in cell and tissue cultures: role of ethylene and polyamines. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (Eds.) **Morphogenesis in Plant Tissue Culture**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp.255-303, 1999.

REID, M.S., PAUL, J.L., FARHOOMAND, M.B., KOFRANEK, A.M. & STABY, G.L. Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase lise of cut carnations. **Journal of American Society of Horticultural Science**, 105: 25-27, 1980.

REIS, L.B. **Morfogênese** *in vitro* **de maracujá-amarelo (***Passiflora edulis* **f.** *flavicarpa* **Degener) associada ao etileno e a agentes gelificantes**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Viçosa, UFV. 90p, 2001.

REIS, L.B.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L. & OTONI, W.C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 39: 618-622, 2003.

SCHALLER, G.E. & KIEBER, J.J. Ethylene. **The Arabidopsis book**. American Society of Plant Biologists. p. 217, 2002.

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

SIEFERMANN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiologia Plantarum**, 69:561-568, 1987.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Programa de Análises Estatísticas Sisvar 4.3. **UFLA-MG**, 2000.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 Ed. Artmed. Porto Alegre/RS: pp. 541-558, 2004.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. I. & CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 4:99-105, 1992.

WERKER, E. & LESHEM, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. **Annals of Botany**, 59:377-385, 1987.

WILD, H.P.J.; BALCK, P.A.; FERNANDES, E.C.A. & PEPPELENBOS, H.W. The action site of carbon dioxide in relation to inhibition of ethylene production in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 36: 273–280, 2005.

ZIV, M, & ARIEL, T. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. In: LUMSDEN, P.J., NICHOLAS, J., DAVIES, W.J. (Eds.) **Physiology, growth and development of micropropagated plants**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 143-154p. 1994.

ZIV, M. Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.) **Micropropagation: Technology and Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 45–69, 1991.

ZIV, M., & ARIEL, T. On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. **Acta Horticulturae**, 314:121-129, 1992.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Programa de análises estatísticas Sisvar 4.3, **UFLA-MG**, 2000.

CAPÍTULO 3

COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO DE *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* NORMAL E HIPERÍDRICA SOB NÍVEIS DE IRRADIÂNCIA *in vitro*

1 – INTRODUÇÃO

Plantas cultivadas *in vitro* crescem geralmente em pequenos frascos, onde neste ambiente são expostas a sais orgânicos, carboidratos e reguladores de crescimento em altas concentrações, além de alta umidade relativa e baixa irradiância, o que interfere nos potenciais hídrico e osmótico do meio, bem como nas trocas de CO_2 e O_2 entre o interior dos frascos e o ambiente externo (Ziv, 1995; Fontes *et al.,* 1999; Park *et al.,* 2004).

Segundo Ziv (1991) e Saher *et al.* (2004) diferentes condições de estresse, tais como, alta umidade, altos níveis de reguladores de crescimento, acúmulo de gases nos recipientes de cultivo e baixa intensidade luminosa levam ao desenvolvimento, nos tecidos cultivados, da desordem morfológica e fisiológica denominada hiperidricidade. Desordens estas, que, freqüentemente, dificultam o desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*.

Um dos fatores responsáveis pela baixa eficiência da aclimatização ex vitro de plantas, é o surgimento de modificações morfofisiológicas nas plantas. A hiperidricidade, previamente descrito sob o termo vitrificação, nas quais as plantas apresentam aspecto translúcido com folhas grossas, frágeis, alongadas e, ou enrugadas, além de caules largos e engrossados em diâmetro, com entrenós mais curtos que os de plantas normais.

Brotos hiperídricos apresentam menor formação de raízes ou não enraízam e, em geral, não sobrevivem à aclimatização e, quando sobrevivem, originam plantas malformadas (Debergh *et al.,* 1981; Kevers *et al.,* 1984; Gaspar *et al.,* 1991; Ziv, 1991; Fontes *et al.,* 1999; Kevers *et al.,* 2004). De acordo com Ziv (1991), Han *et al.,* (1992), Majada *et al*., (1997) e Park *et al.,* (2004), este fenômeno pode ocorrer devido a fatores externos,

como o estado físico e químico do meio e a atmosfera de cultivo, em particular, o acúmulo de vapor d'água, o CO_2 e o etileno. Independente da origem do explante e, sob condições específicas, evolui para a perda da capacidade regenerativa do tecido.

A principal característica morfológica das plantas hiperídricas está associada com o excesso de água e a deficiência de clorofila (Franck *et al.,* 1997; Gribble *et al.,* 1998).

Anomalias nos estômatos e maior acúmulo de reservas ou biomassa podem dificultar a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (Sciutti & Morini, 1993; Desjardins, 1995; Pospísilová *et al.,* 1999).

Entre os fatores externos promotores da hiperidricidade estão as citocininas, que constituem um grupo de fitorreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e a indução de gemas axilares (Ziv,1991; Paek & Hahn, 2000). As citocininas são muito utilizadas em cultura de tecidos vegetais, por sua alta eficiência na promoção de multiplicação em diversas espécies (Ziv, 1991). De acordo com Zaer (1985), a razão dessa maior eficiência do 6-benzilaminopurina (BAP) pode estar na capacidade dos tecidos vegetais em metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente que os reguladores de crescimento artificiais.

Entre os aspectos utilizados no cultivo *in vitro*, a densidade de fluxo de luz apresenta-se como um dos principais problemas de foto-inibição e foto-oxidação em explantes cujas folhas ainda são muito sensíveis e carecem de uma estrutura anatômica e bioquímica característica das plantas crescidas em campo. A escolha da melhor densidade de fluxo de luz para o crescimento das plantas *in vitro* é geralmente empírica e, em muitos casos, dependente da própria infra-estrutura laboratorial disponível. Este fator pode estar diretamente relacionado à eficiência fotossintética das plantas.

A fotossíntese é um processo que tem início com a captura de fótons de radiação fotossinteticamente ativa pelos pigmentos cloroplastídicos. Se, por um lado as variações nos teores desses pigmentos podem indicar um ajuste das plantas às condições particulares do meio em que se encontram, por outro, sob mesmas condições ambientais, as variações podem refletir diferenças intrínsecas do potencial de cada material vegetal.

O processo fotossintético é dependente, em primeira medida, da etapa fotoquímica na qual os pigmentos cloroplastídicos desempenham um papel fundamental na captação da luz e, em especial, os carotenóides também agem como protetores dos possíveis danos fotoinibitórios (Young, 1991; Taiz & Zeiger, 1998; Sandmann & Scheer, 1998; Buchanan *et al.,* 2000).

A redução da eficiência quântica do fotossistema II (FSII), tradicionalmente conhecida como fotoinibição, pode ser facilmente determinada por medidores de fluorescência da clorofila (Krause & Veis, 1991). A emissão de fluorescência das clorofilas dos sistemas fotossintéticos torna possível a realização de ensaios não-destrutivos para examinar os eventos fotoquímicos da fotossíntese e pode ser usada, efetivamente, para monitorar as variações na atividade e organização do aparelho fotossintético, quando as plantas são expostas ao estresse ambiental (Baker *et al.,* 1983). Aproximadamente 2,5 a 5% da energia luminosa absorvida pelos pigmentos de clorofila são reemitidos do primeiro estado excitado na forma de fluorescência (Bolhar & Oquist, 1993).

Dentre os diversos fatores ambientais estudados no cultivo *in vitro*,os níveis de irradiância podem estar diretamente relacionados com a eficiência fotossintética, bem como nos processos de alterações morfofisiológicas de plantas cultivadas *in vitro*.

Outras espécies também tem sido submetidas a experiências com o efeito de níveis de irradiâncias e composição espectral na proliferação de brotos *in vitro*. Por exemplo, níveis de 50 e 80 µmol m^{-2} s^{-1} em *Malus domestica* (Noé *et al*., 1997); 20 e 80 µmol m^{-2} s^{-1} em *Aristolochia manchuriensis* (Svensson, 2000); luz verde: 18 µmol m^{-2} s^{-1}; azul: 23 µmol m^{-2} s^{-1}; vermelho: 21 µmol m^{-2} s^{-1} e branca: 20 e 60 µmol m^{-2} s^{-1} em petúnia (Michalczuk & Michalczuk, 2000).

Diante de tal situação, o presente trabalho teve como objetivo o estudo dos efeitos de diferentes níveis de irradiâncias sobre as características morfofisiológicas em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* normais e induzidas a hiperídricidade cultivadas *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material experimental e condições de crescimento

Como fonte de explantes, foram utilizadas plantas de videira do porta-enxerto 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) provenientes do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Paraná/PR. As plantas foram cultivadas sob as mesmas condições já descritas nos capítulos anteriores.

2.2 – Implantação do experimento

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram utilizados explantes assépticos de segmentos nodais contendo uma ou duas gemas e uma folha. Os explantes foram cultivados em meio contendo os sais de MS reduzidos à metade ($^1/_2$MS) e em $^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP (meio indutor de hiperidricidade) e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 100 mg L^{-1} de inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e solidificado com 6,5 g L^{-1} de Ágar (Merck, Germany). O meio teve pH ajustado para 5,8, acondicionado em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Os tubos de ensaios foram incubados em sala de crescimento, nas prateleiras das estantes, com controle de temperatura de 27 ± 2ºC, fotoperíodo de 16/8 (luz/escuro) e irradiâncias de 12,5; 25; 50; 100 e 150 µmol m^{-2}

sombrite com 70% de luz e proteção lateral com tela sombrite de 50% de luz); c) 50 µmol m^{-2} s^{-1} (5 lâmpadas acesas; com uma camada de tela sombrite esticada em quadro de madeira, onde a região superior voltada para as lâmpadas teve tela sombrite com 30% de luz e revestimento com papel alumínio na parte superior aos tubos fluorescentes); d) 100 µmol m^{-2} s^{-1} (5 lâmpadas acesas; proteção lateral com tela sombrite de 50% de luz e revestimento com papel alumínio na parte superior aos tubos fluorescentes); e) 150 µmol m^{-2} s^{-1} (5 lâmpadas acesas; foi confeccionada paredes de isopor com a face interna revestida de papel alumínio, no qual apenas a região voltada para a parede da sala não continha placas de isopor. E ainda, foram utilizados, revestimento com papel alumínio na parte superior aos tubos fluorescentes. Confeccionada então a câmara, foi utilizado, para a redução do calor interno, uma hélice de rotação invertida.

Todos os ambientes espectrais foram projetados utilizando dois grupos de 5 lâmpadas fluorescentes, e a adequação das irradiâncias foi feita medindo-se ao longo de toda a prateleira nas estantes 65 pontos para alcançar os níveis desejados. Houve, em todos os ambientes, uma variação na irradiância de ± 2 µmol m^{-2} s^{-1}**.** Na base das prateleiras foram afixados placas de isopor, que serviram de isolante térmico, de forma preventiva ao aquecimento dos tubos de ensaios.

2.3 – Características avaliadas

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas, comprimento da parte aérea (cm), comprimento radicular (cm), determinação de pigmento: clorofila *a*, *b* e carotenóides, clorofilas totais, razão clorofila *a*/*b*, razão carotenóides/clorofilas, massa seca total da planta, fluorescência da clorofila, análises anatômicas: micromorfometria e microscopia eletrônica de varredura.

2.4 – Comprimentos e massa seca total

O comprimento das plantas foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess). Para a medição da massa seca, as plantas

foram secas em estufa a 70 ºC por um período de tempo de 48 horas. Após esse tempo, foram pesadas em balança analítica (Sartorius – SBP10S).

