



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FISIOLOGIA VEGETAL**

**CARACTERIZAÇÃO FOTOSSINTÉTICA E DO DESENVOLVIMENTO  
DE PLANTAS DE BATATA-DOCE CULTIVADAS *IN VITRO* E  
ACLIMATIZADAS**

**FRANCINE FERREIRA CASSANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. José Antonio Peters, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Abril de 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FRANCINE FERREIRA CASSANA

CARACTERIZAÇÃO FOTOSSINTÉTICA E DO DESENVOLVIMENTO DE  
PLANTAS DE BATATA-DOCE CULTIVADAS *IN VITRO* E  
ACLIMATIZADAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. José Antonio Peters, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

---

Prof. Dr. Ariano Magalhães Junior

---

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

---

Prof. Dr. José Antonio Peters  
(Orientador)

Aos meus pais, Antônia e Osmar,  
pelo amor e confiança de sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Antonio Peters, que através da sua paciência, amizade e inestimável orientação tornou-se, para mim, um exemplo de dedicação e amor pela profissão.

Ao Professor Dr. Marcos Antonio Bacarin, por sua co-orientação e amizade durante o transcorrer do curso.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga, por sua co-orientação, amizade e dedicação.

Ao Professor Dr. Valmor João Bianchi, que sempre esteve disposto a me ajudar, meu muito obrigado.

Aos colegas e amigos: Antelmo Falqueto, meu companheiro de incontáveis idas e vindas da casa de vegetação, tornando viável a execução de parte do meu experimento; à Juliana Bandeira pelo auxílio nas avaliações dos meus experimentos e à adorada Cláudia Simone Madruga Lima por sua ajuda inestimável e entusiasmo com relação à minha pesquisa.

A todos colegas e amigos de curso, do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e aos Professores e Funcionários do Departamento de Botânica.

Ao Ramon Dias, por seu amor, companheirismo e lealdade.

Aos meus pais e irmã, pelo amor, apoio, dedicação e orgulho, mesmo sem saber o que exatamente faço.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação profissional, principalmente, àqueles que, através de lições que não estão escritas em lugar algum, deixaram um pouco de si próprios.

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| <b>SUMÁRIO</b> .....  | viii |
| <b>SUMMARY</b> .....  | ix   |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....   | 1    |
| <b>CAPÍTULO 1: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E TEOR DE<br/>PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM PLANTAS DE BATATA-<br/>DOCE CV. ILS19 CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> SOB DIFERENTES<br/>CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E DENSIDADES DE FLUXO DE<br/>FÓTONS</b> |      |
| INTRODUÇÃO.....   | 6    |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 10   |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 13   |
| CONCLUSÃO.....  | 25   |

**CAPÍTULO 2: FOTOSSÍNTESE POTENCIAL E FLUORESCÊNCIA DAS CLOROFILAS EM PLANTAS DE BATATA-DOCE CULTIVADAS *IN VITRO* E ACLIMATIZADAS**

|  |           |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO.....                        | 26        |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                | 28        |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....            | 32        |
| CONCLUSÃO.....                         | 46        |
| <br>                                   |           |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>47</b> |



## SUMÁRIO

CASSANA, F.F. Universidade Federal de Pelotas, Abril de 2007. **Caracterização fotossintética e do desenvolvimento de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas.** Orientador: José Antonio Peters. Co-orientadores: Marcos Antonio Bacarin e Eugenia Jacira Bolacel Braga.

A batata doce é uma espécie de expressão econômica que apresenta vários fatores que limitam sua produtividade, dentre os quais se destaca a utilização de ramas e raízes para a obtenção de mudas, que favorece a disseminação de doenças, principalmente viroses. Desta forma, a técnica de cultura de tecidos é de extrema importância para produção destas mudas, com alta qualidade genética e fitossanitária. Entretanto, fatores bioquímicos e ambientais interem no metabolismo *in vitro*, dificultando o estabelecimento das plantas durante a fase de aclimatização. O objetivo deste estudo foi analisar a influência da sacarose e da densidade de fluxo de fótons no desenvolvimento e na capacidade fotossintética de plantas de batata doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. A densidade de fluxo de fótons de  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  maximizou o crescimento e desenvolvimento e o acréscimo na concentração de sacarose proporcionou um aumento significativo nos teores de pigmentos fotossintéticos, como no aumento da biomassa das plantas. Para a determinação das características fotossintéticas folhas geradas *in vitro* e *ex vitro* foram monitoradas sob o aspecto da Fotossíntese Potencial e Fluorescência das Clorofilas. Os resultados demonstraram que a concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e a densidade de fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionaram condições fisiológicas que permitiram uma adaptação mais eficiente durante a aclimatização. Por outro lado, não ocorreu efeito dos tratamentos *in vitro* na performance fotossintética das folhas geradas *ex vitro*.