2.5 – Análises morfométricas

Foram realizados estudos anatômicos em cada tratamento a fim de monitorar os efeitos sobre as estruturas celulares. Para isso, foram usadas a terceira folha de cada planta. As amostras foram coletadas e fixadas em Karnovsky (1965). Após lavagem em solução-tampão, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica) e polimerizadas por 15 horas a 70 °C, em estufa. Os blocos foram cortados em secções de 8 µm de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica). A coloração foi feita com Azul de Toluidina a pH 4,0 (O'Brien e McCully, 1981), por 10 minutos e as lâminas foram montadas em resina sintética Permount®. As observações e os registros fotográficos foram realizados em microscópio de luz (Olympus – AX 70) conectado ao sistema de fotomicrografia (Olympus U–Photo, Japão), do Laboratório de Anatomia Vegetal localizado no Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

As análises micromorfométricas foram realizadas com o auxílio do programa Image Pro Plus 4.5, utilizando-se nove repetições e seis medições por estrutura anatômica.

2.6 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky 1965), lavadas em tampão cacodilato três vezes por 10 minutos cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e desidratadas em série etílica. Após, foram secas ao ponto crítico com CO_2 líquido (Bozzolla e Russel, 1992), utilizando um equipamento Balzers (Modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), fixadas em "stubs" e submetidas à deposição metálica com ouro, por pulverização catódica em equipamento Balzers (Modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (Modelo 1430VP), no Núcleo de Microscopia e de Microanálises da UFV.

2.7 – Pigmentos foliares

Na determinação dos pigmentos foliares, foram utilizadas as mesmas metodologias descritas no capítulo 1.

2.8 – Determinação da fluorescência da clorofila

Na determinação das características da fluorescência foram utilizadas a terceira folha situada na região superior de cada ápice, onde a região central de cada folha foi adaptada ao escuro por 30 minutos (para abrir o centro de reação). Ensaios pré-liminares foram conduzidos para se determinar as intensidades de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) na construção da curva de saturação luminosa. Com auxílio de um fluorômetro modulado portátil MINI-PAM (WALZ, Alemanha) foram avaliados os parâmetros de fluorescência mínima (F_o), máxima (F_m), variável (F_v), eficiência quântica potencial (Fv/Fm), rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_{m'}$), o coeficiente de extinção fotoquímica (qP), a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ).

Os parâmetros de fluorescência foram determinados apenas para plantas normais, devido à fragilidade e a reduzida área foliar das plantas hiperídricas.

2.9 – Delineamento experimental

Experimento do tipo fatorial 5 x 2, sendo cinco níveis de irradiâncias (12,5; 25; 50; 100 e 150 µmol m^{-2} s^{-1}) e dois meios de cultura ($^1/_2$MS e $^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP), com cinco repetições.

Foi realizada análise de variância (ANOVA) para se verificar a significância dos fatores estudados e então aplicada análise de regressão por meio do Programa de Análises Estatísticas e Genéticas-SAEG 8.0 (UFV-MG, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Características morfofisiológicas

3.1.1 – Parâmetros de crescimento

Através da análise de variância (ANOVA) foi observada interação significativa ao nível de 5% de probabilidade no efeito dos dois fatores estudados, para todas as variáveis, com exceção do número de folhas e de entrenó, onde não foram significativos.

Tem sido relatado por outros autores que além da propagação, é possível avaliar genótipos tomando-se por base parâmetros morfofisiológicos do crescimento, fundamentais para a micropropagação e aclimatização de plantas, tais como, a utilização do CO_2 e produção de biomassa (Galzy & Compan, 1992; Silva *et al.,* 1996; Fila *et al.,* 1998; Moreira, 2000), teor de clorofila (Restagno *et al.,* 1995; Amâncio *et al.,* 1999; Carvalho *et al.,* 2001), características estomáticas (Silva & Doazan, 1995; Silva *et al.,* 1996; Moreira, 2000), transpiração e potencial hídrico das folhas (Fila *et al.,* 1998; Iacono & Martinelli, 1998).

A avaliação realizada após os 60 dias, ao termino do experimento, mostrou que o comprimento da parte aérea foi significativamente influenciada tanto pelos tipos de meios de cultivo como pelos níveis de irradiâncias.

Tanto no meio indutor de hiperidricidade (BAP) como no não indutor ($^1I_2$MS) *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* apresentou comportamento quadrático negativo, com pico de crescimento em 25 µmol m^{-2} s^{-1} de 4,075 cm e 6,075 cm respectivamente, em que conforme se aumentou a irradiância foram observados redução na altura da planta (Figura 1). No entanto, as plantas hiperidricas foram mais afetadas que as plantas normais, com perdas de 60% e 56% (1,611 cm e 2,675 cm) do seu crescimento, respectivamente, quando a irradiância foi incrementada de 25 µmol m^{-2} s^{-1} para 150 µmol m^{-2} s^{-1}.

Os resultados do comprimento da parte aérea estão entre os limites de 1,5 e 7,0 cm definidos por Torregrosa & Bouquet (1995) com cinco

genótipos híbridos de VR (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) e o porta-enxerto Fercal. Estes são superiores aos encontrados por Biasi *et al.* (1998) e inferiores aos encontrados por Galzy & Compan (1992) e Moreira (2000) com diferentes variedades de videira.

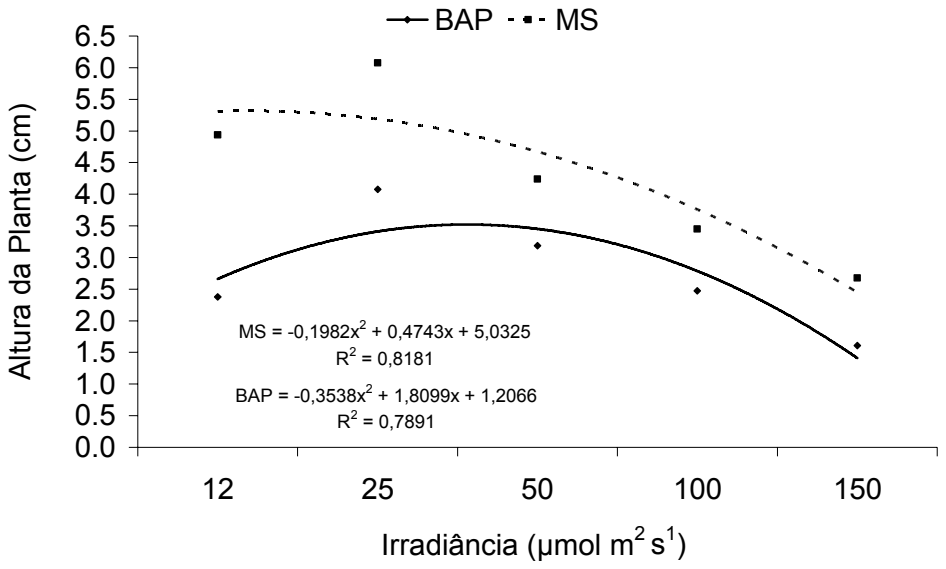


Figura 1. Altura das plantas (AP) de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Cabe ressaltar que além da redução do comprimento da parte aérea das plantas, quando submetidas às irradiâncias elevadas, ocorreu a formação de calogênese na base das plantas crescidas em meio indutor de hiperidricidade (meio contendo BAP) (Figuras 2 A, 2 C, 2 E, 2 G e 2 I).

Foi observado tanto nas plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* crescidas em meio $^1/_2$MS (normais), quanto para aquelas do meio indutor de hiperidricidade (BAP) o surgimento de folhas contendo manchas cloróticas (clorose) e/ou necroses, principalmente nas irradiância a partir de 100 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 2 G-J). Em plantas do meio contendo BAP, foram observados folhas e calos na coloração rosada/avermelhada (Figuras 2 E, 2 G e 2 I).

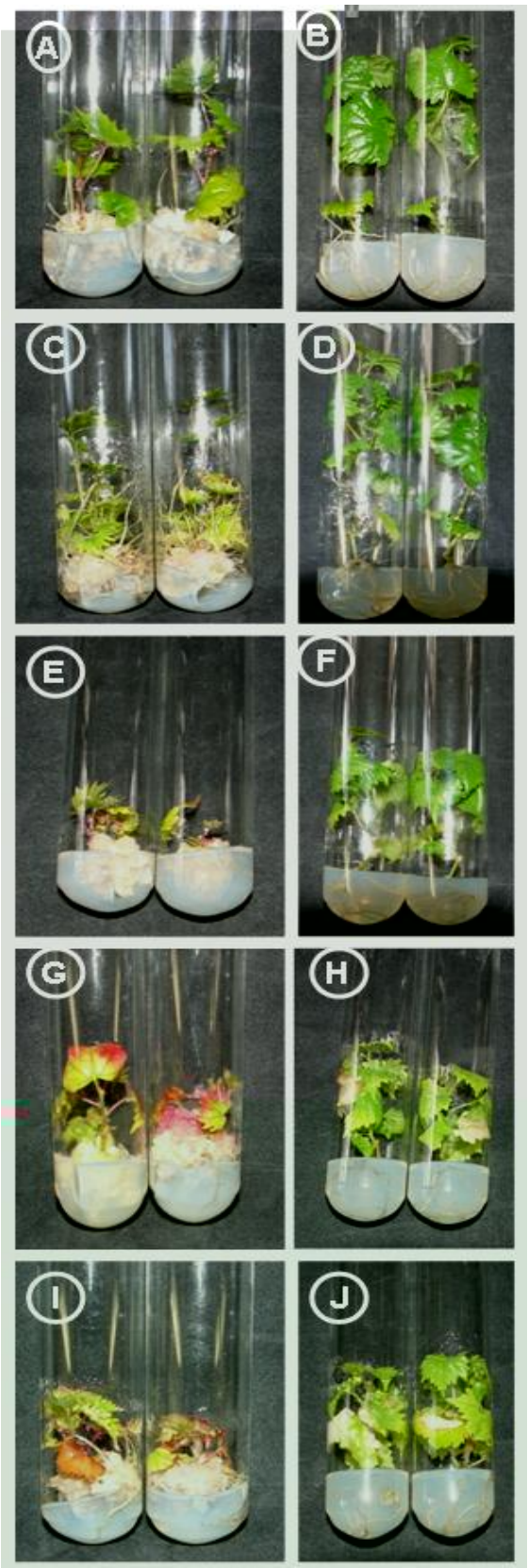


Figura 2. Plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, aos 60 dias de cultivo sob influência de meio indutor de hiperidricidade **(A, C, E, G, I)** e não indutor **(B, D, F, H, J)** x diferentes níveis de irradiâncias: **A e B)** 12 µmol m^{-2} s^{-1}, **C e D)** 25 µmol m^{-2} s^{-1}, **E e F)** 50 µmol m^{-2} s^{-1}, **G e H)** 100 µmol m^{-2} s^{-1}, **I e J)** 150 µmol m^{-2} s^{-1}.

O comprimento radicular foi influenciado fortemente pelos dois fatores em estudo, sendo que no tratamento em meio não indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS), as plantas apresentaram o dobro do comprimento radicular das plantas do meio indutor (BAP).

As plantas normais, crescidas em meio $^1/_2$MS, apresentaram comportamento de crescimento quadrático negativo, com seu ponto de máxima de 4,975 cm na irradiância de 25 µmol m^{-2} s^{-1}, enquanto as plantas hiperidricas, crescidas no meio contendo BAP, apresentaram comportamento linear negativo, com ponto de máxima de 2,212 cm na irradiância de 12 µmol m^{-2} s^{-1}. Em ambos, decrescendo conforme se aumentou o nível de irradiância, com perdas de 44% e 55% (2,762 cm e 0,912 cm) do comprimento radicular, respectivamente, quando a irradiância foi incrementada para 150 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 2).