## SUMMARY

CASSANA, F.F. Universidade Federal de Pelotas, April 2007. **Characterization photosynthetic and of the development of sweet potato cultivated in vitro and acimatized.** Adviser: José Antonio Peters. Co-advisers: Marcos Antonio Bacarin e Eugenia Jacira Bolacel Braga.

Sweet potato is a species of economical importance that presents several factors that limit its productivity, of which the main one is the use of shoots and roots in order to obtain plantlets, favoring diseases dissemination, mainly viruses. Therefore, the tissue culture is of great importance for the production of plantlets with improved genetic and phyto-sanitary qualities. However, biochemical and environmental factors interfere in the metabolism in vitro, hindering the establishment of the plants during the acimatization phase. The objective of this study was to analyze the influence of the sucrose and of the photon flux density in the development and in the photosynthetic capacity of sweet potato plants cultivated in vitro and acimatized. The photon flux density of  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  maximized growth and development and, the increase in sucrose concentration allowed a significant increase in photosynthetic pigment contents as well as an increase of plant biomass. For the determination of the photosynthetic characteristics (Potential Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence) were monitored in leaves generated in vitro and ex vitro, after transferring the plants to a greenhouse. The results demonstrated that the sucrose concentration of  $20 \text{ g L}^{-1}$  and the photon flux density of  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided physiological conditions which allowed a more efficient adaptation during acimatization. However, there was no effect of in vitro treatments in the photosynthetic performance of leaves generated ex vitro.

## INTRODUÇÃO GERAL

A origem da batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) é discutida pelos historiadores e pessoas interessadas no assunto. Alguns estudiosos consideram que a origem da batata-doce seja do continente africano, onde era utilizada pelos nativos, sendo, após muitos séculos, levada para a América e Ásia. Outros consideram que a batata-doce é originária das Américas Central e do Sul, sendo encontrada desde a Península de Yucatam, no México, até a Colômbia. Relatos de seu uso remontam de mais de dez mil anos, com base em análise de batatas secas encontradas em cavernas localizadas no vale de Chilca Canyon, no Peru, e em evidências contidas em escritos arqueológicos encontrados na região ocupada pelos Maias, na América Central (Silva *et al.*, 2002). Outro argumento a favor da origem latino-americana é o fato de existir mais de duzentas espécies de batata-doce no continente americano, enquanto que na África, Ásia e Europa, ocorrem cerca de cem (Barrera, 1986).

A batata-doce é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Convolvulaceae, que agrupa, aproximadamente, 50 gêneros e mais de 1.000 espécies sendo, a *I. batatas*, a única com cultivo de expressão econômica (Edmond & Ammerman, 1971). É uma planta herbácea, normalmente com hábito de crescimento rasteiro, mas podendo também ser ereto ou intermediário (Ritschel *et al.*, 1999), com ramificações de tamanho, cor e pilosidade variáveis;

folhas largas com tamanhos e recortes diferentes; flores hermafroditas de fecundação cruzada e fruto do tipo cápsula deiscente com até quatro sementes de cor castanho-claro (Edmond & Ammerman, 1971).

A batata-doce é cultivada em 111 países, sendo que aproximadamente 90% da produção é obtida na Ásia, apenas 5% na África e 5% no restante do mundo. Apenas 2% da produção estão em países industrializados como os Estados Unidos e Japão. A produção mundial de batata-doce, no ano de 2004, foi de 127 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 9 milhões de hectares (FAOSTAT, 2005). A China ocupa o primeiro lugar em área plantada (5,3 milhões de hectares) com uma produção de 106 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2005). Já no Brasil, a área plantada com essa hortaliça foi de 43.000 hectares, colocando o país no 19º lugar dentre os países produtores e, em termos de produção, ocupa a 16ª posição com 495 mil toneladas (FAOSTAT, 2005).

No Brasil, a batata-doce é cultivada em todas as regiões. Embora bem disseminada no país, está mais presente nas regiões Sul e Nordeste, notadamente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco e Paraíba (Silva *et al.*, 2002). O perfil das regiões produtoras no país coloca a região Sul em primeiro lugar, responsável por cerca de 55% da produção nacional, seguida pela região Nordeste com uma participação de 27% (FAOSTAT, 2005).

A batata-doce constitui um alimento altamente energético, rico em carboidratos (superior a 30% em média em peso da massa fresca) e boa fonte de vitaminas, principalmente B e C (Folquer, 1978). Além disso, as cultivares de polpa amarela apresentam elevados teores de  $\beta$ -carotenos, substância precursora da vitamina A, de grande importância nutricional e industrial (Corrêa *et al.*, 2003). Levando-se em conta a grande limitação na disponibilidade de outros alimentos em períodos críticos de estiagem prolongada, a cultura da batata-doce assume maior importância social no nordeste brasileiro (Magalhães, 2005). Além disso, quando comparada com as culturas de arroz, banana, milho e sorgo, a batata-doce é mais eficiente em quantidade de energia líquida produzida por unidade de área e tempo (Silva *et al.*, 2002), sendo capaz de nutrir mais indivíduos por hectare que qualquer outra espécie (Woolfe, 1992).

Além do uso para alimentação humana e animal, seja na forma *in natura* ou industrializada, a batata-doce apresenta potencial para produção de biomassa na fabricação de etanol e metano (Smith & Frank, 1984). Além disso, alguns países, como os Estados Unidos e Japão industrializam essa hortaliça na forma de xaropes, geléias, sorvetes, corantes, tecidos, adesivos, glucose, álcool, entre outros (Miranda *et al.*, 1995).

Os métodos vegetativos, por meio de ramas e raízes tuberosas, são tradicionalmente empregados na propagação da batata-doce (Folquer, 1978). Porém, estes métodos apresentam sérios problemas, dentre os quais se destaca a dificuldade de conservação do material, disseminação de pragas e doenças, pequena capacidade multiplicativa do material disponível, desuniformidade nos plantios e baixa produtividade (Corrêa *et al.*, 2003). Além disso, o material de propagação pode sofrer degenerescência em decorrência do acúmulo de doenças, principalmente as de origem virótica (Silva *et al.*, 1991).

Durante a cultura *in vitro*, a capacidade dos explantes sobreviverem, desenvolverem e se multiplicarem é conseqüência de vários fatores, como o genético, o estado fisiológico, a composição do meio de cultura e as condições ambientais de cultivo (Pereira *et al.*, 2003). O uso de um meio de cultura apropriado para cada fase do cultivo é condição básica, devendo proporcionar os nutrientes necessários ao metabolismo das células vegetais em cultivo para o crescimento e diferenciação dos tecidos (Kozai *et al.*, 1997). Entretanto, a exploração do processo de micropropagação, muitas vezes, é restringida pelos custos de produção, especialmente os relacionados ao meio de cultura (agentes geleificantes), pela contaminação e também pelas perdas devido a baixa taxa de sobrevivência durante a aclimatização (Seon *et al.*, 2000; Martin, 2004).

A fonte de carboidrato é de extrema importância para a morfogênese *in vitro* (Romano *et al.*, 1995). As plantas crescidas em um meio contendo sacarose podem exibir baixa competência fotossintética quando comparadas com plantas crescendo *in vivo* (Less *et al.*, 1991 apud Seon *et al.*, 2000), visto que os níveis de carboidratos normalmente usados em cultura de tecidos podem inibir a síntese de clorofila. De acordo com Kozai (1991), na presença de açúcar, as plantas não

desenvolvem capacidade fotoautotrófica, podendo causar crescimento reduzido e morte de plantas durante a fase de aclimatização. Assim, a adição deste carboidrato ao meio de cultura pode afetar negativamente o crescimento de plantas e o processo fotossintético (Kozai *et al.*, 1995; Serret *et al.*, 1997); porém outros autores verificaram que a fonte exógena de açúcar estimulou o crescimento e a fotossíntese, como no cultivo *in vitro* de tabaco (Furbank *et al.*, 1997; Tichá *et al.*, 1998), beterreba (Kovtun & Daie, 1995) e batata (Cournac *et al.*, 1991). De acordo com Le *et al.* (2001) esta contradição na literatura provavelmente reflete os múltiplos papéis dos açúcares solúveis na fisiologia celular, por prover substratos para síntese de macromoléculas e também por servir como um sinal molecular para a regulação de enzimas chaves do metabolismo do carbono. Estes mesmos autores, trabalhando com plantas de tomate, sugerem que a fonte exógena de sacarose pode afetar diretamente o crescimento e a fotossíntese de plantas cultivadas *in vitro* de acordo com as condições de densidade de fluxo de fótons e concentração de gás carbônico.