George (1996) relata que, para formação de raízes *in vitro* há necessidade de energia e carboidratos, sendo estes fornecidos através da fotossíntese (em condições autrotóficas) ou oriunda de uma fonte exógena de açúcar (em sistemas heterotróficos ou mixotróficos).

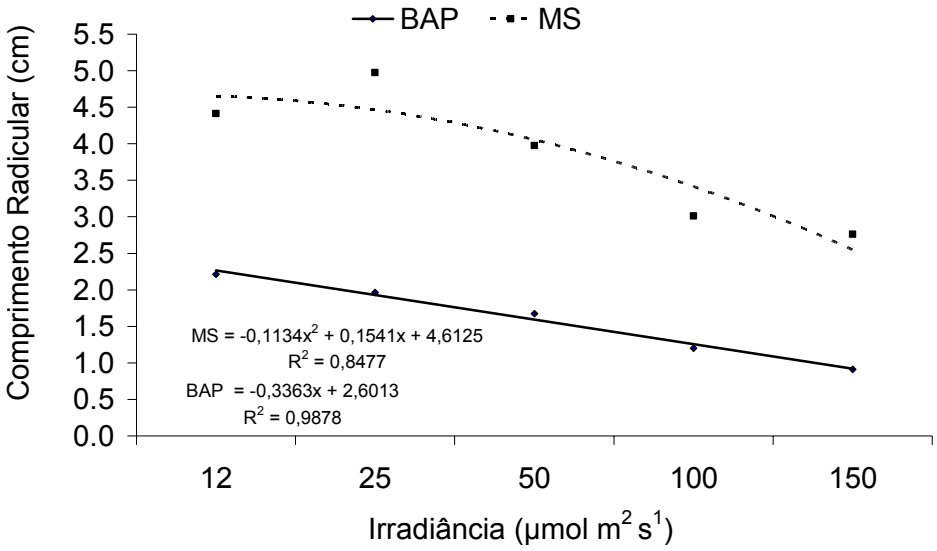


Figura 3. Comprimento do sistema radicular (CR) das plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Nas plantas normais, oriundas do meio $^1/_2$MS, foi obtido maior conteúdo de matéria seca total, em relação às plantas do meio contendo BAP. Sendo que ambas apresentaram comportamento quadrático negativo, com pontos de máxima de 0,0393 g para MS e 0,0214 g para BAP (Figura 4), sendo esperado resultados inferiores em massa seca para plantas hiperidricas, pois apresentam maior conteúdo de água em relação à matéria seca.

Em trabalhos realizados por Borghezan *et al.* (2003) em estudos de seis porta-enxertos de videiras, foi obtido maior produção de biomassa pelas cultivares Paulsen 1103 (34,8 mg) e SO4 (35,6 mg), apresentando maior acúmulo de matéria seca.

O conteúdo de massa seca total foi significativamente reduzido conforme se aumentou a irradiância quais as plantas foram submetidas. Esta redução seguiu as mesmas tendências da altura e comprimento radicular das plantas. A produção de biomassa total também foi parâmetro de avaliação de crescimento e alocação de reservas *in vitro* de porta-enxertos de videira (Silva & Doazan, 1995; Silva *et al.,* 1996; Amâncio *et al.,* 1999; Moreira, 2000). Segundo estes autores, a produção de biomassa total é o parâmetro mais confiável para avaliar o crescimento e a multiplicação *in vitro* de plantas.

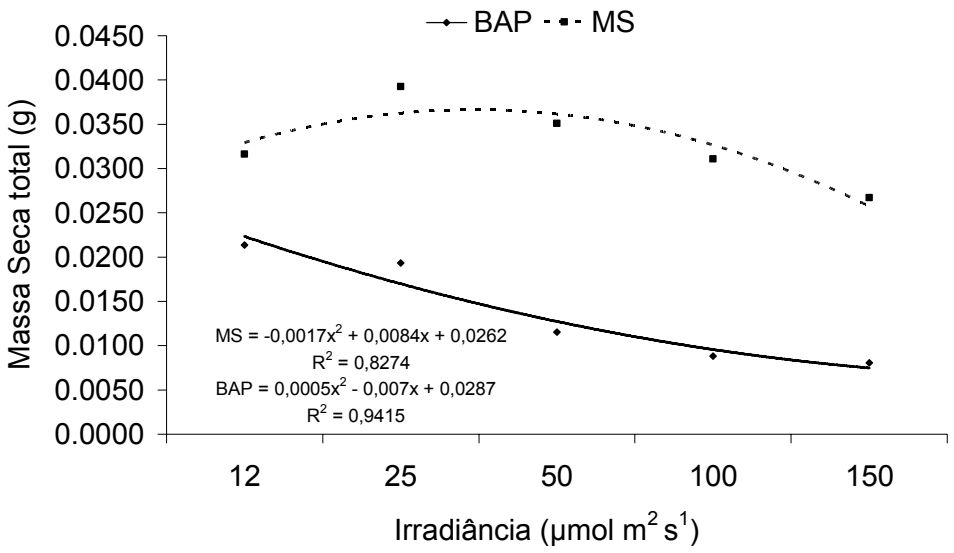


Figura 4. Massa seca total (MST) das plantas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Neste trabalho foram observados sintomas visíveis da hiperidricidade, pois as plantas apresentaram folhas mais grossas, largas, translucidas e de aspecto frágil. O elevado conteúdo de água é uma das principais características de plantas hiperidricas. Resultados obtidos por Chakrabarty *et al.* (2005), em estudos com plantas normais e hiperídricas de macieira em cultivo *in vitro*, apontaram diferença superior de 16% na massa seca de brotos normais em relação aos hiperídricos.

3.1.2 – Pigmentos foliares

Foi visível o efeito dos fatores estudados sobre o conteúdo de pigmentos foliares em plantas de videira, em ambos os tratamentos. Plantas normais ($^1/_2$MS) crescidas sob baixas irradiâncias de até 25 µmol m^{-2} s^{-1} apresentaram coloração verde escura (Figura 2 A-B), enquanto essas plantas apresentavam-se com sintomas de cloroses e necroses em irradiâncias a partir de 100 µmol m^{-2} s^{-1} (Figuras 2 H-J).

O conteúdo de clorofila *a* (Chl *a*) foi significativamente superior em plantas normais, desenvolvidas no meio MS, que em plantas hiperidricas do meio suplementado com BAP. Sendo que para as primeiras o

comportamento foi quadrático negativo, com ponto de máxima de 26,4484 µg cm^{-2} na irradiância de 25 µmol m^{-2} s^{-1}, já as hiperidricas apresentaram comportamento linear negativo, sendo seu ponto de máxima de 17,3798 µg cm^{-2} em 12 µmol m^{-2} s^{-1}. No entanto, ambas apresentaram redução no conteúdo de Chl a em 42% e 48%, respectivamente, para irradiâncias de 150 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 5).

O conteúdo de pigmentos foliares é influenciado pelo ambiente ao qual a planta foi desenvolvida. Borghezan *et al.* (2003) relatam que o teor de clorofila variou entre genótipos e entre os ambientes de cultura *in vitro* e *ex vitro*, sendo que os porta-enxertos VR039-16 e Paulsen 1103 apresentaram teores superiores *in vitro*, enquanto nos porta-enxertos VR043-43, R110, SO4 e Kober 5BB, os maiores valores de clorofila foram obtidos em casa de vegetação.

Assim como neste estudo, Ortíz (2004) observou decréscimo significativo no conteúdo de clorofilas quando plantas de Urucum foram desenvolvidas *in vitro* sob intesidades crescentes de luz (50, 105 e 150 µmol m^{-2} s^{-1}). Já em *Lippia filifolia*, o efeito na redução das clorofilas e dos carotenóides só foi evidente ao comparar as densidades de fluxo de luz de 104 e 172 µmol m^{-2} s^{-1} (Iarema, 2004).

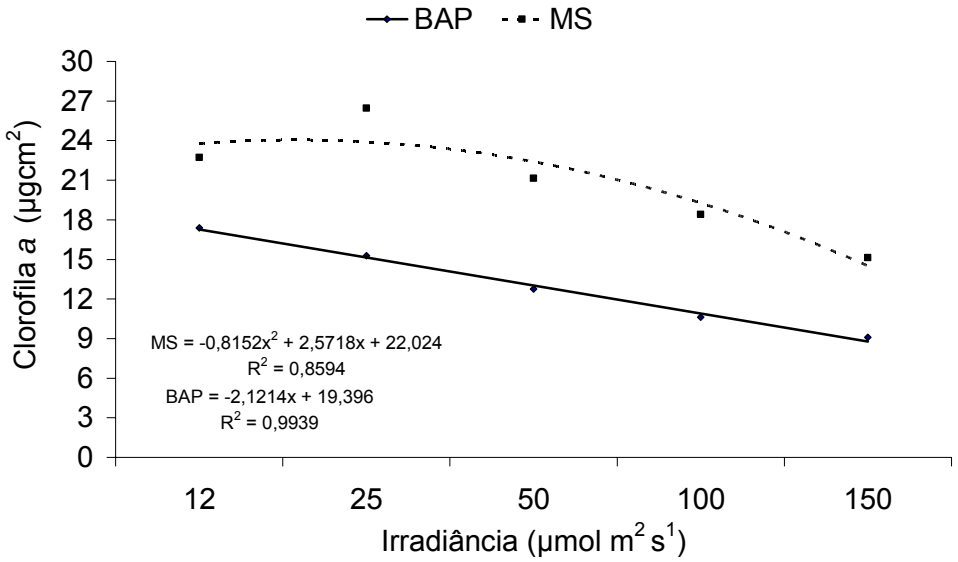


Figura 5. Clorofila *a* (Chl *a*) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Assim como para a Chl *a*, o conteúdo de Chl *b* foi reduzido em plantas induzidas a hiperidricidade em relação às plantas normais, sendo seu conteúdo reduzido gradativamente conforme se incrementou os níveis de irradiâncias. As maiores concentrações de Chl *b* foram obtidas em 12 µmol m^{-2} s^{-1} de irradiância, para as hiperidricas e em 25 µmol m^{-2} s^{-1} para plantas normais (Figura 6).

A maior disponibilidade de luz propicia uma condição para uma economia na síntese de clorofilas, ao passo que em baixas irradiâncias, a necessidade de otimizar o uso da radiação faz com que haja maior investimento na produção destes pigmentos (Boordman, 1997).

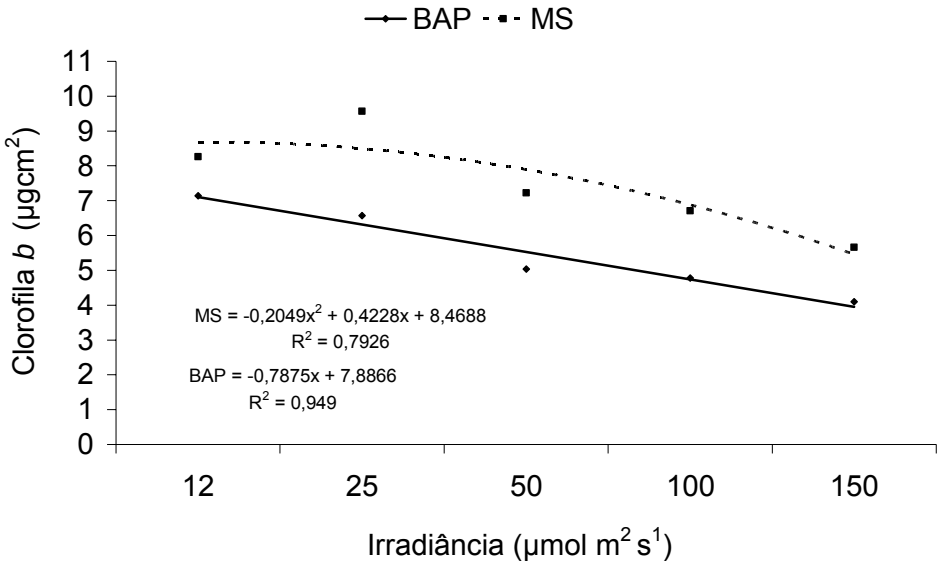


Figura 6. Clorofila *b* (Chl *b*) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Foi observado que a produção de carotenóides pela *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* variou conforme os tratamentos. Para os dois meios de cultivo observou-se comportamento quadrático negativo no conteúdo de carotenóides, com pontos de máxima em 75 µmol m^{-2} s^{-1}. Sendo o conteúdo destes pigmentos significativamente maiores em plantas hiperidricas que nas normais, entretanto foi observado um leve decréscimo para as

irradiâncias de 100 a 150 µmol m^{-2} s^{-1} e redução de 23% e 16% para plantas hiperídricas e normais, respectivamente (Figura 7).

A adição de BAP ao meio de cultivo favoreceu a produção de maiores teores de pigmentos acessórios, como é o caso dos carotenóides, onde estes poderiam estar envolvidos na proteção das membranas dos tilacóides contra os elevados níveis de irradiâncias, atenuando a fotoinibição e favorecendo a produção de biomassa. Resultados parecidos foram relatados por Paiva *et al.* (2003), ao estudar diferentes intensidades luminosas em *Tradescantia pallida* cv. *purpurea,* onde o conteúdo de carotenóides incrementou quando as plantas foram desenvolvidas em irradiâncias de 200 a 800 µmol m^{-2} s^{-1}. Segundo Krause (1988) estes pigmentos foram associados à proteção do maquinário fotossintético contra as ações de intermediários reativos de oxigênio, potencialmente formados em elevadas irradiâncias. Esta proteção da integridade das membranas dos tilacóides é fundamental à atividade da fotossíntese (Siefermann-Danos, 1987; Niyogi, 1999).

Segundo Pfündel & Bilger (1994) os carotenóides estão associados à proteção do sistema fotossintético ao estresse foto-oxidativo.

Ao contrário do maior conteúdo de carotenóides obtidos em níveis crescentes de irradiâncias neste trabalho, Ortíz (2004) não observou diferença significativa quando plantas de urucum foram desenvolvidas *in vitro* sob intesidades crescentes de luz (50, 105 e 150 µmol m^{-2} s^{-1}).

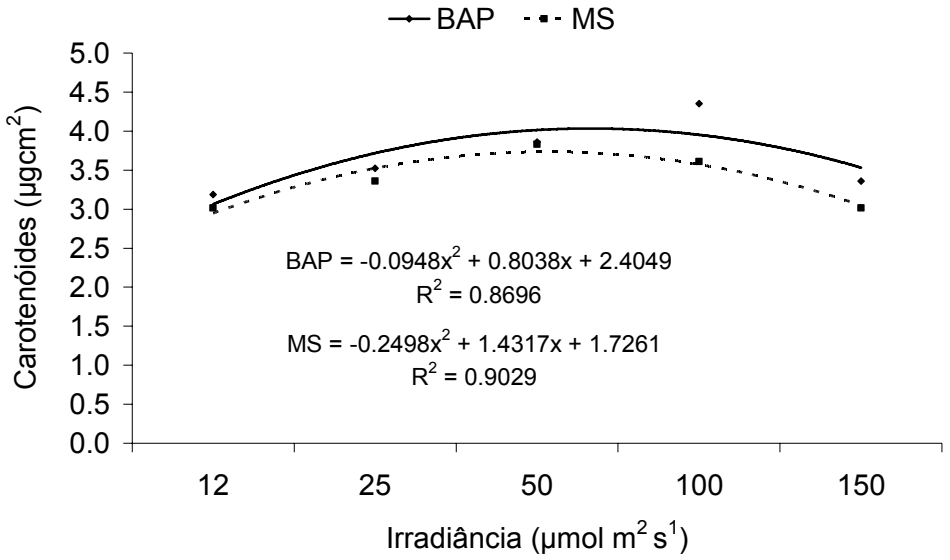


Figura 7. Conteúdo de carotenóides em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Neste trabalho foi observado que a interação entre os fatores meios de cultivo x níveis de irradiâncias teve grande influência sobre o conteúdo de clorofilas totais (Chl *a* + Chl *b*) nas plantas de videiras cultivadas *in vitro*.

Plantas desenvolvidas no meio não indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS) apresentaram maior conteúdo de clorofilas totais em relação àquelas do meio indutor. Foi observado decréscimo quadrático no conteúdo de clorofilas para a primeira e linear para a segunda (Figura 8), mostrando o efeito negativo de elevadas irradiâncias sobre o conteúdo de pigmentos foliares em videira. Os teores de clorofila total das plantas normais cultivadas *in vitro* são similares aos relatados por Restagno *et al.* (1995), Amâncio *et al.* (1999) e Moreira (2000).

Estudos em macieiras, realizados por Chakrabarty *et al.* (2005) mostraram que plantas normais crescidas em casa de vegetação e *in vitro*, apresentam maior número de cloroplastos, em contraste com plantas hiperídricas. Em nosso caso, irradiâncias elevadas podem ter contribuído significativamente para o agravamento na redução do conteúdo de clorofilas totais em plantas hiperídricas e normais.

Estudos com *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* cultivada *in vitro* apontaram uma queda no teor dos pigmentos cloroplastídicos com o aumento da densidade de fluxo de luz (de 25 a 150 µmol m^{-2} s^{-1}), provavelmente devido à degradação dos pigmentos foliares, sendo mais evidente ao diminuir o suprimento de sacarose no meio (Alexandre, 2002).

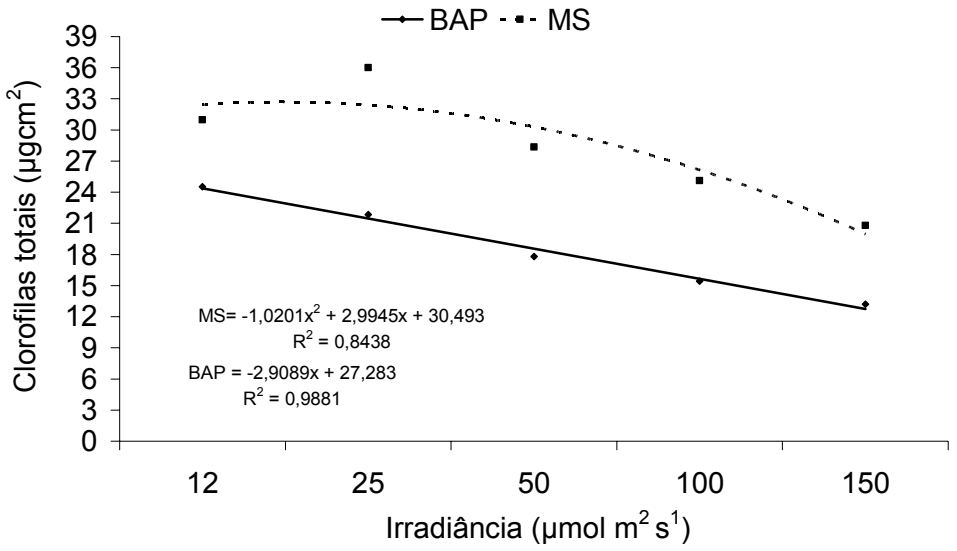


Figura 8. Conteúdo de clorofilas totais (Chl *a* + Chl *b*) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) e diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Foi observada redução na razão entre Chl *a* / Chl *b* com o aumento da irradiância, tanto para plantas normais quanto para as induzida à hiperidricidade (Figura 9A). Esta característica pode estar associada a um ajuste no sistema antena, relacionados com a captação e trasmissão de energia para o centro de reação do fotossitema II (PS II). Os sistemas antena funcionam para enviar energia eficientemente para os centros de reação com os quais estão associados (Pullerits & Sundstrom, 1996).

Sabes-se que a exposição dos vegetais a alta irradiância por longos períodos de tempo, como em nosso caso, pode resultar não apenas na redução da eficiência fotossintética, como também na fotooxidação dos pigmentos foliares. Para *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, foi observado que irradiâncias acima de 100 µmol $m^{-2}s^{-1}$, promoveram a

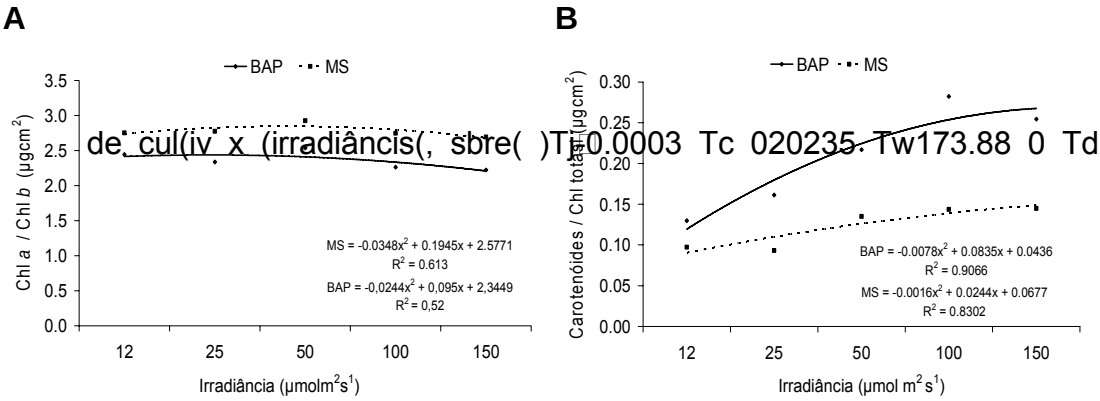
redução do conteúdo de clorofilas totais e também necrose nas folhas. A síntese ou degradação de pigmentos foliares podem ocorrer naturalmente na presença de luz, entretanto, o excesso de irradiância pode acelerar o processo de degradação de clorofilas (Engel & Poggiane,1991).

O aumento da razão carotenóides / clorofilas totais, tanto em plantas normais, quanto nas induzidas à hiperidricidade, mostram um aumento crescente no conteúdo de carotenóides com aumento da irradiência até 100 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (Figura 9B). O incremento no conteúdo destes pigmentos, possivelmente está relacionadao a fotoproteção do PS II, contra o excesso de energia luminosa. Esta característica está intimamente relacionada aos dados de fotoinibição, observados nos parâmetros de fluorescência da clorofila, relatados posteriormente.

Atualmente sabe-se que a fotoinibição é um fenômeno comum em organismos que realizam fotossíntese, e que os carotenóides podem atuar como pigmentos fotoprotetores, provenientes de estratégias evolutivas dos vegetais. Segundo Bartley & Scolnik, (1995) ambientes com elevados níveis de irradiância favorecem a totoinibição, onde a concentração de carotenóides pode funcionar como um mecanismo preventivo a fotooxidação das membranas dos tilacóides.