Da mesma forma, fatores ambientais, como a luz, podem influenciar diretamente a cultura de tecidos. A intensidade luminosa é mais importante que a qualidade e fotoperíodo, pois quanto maior a luz incidente, mais intensa também será a fotossíntese, sendo esta afirmação correta até certo limite, pois a intensidade luminosa pode ser prejudicial após a planta ter atingido seu ponto de saturação lumínica, caracterizado pelo mais alto grau de atividade fotossintetizante (Linhares & Gewandsznajder, 1998). Assim, por um lado a densidade de fluxo de fótons fornecida em excesso ao requerido para assimilação de gás carbônico, pode desencadear processos de fotoinibição como a produção de espécies reativas de oxigênio (Serret *et al.*, 2001; Carvalho & Amâncio, 2002; Horton & Ruban, 2005). Por outro lado, baixo fluxo de fótons, aliado a baixa disponibilidade de gás carbônico e a alta concentração de açúcar no meio durante a cultura *in vitro*, pode gerar condições heterotróficas (Amâncio *et al.*, 1999).

Grout (1988) agrupou as plantas cultivadas em meio asséptico em duas classes. Na primeira, plantas cujas folhas formadas não desenvolvem capacidade fotossintética, quando crescendo em meio contendo sacarose (heterotróficas e

mixotróficas) e, na segunda encontram-se as plantas adaptadas para condições autotróficas *in vitro* que, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar uma significativa taxa fotossintética.

Além dos fatores genéticos, fatores bioquímicos e ambientais interferem na cultura *in vitro*, afetando o crescimento e a fisiologia de plantas. De acordo com o exposto acima, tanto a sacarose como a densidade de fluxo de fótons a que plantas são submetidas durante o cultivo *in vitro*, influenciam o crescimento, o desenvolvimento e a formação do aparato fotossintético, sendo seus efeitos observados até mesmo após a aclimatização. Também existe contradição na literatura a respeito da necessidade ou não de sacarose no meio de cultivo e do indicativo de que a alta densidade de fluxo de fótons pode causar danos ao aparato fotossintético das folhas de plantas cultivadas *in vitro*, inibindo a fotossíntese líquida das mesmas.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi analisar a influência de fatores bioquímicos e ambientais no desenvolvimento de plantas de batata-doce, cultivar ILS19, visando alta eficiência *in vitro*, relacionando-a com as alterações fisiológicas, sob o aspecto fotossintético, ocorridas nas mesmas após a aclimatização.

## **CAPÍTULO 1**

### **CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E TEOR DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM PLANTAS DE BATATA-DOCE cv. ILS19 CULTIVADAS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E DENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS**

#### **INTRODUÇÃO**

A batata-doce é a sexta hortaliça mais consumida no Brasil, sendo uma cultura tipicamente tropical e subtropical, rústica, boa resistência contra a seca e ampla adaptação (Silva *et al.*, 2002; Magalhães, 2005). Apresenta custo de produção relativamente baixo, com investimentos mínimos, e de retorno elevado, sendo uma das hortaliças com maior capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo (Silva *et al.*, 2002). Entretanto, vários fatores são limitantes para a produção da cultura da batata-doce. Por ser um cultivo rústico e pouco exigente, são raros os investimentos e uso de tecnologias (Garcia *et al.*, 1989) e, conseqüentemente, o processo de multiplicação vegetativa, através de ramas e raízes, para a produção comercial, pode acumular, entre gerações de



multiplicação, diversos patógenos, principalmente vírus (Castro *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002). Para Bowkamp (1985), praticamente todas as cultivares de batata-doce cultivadas no sul do Brasil estão infectadas por um ou mais vírus, apresentando sintomas que correspondem a vários tipos de cloroses foliares, malformação de folhas e diminuição do crescimento. Conforme Magalhães (2005), a qualidade fitossanitária de um campo de produção da batata-doce dependerá da qualidade fitossanitária do material utilizado na propagação.

Uma das estratégias para contornar essa limitação da produção de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária é o uso de métodos de cultura de meristemas e de propagação *in vitro* (Madeira *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2006), pois conforme Souza (1990) a cultura de meristemas possibilita a obtenção de mudas livres de vírus e outros patógenos, viabilizando a produção de grande número de plantas que podem ser utilizadas para a formação de matrizes com todo o potencial genético.