Kitao *et al.* (2000) relatam que o excesso de irradiância contribui para a redução da capacidade fotossintética e também para o surgimento da fotoinibição em plantas.

Normalmente as mensurações do conteúdo de pigmentos dos cloroplastos, juntamente com análises da fluorescência da clorofila, são usados para indicar estresses causados por irradiâncias em plantas (Hendry & Prince, 1993; Stancato *et al*., 2001).



de cul(iv x (irradiâncis(, sbre( )Tj 0.0003 Tc 020235 Tw173.88 0 Td[aes estrutu

Figura 9. Razão clorofila *a* (Chl *a*)/clorofila *b* (Chl *b*) (**A**) e razão carotenóides/ clorofilas totais (**B**) em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) e diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

3.2 – Análises estruturais

3.2.1 – Morfometria

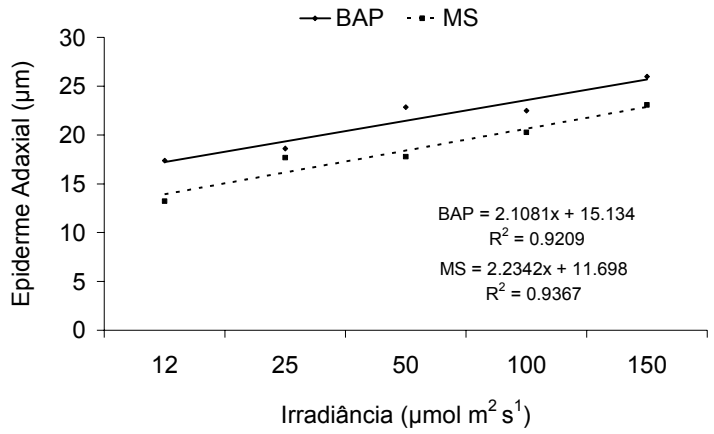
Pela ANOVA foi verificado efeito significativo da interaç BT/Tslfautoes: n

Para a epiderme inferior ou abaxial o comportamento na altura foi quadrático positivo, aumentando com o incremento nos níveis de irradiância. Somente foi observada diferença significativa entre plantas normais e hiperidricas até a irradiância de 50 µmol m^{-2} s^{-1}, sendo que em 100 e 150 µmol m^{-2} s^{-1} ambas apresentaram a mesma altura de epiderme abaxial (Figura 10B). Possivelmente por esta face da epiderme encontrar-se mais protegida da irradiância direta, a diferença em altura dos dois tratamentos foi mínima.

Uma das possíveis explicações para a nítida diferença em altura da epiderme adaxial de plantas normais e hiperídricas, seria o fato de que as segundas sendo mais sensíveis às condições ambientes, a disposição compacta das células epidérmicas restringiria a perda de água, além de auxiliar na proteção contra os elevados níveis de irradiância a que foram submetidas.

Chazdon & Kaufmann (1993) analisaram as folhas do arbusto tropical *Piper arieianum* (Piperaceae) e verificaram uma variação significativa dependente da luz na espessura total foliar, espessura da epiderme superior, espessura do paliçádico e alongamento dos estratos do parênquima lacunoso.

A



B

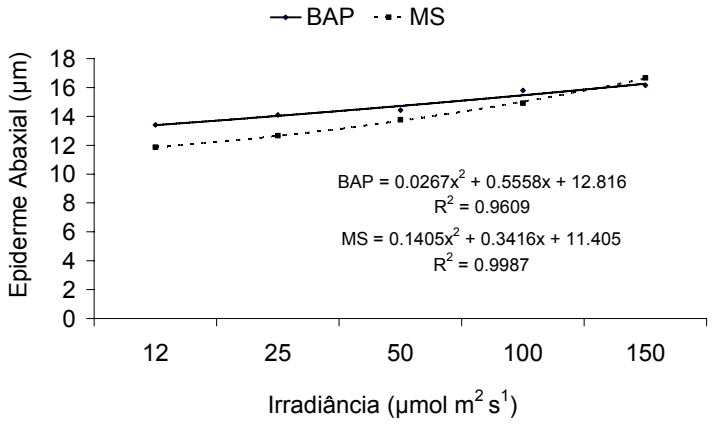


Figura 10. Morfometria da face adaxial da epiderme **(A)** e face abaxial da epiderme **(B)** em plantas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro*, sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) e não indutor ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância, após 60 dias de cultivo.

Foram obtidas maiores alturas do parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, mesofilo e altura do limbo em folhas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* em meio suplementado com BAP, em relação ao meio $^1/_2$MS. Para Metcalfe & Chalk (1983), o crescimento e a organização da lâmina foliar são altamente influenciados por fatores ambientais como a temperatura, a intensidade de luz e a disponibilidade de água.

A altura do parênquima paliçádico, do mesofilo e do limbo foliar em plantas induzidas à hiperidricidade apresentou comportamento quadrático negativo, tendendo a decrescer para irradiâncias acima de 100 µmol m^{-2} s^{-1}, entretanto, plantas normais apresentaram comportamento quadrático positivo, aumentando progressivamente conforme o incremento da irradiância (Figuras 11A, 11C e 11D).

Segundo Bjorkman (1981) o aumento em espessura das células do parênquima paliçádico é resultante de um alongamento deste tecido no sentido abaxial, o que aumenta significativamente o volume do mesofilo por área foliar e o volume do mesofilo por volume foliar. Klich (2000) afirma que esta característica reflete um mecanismo estrutural que potencializa a fotossíntese por unidade de área foliar e habilita a uma maior eficiência no uso da água.

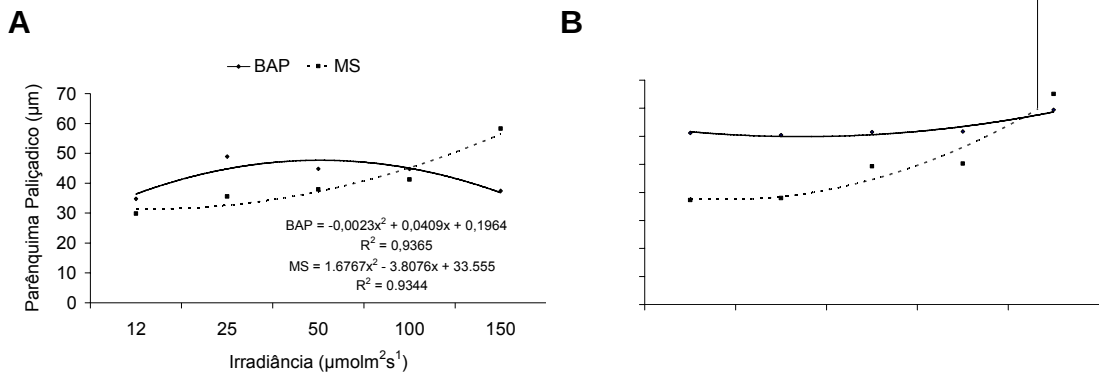
Tanto em plantas hiperídricas como em plantas normais de videira, a altura do parênquima lacunoso apresentou comportamento quadrático positivo, conforme o incremento nos níveis de irradiância. Sendo que em plantas hiperidricas a altura desta estrutura foi significativamente maior até a irradiância de 100 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 11B). Goulet & Bellefleur (1986) afirmam que os efeitos da luz (sol e sombra) também influenciam na plasticidade foliar, alterando a espessura, a área e outras características desse órgão vegetal.

A altura do limbo foliar de plantas hiperidricas foi significativamente maior que em plantas normais (Figura 11D). Fahn (1990) relatou que a redução da área foliar é compensada pelo maior espessamento das folhas, o parênquima clorofiliano paliçádico torna-se mais desenvolvido que o lacunoso.

As células do parênquima clorofiliano podem dispor-se de modo a favorecer uma grande superfície de contato com as outras células, facilitando à captação de energia luminosa e dos elementos gasosos necessários à realização da fotossíntese (Apezatto-da-Gloria & Carmello-Guerreiro, 2006).

A presença de cutícula espessa, redução na área foliar, maior densidade estomática, maior espessura total e do parênquima paliçádico, foram relatadas e identificam ser características relacionadas com a

resistência contra a perda de água nas plantas (Fahn & Cutler,1992; Burrows, 2001; Lyshede; 2002; Rhizopoulou & Psaras, 2003).



Foram observados também, volumosos espaços intercelulares no mesofilo e células arredondadas do parênquima lacunoso em plantas induzidas à hiperidricidade (Figura 12), características essas pouco observadas em plantas desenvolvidas em meio $^{1}/_{2}$MS (Figura 13). Kürschner *et al.* (1998), em estudo realizado com folhas de *Quercus petrae*, revelaram que o alongamento das células do parênquima paliçádico reduz em aproximadamente 35% os espaços intercelulares no mesofilo. Estas observações também foram feitas por Chakrabarty *et al.* (2005), comparando-se plantas normais crescidas em casa de vegetação e *in vitro,* com plantas hiperídricas de macieira.

A difusão através de espaços intercelulares pode ser importante na assimilação fotossintética de carbono, especialmente em folhas hipoestomáticas, como é o caso de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia.*

Nobel (1991) citou que os fatores ambientais podem afetar a anatomia foliar, especialmente durante o desenvolvimento deste órgão, podendo causar mudanças no número de camadas do mesofilo. De acordo com Klich (2000) e Kürschner *et al.* (1998), o aumento da espessura da folha está relacionado ao aumento dos tecidos do mesofilo.

Foi observado também, que os níveis de irradiância parecem exercer papel importante na diferenciação das estruturas anatômicas das folhas de videira, pois na menor irradiância (12 µmol m^{-2} s^{-1}) o mesofilo apresentava-se homegêno, de difícil distinção entre as estruturas (Figuras 12A e 13A). Quando as plantas foram desenvolvidas sob maiores irradiâncias, houve uma maior diferenciação das estruturas anatômicas, tanto nas plantas induzidas à hiperidricidade (Figua 12C-D-E), quanto nas normais (Figura 13 C-E). Evidenciando a característica dorsiventral das folhas de *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia.*

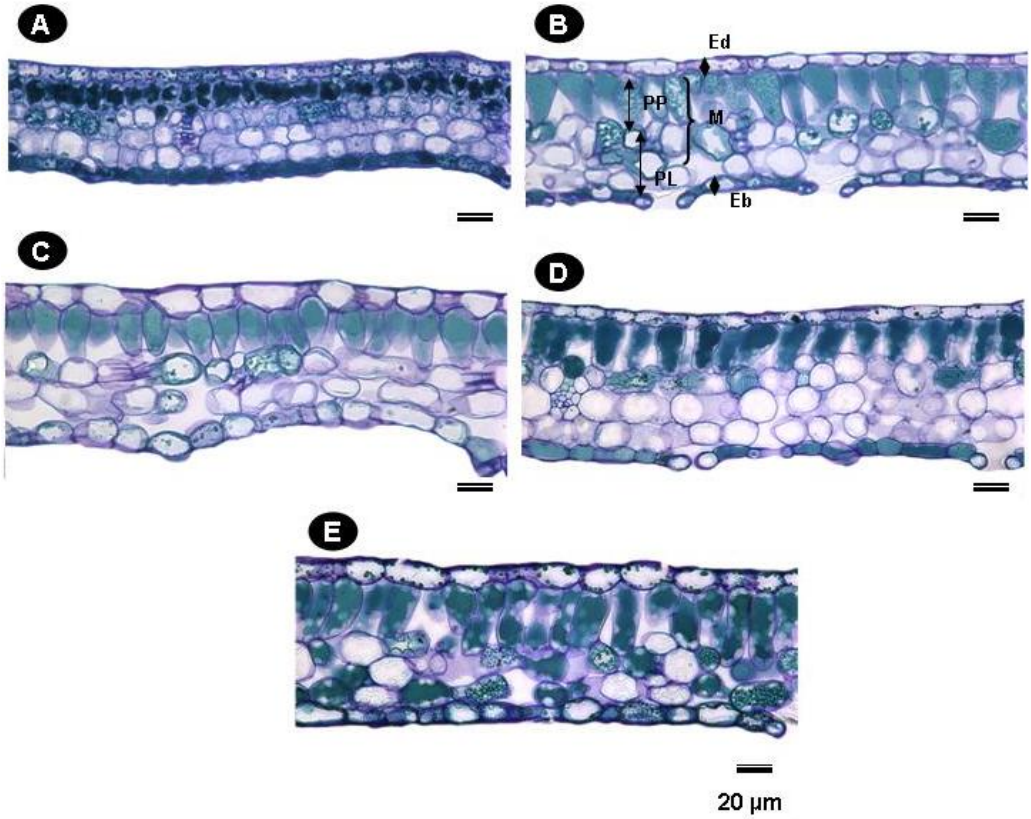


Figura 12. Cortes transversais de folhas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro.* Face adaxial da epiderme **(Ead)**, parênquima paliçádico **(PP)**, parênquima lacunoso **(PL),** face abaxial da epiderme **(Eab)** e mesofilo **(M)***.* Sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) x diferentes níveis de irradiância. **A)** 12 µmol m^{-2} s^{-1}, **B)** 25 µmol m^{-2} s^{-1}, **C)** 50 µmol m^{-2} s^{-1}, **D)** 100 µmol m^{-2} s^{-1} e **E)** 150 µmol m^{-2} s^{-1}, após 60 dias de cultivo. As barras indicam 20 µm.

Figura 13. Cortes transversais de folhas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro.* Face adaxial da epiderme **(Ead)**, parênquima paliçádico **(PP)**, parênquima lacunoso **(PL),** face abaxial da epiderme **(Eab)** e mesofilo **(M)***.* Sob influência de meio não indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância. **A)** 12 µmol m^{-2} s^{-1}, **B)** 25 µmol m^{-2} s^{-1}, **C)** 50 µmol m^{-2} s^{-1}, **D)** 100 µmol m^{-2} s^{-1} e **E)** 150 µmol m^{-2} s^{-1}, após 60 dias de cultivo. As barras indicam 20 µm.

3.2.2 – Microscopia eletrônica de varredura

As análises estruturais revelaram que videiras induzidas a hiperidricidade são mais sensíveis a fatores ambientais e apresentam várias alterações na estrutura de suas folhas. Foi observado que plantas desenvolvidas em meio indutor de hiperidricidade, mesmo para o menor nível de irradiância (12 µmol m^{-2} s^{-1}) já apresentava alterações no relevo da face da epiderme, formando sulcos, mostrando que a diferenciação destas células não foi homogênea. Na face abaxial da epiderme, os estômatos são aparentemente normais (Figura 14A e 14B). Estes resultados são coerentes

com os obtidos por Borghezan *et al.* (2003) em estudos de aclimatização de seis cultivares de videiras. Outros autores relataram que os estômatos diferenciados *in vitro* são malformados em número e inábeis para a função, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização (Santamaria & Kerstien, 1994; Desjardins, 1995 e Pospísilová *et al.*,1999).

Segundo Iacono & Martinelli (1998) e Moreira (2000), os estômatos das plantas *in vitro* estão relacionados com a capacidade de fotossíntese e o processo de aclimatização, uma vez que estes exercem importante papel na regulação das trocas gasosas e perda de água pela transpiração.

Em videiras desenvolvidas em meio indutor de hiperidricidade, percebem-se pequenas alterações nos estômatos em irradiâncias superiores a 25 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 14C). A partir de 50 µmol m^{-2} s^{-1} são melhor percebidas as deformações sobre a epiderme, principalmente nas proximidades dos estômatos (Figura 14D).

As células-guarda de plantas induzidas a hiperidricidade sofreram drásticas alterações, quando as plantas foram cultivadas sob 100 e 150 µmol m^{-2} s^{-1} de irradiância, produzindo estômatos malformados (Figuras 14E e 14F). Evidenciando a sensibilidade de plantas hiperídricas aos fatores ambientais.

Alterações nas estruturas celulares também foram relatados por Olmos & Hellín (1998), trabalhando com plantas de cravo, que verificaram anormalidades no tamanho e na forma de uma ou de ambas as células-guarda, comprometendo o fechamento dos estômatos de plantas hiperídricas, além de estômatos mais circulares que alongados.

Assim como nas plantas desenvolvidas em meio contendo BAP, não foi observada deposição de cera epicuticular quando as plantas foram desenvolvidas em meio $^{1}/_{2}$MS, submetidas aos diferentes níveis de irradiâncias.

Uma das funções da cutícula é proteger a planta contra a perda de umidade. A disposição da mesma pode ser afetada pela intensidade da luz e pela disponibilidade da água (Mauseth, 1988). Igualmente Wetzstein & Sommer (1983) relataram que em estudos realizados com *Liquidambar styraciflua*, embora a morfologia da cera seja um controle genético, a

configuração e distribuição da cera pode ser modificadas pelas condições ambientais e que a dimensão e a densidade são afetadas pela irradiância. Entretanto, não foi observado deposição de cera nas folhas de videira desenvolvidas *in vitro*.

Diferentemente dos resultados obtidos por Paiva *et al.* (2003) em plantas de *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* cultivadas sob cinco níveis diferentes de intensidade luminosa (40, 80, 200, 400 e 800 µmol. m^{-2} s^{-1}), foi observado a formação de cera epicuticular disposta perpendicular à superfície epidérmica, principalmente na maior intensidade luminosa.

A superfície das faces adaxial e abaxial da epiderme nas folhas de plantas normais, sob baixas irradiâncias de até 25 µmol m^{-2} s^{-1}, encontravam-sem intactas e sem alterações no relevo das células (Figura 15 A-C). No entanto, foram observadas deformações na superfície da epiderme adaxial em irradiâncias de 50 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 15D), alterações no formato dos estômatos e danos nas células-guarda e na base dos tricomas, quando as plantas foram submetidas a irradiâncias maiores que 100 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 15 E-F).

Chakrabarty *et al.* (2005) relatam a descontinuidade da epiderme e estômatos anormais com células-guarda deformadas em plantas hiperídricas de macieira cultivada *in vitro*.

As alterações nos estômatos, associadas à redução ou ausência de cera epicuticular na superfície das folhas de plantas cultivadas *in vitro,* podem ser algumas das causas que limitariam a sobrevivência das plantas sob condições *ex vitro*.

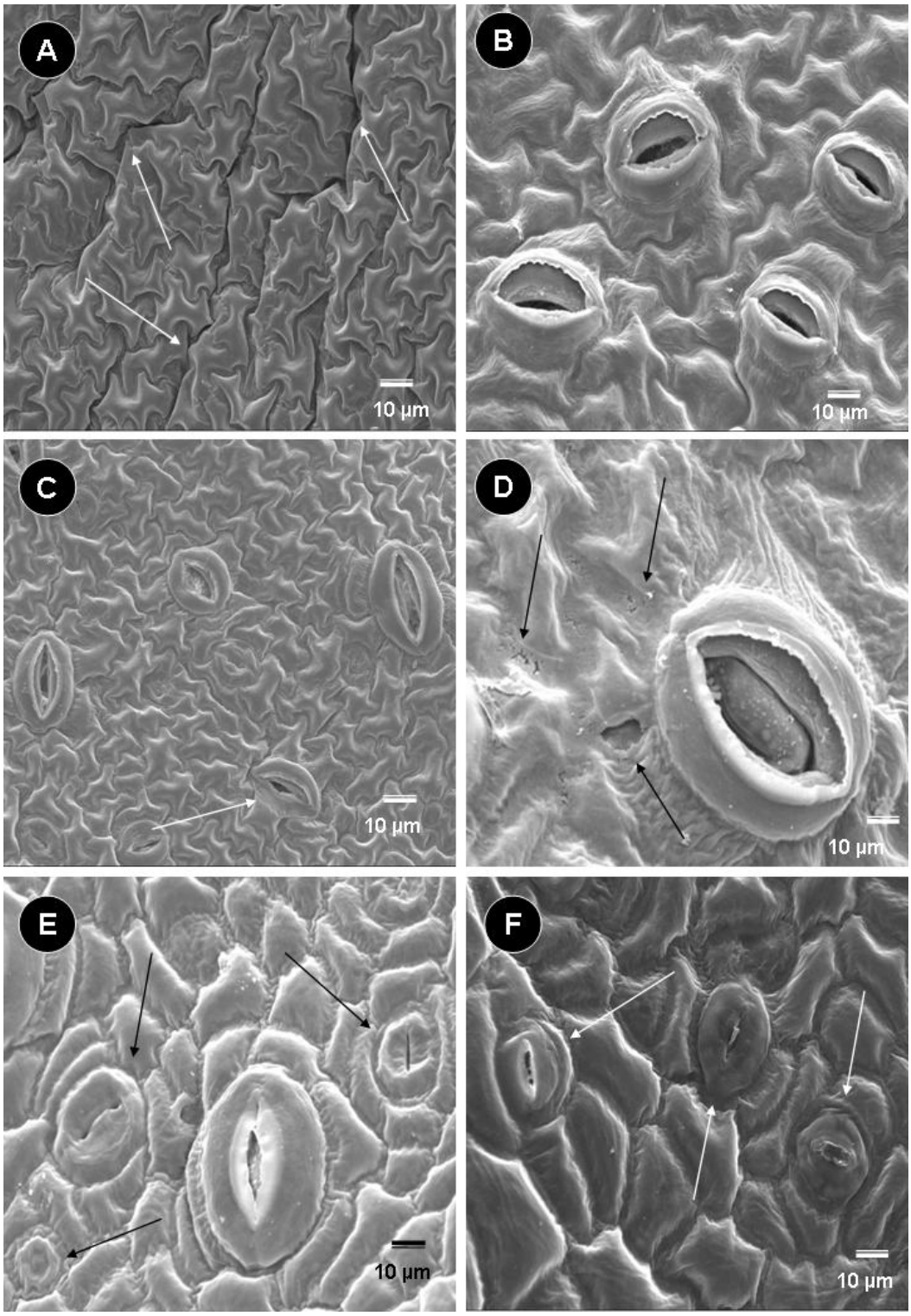


Figura 14. Eletromicrografias de varredura da face Adaxial da epiderme **(A, B, D)** e face Abaxial da epiderme **(C, E, F)** em folhas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro,* sob influência de meio indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS + 1 mg.L^{-1} de BAP) x diferentes níveis de irradiância. **A, B)** 12 µmol m^{-2} s^{-1}, **C)** 25 µmol m^{-2} s^{-1}, **D)** 50 µmol m^{-2} s^{-1}, **E)** 100 µmol m^{-2} s^{-1} e **F)** 150 µmol m^{-2} s^{-1} , após 60 dias de cultivo. As setas inadicam a formação de sulcos em A, deformação de células-guarda em C, alterações na epiderme em D e má formação dos estômatos em E e F.