A cultura *in vitro* de plantas é uma técnica que não apenas apresenta importância prática na área florestal e agrícola, mas também na ciência básica, sendo, dentro da biologia de plantas uma das técnicas mais polivalentes (Kozai & Kubota, 2001; Amaral, 2003). No campo da aplicação básica, a cultura de tecidos dá suporte técnico também à bioquímica, fisiologia vegetal, fitopatologia, citogenética, melhoramento genético de plantas, farmacologia, obtenção de plantas livres de doenças e micropropagação, baseado no fenômeno de totipotência das células vegetais, isto é, na capacidade de uma única célula se diferenciar formando uma planta completa (Peters, 1986; Kozai, 1988; Amaral, 2003).

Conforme Grattapaglia & Machado (1990), a variabilidade na resposta morfogênica *in vitro*, que existe não apenas entre espécies, mas também dentro de cada genótipo, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados. As diferentes fases da organogênese e os diferentes processos que ocorrem em nível celular durante a regeneração *in vitro* são influenciados bioquimicamente pela composição mineral, vitaminas, fontes de açúcares e reguladores de crescimento, além dos estímulos ambientais aos quais os explantes são

submetidos, como quantidade e qualidade de luz, temperatura, umidade e concentração de CO<sub>2</sub>, entre outros (Carvalho *et al.*, 2001; Peres, 2002; Semorádová *et al.*, 2002). Dessa forma, o controle adequado dessas condições é determinante para o sucesso da regeneração e multiplicação *in vitro*.

Células, tecidos e plantas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de gás carbônico e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficiente para realizar fotossíntese que sustente seu crescimento (Torres *et al.*, 2001). Desta forma, as células possuem o potencial para a fotossíntese *in vitro*, mas o crescimento da maioria das culturas é sustentado pela fonte de carbono adicionado ao meio de cultura (Kozai, 1989; Caldas *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2001), sendo a sacarose o açúcar mais utilizado na micropropagação em concentrações que variam de 2 a 3% (George & Sherrington, 1984; Flores *et al.*, 1999). Entretanto, sua necessidade vem sendo discutida por alguns autores, pois os níveis de sacarose, normalmente usados em cultura de tecidos, podem inibir a síntese de clorofila (George e Sherrington, 1984). De acordo com Kozai (1991), na presença de açúcar, as plantas não desenvolvem capacidade fotoautótrofica, podendo apresentar crescimento reduzido e morte das mudas durante a fase de aclimatização. Conforme Grattapaglia & Machado (1990), concentrações de sacarose inferiores a 2% podem resultar em clorose das culturas e concentrações acima de 4% podem elevar excessivamente o potencial osmótico do meio, dificultando o desenvolvimento do material *in vitro*.

Além dos fatores bioquímicos e de nível celular citados acima, condições ambientais, como a luz, podem influenciar a taxa de multiplicação e o crescimento *in vitro* (Radmann *et al.*, 2001) e, também pode exercer um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar, modificando características como a espessura foliar, a diferenciação do mesófilo, o desenvolvimento vascular, a divisão celular e o desenvolvimento dos estômatos (Gribaudo & Fronda, 1993). Além de influenciar no crescimento e na proliferação das brotações, a intensidade luminosa pode afetar diretamente a formação de raízes, podendo,

também, quando em excesso, reduzir a formação das mesmas (Economou & Read, 1987).

A densidade de fluxo de fótons necessária para a cultura *in vitro* difere entre os estágios de micropropagação, o tipo de explante e as diferentes espécies vegetais (Zimmerman, 1981; Economou & Read, 1987). Entretanto as respostas fotomorfogênicas não são relacionadas somente à quantidade (densidade de fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo), mas também à composição espectral (comprimento de onda) da luz (Economou & Read, 1987). Sua intensidade, qualidade e duração afetam particularmente o processo fotossintético e os processos mediados pelo fitocromo (Amaral, 2003). Assim, a densidade de fluxo de fótons e o comprimento de onda podem ter efeitos positivos e/ou negativos no cultivo *in vitro* (Seabrook, 1987; Kozai *et al.*, 1991; Kodim & Zapata-Arias, 1999).

Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas de batata-doce, cv. ILS19, submetidas à diferentes densidades de fluxo de fótons e diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura e seus efeitos sobre os teores de pigmentos cloroplastídicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

### **Multiplicação do material vegetal e instalação dos experimentos**

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas plantas de batata-doce, (*I. batatas*), cv. ILS19, oriundas da cultura de meristemas. A partir desta cultura, foram realizadas várias multiplicações, por meio de segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose até a obtenção da quantidade de plantas necessárias para a instalação dos experimentos.

### **Crescimento e Desenvolvimento *in vitro***

Segmentos nodais de batata-doce, com cerca de