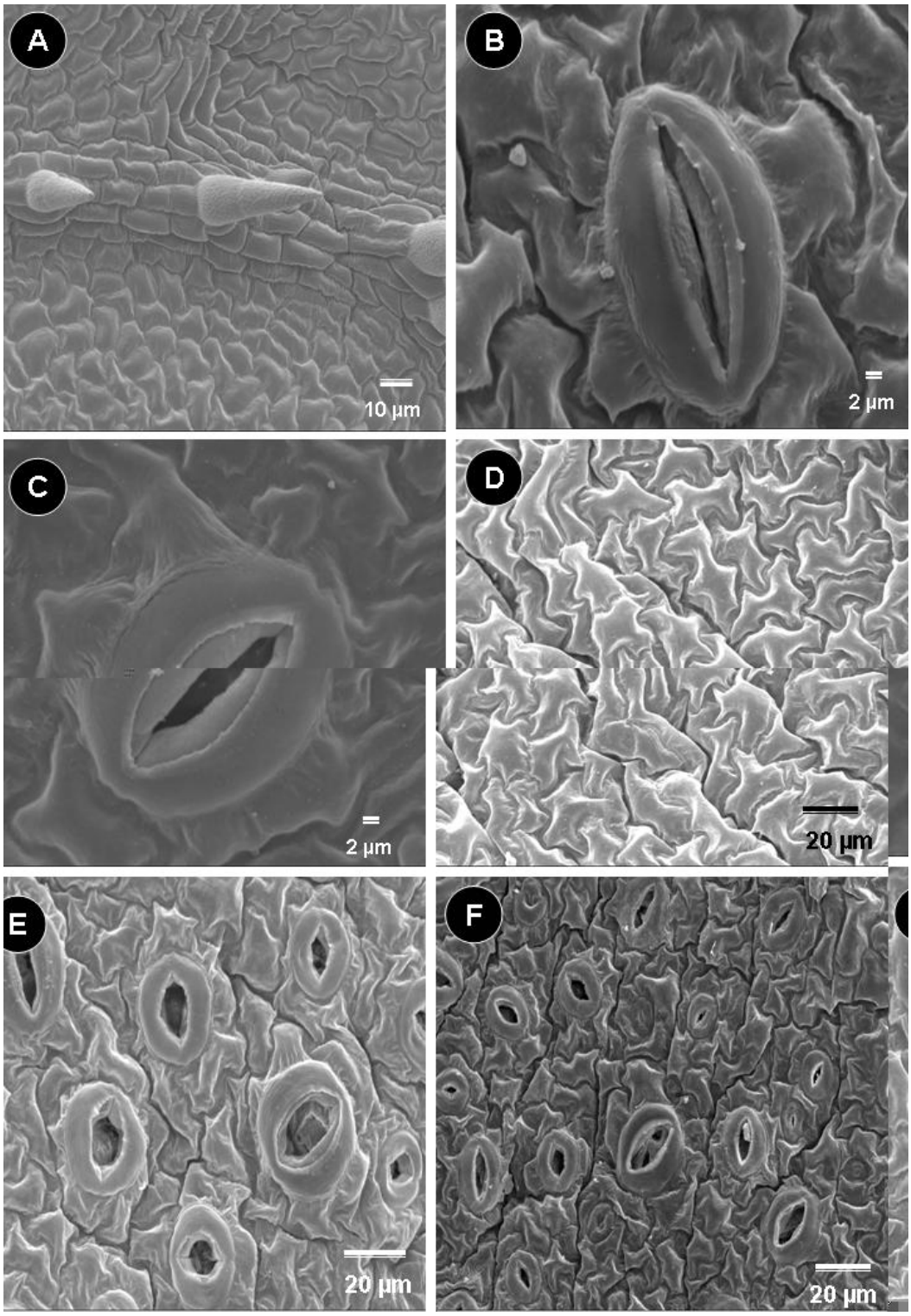


Figura 15. Eletromicrografias de varredura da face Adaxial da epiderme **(A, B, D)** e face Abaxial da epiderme **(C, E, F)** em folhas de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* propagadas *in vitro,* sob influência de meio não indutor de hiperidricidade ($^1/_2$MS) x diferentes níveis de irradiância. **A, B)** 12 µmol m^{-2} s^{-1}, **C)** 25 µmol m^{-2} s^{-1}, **D)** 50 µmol m^{-2} s^{-1}, **E)** 100 µmol m^{-2} s^{-1} e **F)** 150 µmol m^{-2} s^{-1}, após 60 dias de cultivo.

3.3 – Fluorescência da clorofila

A captura e armazenamento de energia luminosa pelas folhas de plantas superiores é mediada por uma intricada associação entre complexos de pigmentos captores de luz e um transporte seqüencial de elétrons do fotossistema II (PSII) para o fotossistema I (PSI). A eficiência da utilização da luz por cada fotossistema regula as reações de fixação de CO_2 e geração de ATP pelas reações luminosas.

Foram obtidos aumentos crescentes nos coeficientes de extinção não-fotoquimica da fluorescência (NPQ), com maiores valores em plantas desenvolvidas sob as irradiâncias de 12 µmol m^{-2} s^{-1} e 150 µmol m^{-2} s^{-1} (Figura 16C). Segundo Balachandran *et al.,* (1997) em plantas sob estresse biótico, o aumento da extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ), juntamente com o aumento do estado de redução do aceptor primário do transporte de elétrons, indicam que a capacidade de fotoproteção foi excedida e a fotoinibição contribui para acelerar a degeneração do maquinário fotossintético e o desenvolvimento de sintomas.

Quando a energia luminosa absorvida for maior que a capacidade fotossintética de utilizá-la nos processos fotoquímicos, os mecanismos de fotoproteção e fotoinibição são ativados, este processo pode ter influenciado o elevado conteúdo de carotenóides obtido em plantas hiperidricas e plantas normais sob níveis elevados de irradiância. Estes resultados são compatíveis aos obtidos por Balachandran *et al.* (1997), em estudos comparativos de tecidos intactos e infectados pelo vírus do mosaico do tabaco, em que constatou-se que a capacidade e a eficiência fotoquímica dos tecidos doentes foram afetadas, apresentando aumento de NPQ. Esse fato se correlaciona com o aumento da proporção xantofila/clorofila e à rápida conversão de violaxantina em zeaxantina na presença de luz (Balachandran *et al*., 1997).

A relação F_v/F_m representa o “quenching” fotoquímico da fotossíntese. Refere-se ao quanto da energia interceptada pela folha e utilizada na etapa fotoquímica da fotossíntese pode ser potencialmente destinada a uma correspondente assimilação do CO_2.

Por meio da figura 16B, observa-se um declínio acentuado na eficiência quântica potencial do fotossitema II (PSII), indicada pelo menor Fv/Fm em plantas normais crescidas nas irradiâncias de 12 e 150 $\mu molm^{-2}s^{-1}$. Em plantas sob estresse abiótico a menor eficiência fotossintética pode ser causada pela iniciação dos processos de fotoinibição quando a capacidade de fotoproteção é excedida, sendo indicado pelo declínio na extinção fotoquímica da fluorescência (qP) e na razão Fv/Fm, acompanhado pelo aumento de Fo, devido à redução excessiva da cadeia de transporte de elétrons (Osmond, 1994).

Assim como neste estudo, Ortíz (2004) observou que após 45 dias de exposição à elevada densidade de fluxo de luz, plantas de urucum cultivadas *in vitro*, apresentaram valor da razão F_v/F_m igual a 0,518, indicando claramente um fenômeno de fotoinibição. Em geral, considera-se como valores típicos da razão F_v/F_m para folhas de sol em torno de 0,8 ou ligeiramente inferior e para folhas de sombra ou iluminadas, valores da ordem de 0,83 e 0,85, ao passo que se considera que valores inferiores a 0,725 certamente indicam um fenômeno de fotoinibição (Critchley, 1998).

A energia luminosa absorvida pelo PSII pode ser utilizada pelas reações fotoquímicas, dissipada em forma de calor ou fluorescência ou transferida para o PSI. Por essa razão, a proporção de luz reemitida como fluorescência reflete competição entre os vários processos de desativação do "pool" de excitação disponível (Krause & Weis, 1991).

Por meio da curva de luz, foram observados incrementos crescentes na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR), sendo que para as irradiâncias de 12 e 150 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ foram obtidos os menores valores de ETR (Figura 16A). Entretanto, analisando-se esses dados conjuntamente com os parâmetros de crescimento e conteúdo de clorofilas, os quais foram comprometidos sob irradiâncias acima de 75 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, com plantas cloróticas e necrose nas folhas, deduz-se que grande parte dos elétrons transportados não estejam sendo usados nos processos fotoquímico da fotossíntese.

Parte dos elétrons envolvidos nos processos fotoquímicos são utilizados em outros processos que não a fixação de carbono. Em condições onde a fixação de carbono é limitada (ex.: altas irradiâncias e baixa

concentração de CO_2), drenos alternativos de elétrons, como a fotorrespiração e a redução de oxigênio molecular (durante a reação de Mehler) podem aumentar suas atividades (Fracheboud, 2001).

Fatores ambientais que resultam na diminuição da eficiência quântica do PSII causam redução na razão Fv/Fm, que, para a maioria das espécies, encontra-se em torno de 0,832 ± 0,0004, quando as condições ambientais são favoráveis (Björkman & Demmig, 1987). Entretanto, neste estudo para videiras propagadas *in vitro* foram obtidos valores inferiores, sendo de 0,783 para plantas desenvolvidas na menor irradiância (12 µmol m^{-2} s^{-1}) decrescendo para 0,764 na maior irradiância (150 µmol m^{-2} s^{-1}). Segundo Krause & Weis (1991), a presença de condições ambientais estressantes levam ao decréscimo característico na eficiência quântica potencial do PSII, podendo ser detectada pela queda na relação Fv/Fm.

Paralelamente ao decréscimo da eficiência quântica efetiva do PSII (ΔF/Fm') foi observado o mesmo comportamento para o coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP) em função dos níveis crescentes de radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Sendo os maiores valores de qP obtidos quando as plantas foram desenvolvidas em 25, 50 e 100 µmol m^{-2} s^{-1} de irradiância, respectivamente (Figura 16D). A queda da fotossíntese devido à menor eficiência fotoquímica pode ocorrer redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin e mudanças nas rotas bioquímicas, como acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos (Wright *et al.*, 1995).

Resultados semelhantes foram relatados por Chakrabarty *et al.* (2005), sendo os parâmetros Fv/Fm, Fv/Fo e qP significativamente reduzidos em plantas hiperídricas de macieira *in vitro*. Assim, as medidas de fluorescência de clorofila indicam dano oxidativo no aparato fotossintético, podendo refletir em declínio significativo da atividade fotossintética.

4 – CONCLUSÕES

❖ Videiras induzidas a hiperidricidade por BAP, apresentam comprometimento nas características morfofisiológicas de crescimento, tais como: altura da plantas, comprimento radicular e massa seca total das plantas.

❖ Videiras normais, desenvolvidas em meio de cultivo MS, apresentam maior conteúdo de clorofilas totais, em relação às plantas induzidas a hiperidricidade.

❖ *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* induzida a hiperidricidade possui maior conteúdo de carotenóides do que plantas normais, em meio MS.

❖ Irradiâncias acima de 25 µmol m^{-2} s^{-1} para plantas induzidas a hiperidricidade e 50 µmol m^{-2} s^{-1} para normais, favorecem a redução significativa dos parâmetros: altura da planta, desenvolvimento radicular, massa seca total, clorofilas totais e carotenóides.

❖ Plantas hiperídricas apresentam maior altura da epiderme adaxial e epiderme abaxial, em relação às plantas normais, independente do nível de irradiância e parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, mesofilo e limbo foliar até 100 µmol m^{-2} s^{-1} de irradiância.

❖ Níveis crescentes de irradiâncias favorecem o incremento na altura da epiderme adaxial, epiderme abaxial, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, mesofilo e limbo foliar em plantas normais, no entanto, irradiâncias acima de 100 µmol m^{-2} s^{-1} promovem a redução da altura do parênquima paliçádico, mesofilo, e limbo foliar em plantas hiperídricas.

❖ Os parâmetros de fluorescência da clorofila permitem inferir a baixa eficiência quântica potencial do fotossistema II (PSII) e consequentemente

menor taxa fotossitética potencial em videiras desenvolvidas sob elevadas irradiâncias.

❖ Estresse abiótico por elevados níveis de irradiância possivelmente estão associados ao aumento do conteúdo de carotenóides e a fotoinibição em *Vitis vinifera* x *V. rotundifolia* cultivadas *in vitro*.

❖ Medidas de fluorescência da clorofila podem ser usadas como parâmetros auxiliares na avaliação de respostas fisiológicas em plantas desenvolvidas em ambientes diferenciados de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S. **Germinação** *in vitro* **e organogênese em explantes do maracujazeiro (***Passiflora edulis* **f.** *flavicarpa* **Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Mestrado em Fitotecnia. 94 p. 2002.

AMÂNCIO, S.; REBORDÃO, J. P. & CHAVES, M. M. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 58:31-37, 1999.

APPEZATO-DA-GLORIA, DA B.; VIEIRA, M.L.C. & DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,.34: 2007-2013, 1999.

BAKER, N.R.; EAST, T.M. & LONG, S.P. Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays*. II Photochemical function of thylakoids *in vivo*. **J. Exp. Bot**., 34:189-197, 1983.

BALACHANDRAN, S.; HURRY, V.M.; KELLEY, S.E.; OSMOND, C.B.; ROBINSON, S.A.; ROHOZINSKI, J.; SEATON, G.G.R. & SIMS, D.A. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v.100, n.2, p.203- 213, 1997.

BARTLEY, G.E & SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. **Plant Cell.** 7:1027-1038, 1995.

BERRY, J. & BJÖRKMAN, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.491-543, 1980.

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

BILGER, W.; SCHREIBER, U. & BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v.102, n.4, p.425-432, 1995.

BJÖRKMAN, O. & Demming, B. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. ***Planta*****,** 170:489-504. 1987.

BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B. & ZIEGLER, H. (eds).Encyclopedia of

Plant Physiology: **Physiological Plant Ecology I**. New York, Springer-Verlag, V.12a. (New series), p.57-107. 1981.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. & ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C. & LONG. S.P. (Eds.) **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London, Chapman & Hall, p.193-205, 1993.

BOORDMAN, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 28:355-377. 1997.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A. DE; MOREIRA, F. M. & SILVA, A. L. DA Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:783-789, 2003.

BOZZOLA, J. J. & RUSSEL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett publishers, 542 p. 1992.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.& JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** 1st ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. pp. 911-915, 2000.

BURROWS, G.E. Comparative anatomy of the photosynthetic organs of 39 xeromorphic species from Subhumid New South Wales, Australia. **International Journal of Plant Sciences,** 162: 411-430. 2001.

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

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S. & PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastuctural and physiological aspects. **Tree Physiology**, 26:377–388, 2005.

CHAZDON, R. L. & KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light aclimation. **Functional Ecology**, 7: 385-394, 1993.

CRITCHLEY, C. Photoinhibition. In: *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise* (A.S. Ragavendra, ed.). Cambridge University Press, Cambridge. p. 264-272, 1998.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y. & LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, 53:181–187, 1981.

DESJARDINS, Y. Overview of factors influencing photosynthesis of micropropaged plantlets and their effect on acclimatization. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (Ed.). **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures.** Saint-Paul-lez-Durance: Centre d'études de Cadarache, p. 145-160, 1995.

DONNELY, D.J. & VIDAVER, W.E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from cultured to soil. **Journal of the the American Society for Horticultural Science,** 109:172-176, 1984.

ENGEL, V.L. & POGGIANE, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Braz. J. Plant Physiol**. 3:39-45, 1991.

FAHN, A. & CUTLER, D.F. **Xerophytes**. Encyclopedia of Plant Anatomy. Vol. XIII n. 3. Berlin, Gebrüder Borntraeger. 1992.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4th ed. Oxford, Pergamon Press. p. 587, 1990.

FARIA, J.L.C. & SEGURA, J. *In vitro* control of adventitous bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa.* **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 33: 209-212, 1997.

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

FONTES, M.A.; OTONI, W.C.; CAROLINO, S.M.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; FÁRI, M. & LOURO, R.P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, 19:81–87, 1999.

FRACHEBOUD, Y. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm. (02 jun. 2007)

FRANCK, T.; CRÉVECOEUR, M.; WUEST, J.; GREPPIN, H. & GASPAR, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. **Biotechniques and Histochemistry**, 73:32-43, 1997.

GALZY, R. & COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** 31:239-244, 1992.

GASPAR, T.; HAGÈGE, D.; KEVERS, C.; PENEL, C.; CRÈVECOEUR, M.; ENGELMANN, I.; GREPPIN, H. & FOIDART, J. M. When plant teratomas

turn into cancers in the absence of pathogens. **Physiologia Plantarum**, 83:696–701, 1991.

GOULET, F. & BELLEFLEUR, P. Leaf morphology plasticity in response to light environment in deciduos tree species and its implication on forest succession. **Canadian Journal Forest Research**,16: 1192-1195, 1986.

GRIBBLE, K.; TINGLE, J.; SARAFIS, V.; HEATON, A. & HOLFORD, P. Position of water in vitrified plants visualized by NMR imaging. **Protoplasma**, 201:110-114, 1998.

HAN, B.H.; PAEK, K.Y. & CHOI, J.K. Structural characteristics of vitrified and glaucous plantlets in *Gypsophila paniculata* L. *in vitro*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, 33:177-189, 1992.

HENDRY, G.A.F & PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry GAF, Grime JP (eds.), Methods in Comparative Plant Ecology, London, UK. p. 148-152, 1993.

IACONO, F. & MARTINELLI, L. CO_2 assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated *in vivo* and *in vitro*: estimation of stomatal and cuticular transpiration *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux**, 32:91-97, 1998.

IAREMA, L. *Lippia filifolia Mart*. (Verbenaceae) **cultivada** *in vitro*: **anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Mestrado. 85 p. 2004.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology, 27:137-138, 1965.

KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.F. & GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, 61:69-74, 1984.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J. & GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 77:181–191, 2004.

KITAO, M.; LEI, T.T.; KOIKE, T.; TOBITA, H.; MARUYAMA, Y.; MATSUMOTO, Y. & ANG L.H. Temperature response and photoinhibition investigated by chlorophyll fluorescence measurements for four distinct species of dipterocarp trees. **Physiol. Plant**. 109:284-290, 2000.

KLICH. M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, 44: 171-183, 2000.

KRAUSE, G. H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damage and protective mechanisms **Physiologia Plantarum**, 74, 566-574, 1988.

KRAUSE, G.H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 42:313-349, 1991.

KÜRSCHNER, W.M.; STULEN, I.; WADNER, F. & KUIPER, P.J. Comparison of Paleobotanical Observations with Experimental Data on the Leaf Anatomy of Durmast Oak, *Quercus petraea* (Fagaceae) in Response to Environmental Change**. Annals of Botany**, 81: 657-664, 1998.

LYSHEDE, O.B. Comparative and functional leaf anatomy of selected Alstroemeriaceae of mainly Chilean origin. **Botanical Journal of the Linnean Society,**140: 261-272, 2002.

MAUSETH, J. **Plant Anatomy**. England: Pergaman-Press, 1988. 588 p.

METCALFE, C. R. & CHALK, L. **Anatomy of Dicotyledons***.* Clarendon Press, Oxford, v. II**,** 2nd ed., 297 p. 1983.

MICHALCZUK, B. & MICHALCZUK, L. The effect of light quality on regeneration rate and plantlet development in transgenic Petunia 'revolution' (Surfinia type). **Acta Horticulturae**, 530:397-401, 2000.

MOHAMED, M.E., HICKS, R.G.T. & BLAKESLEY, D. Shoot regeneration from mature endosperm of *Passiflora foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** .46:161-164, 1996.

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

Niyogi, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50: 333-359, 1999.

NOBEL, P. S. *Physicochemical and Environmental Plant Physilogy.* Academic Press, San Diego, 635 p. 1991.

NOÈ, N., ECCHER, T. & BONINI, L. Effect of irradiance and spectral composition of radiation on *in vitro* shoot proliferation in *Malus domestica* Borkh. **Biologia Plantarum**, 39:491-497, 1997.

ORTÍZ, C. E. R. **Avaliação fisiológica de plantas de urucum (***Bixa orellana* ***L*.).** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal. 100 p. 2004.

OSMOND, C.B. What is photoinhibition? In: BAKER, N.R. & BOWYER, J.R. (Ed.) **Photoinhibition of photosynthesis**. Oxford: Bios Scientific,. p.1-24. 1994.

PAEK, K.-Y. & HAHN, E.J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoo-tip cultures of Lisianthus [(*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 36:128-132, 2000.

PAIVA, E. A. S.; ISAIAS, R. M. DOS S.; VALE, F. H. A. & QUEIROZ, C. G. DE S. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom (Commelinaceae) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46:617-624, 2003.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C. & JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99:199–205, 2004.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D. & PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, 42:481-497, 1999.

PULLERITS, T. & SUNDSTROM, V. Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes: Toward understanding how and why. Acc. Chem. Res. 29:381-389, 1996.

PFÜNDEL, E. & BILGER, W. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. **Photosynthesis Research**, 42:89-109. 1994.

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

RHIZOPOULOU, S. & PSARAS, G.K. Development and Structure of Drought-tolerant Leaves of the Mediterranean Shrub *Capparis spinosa* L. **Annals of Botany**, 92: 377-383-n0 0 12 113.4 373.6,-25..10h 0.0003 ThnlEh Tw /MCID300

SANTAMARIA, J. M. & KERSTIENS, G. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle developement. **Physiologia Plantarum**, 91:191-195, 1994.

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

SIEFERMANN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiologia Plantarum**, 69, 561-568, 1987.

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

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

SVENSSON, M. Effect of irradiance level during *in vitro* propagation of *Aristolochia manchuriensis*. **Acta Horticulturae,** 530:403-408, 2000.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Photosynthesis: physiological and ecological considerations. In: L. Taiz, E. Zeiger (Eds.). **Plant Physiology** Sinauer Associates, Sunderland. pp. 227-249, 1998.

TORREGROSA, L. & BOUQUET, A. *In vitro* propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, 34:237-238, 1995.

WETSTEIN, H & SOMMER, H. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultures *Liquidambar Styraciflua* plantlets during acclimatization. **Journal of the American Society for Horticulturae**, 118: 419-424, 1983.

WRIGHT, D.P.; BALDWIN, B.C.; SHEPHARD, M.C. & SCHOLES, J.D. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 47:255-267, 1995.

YOUNG, A. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. **Plant Physiology**, 83:705-708, 1991.

ZAER, J. B. & MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: Bonga, J. M.; Durzan, D. J. (Eds.). **Tissue Culture in Forestry**. 2nd. Ed. p.231-235. 1985.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M.A.L. (Eds.) **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 493-516, 1995.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) **Micropropagation: Technology and Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 45–69, 1991.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Programa de Análises Estatísticas e Genética. SAEG 8.0, **UFV-MG**, 2000.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo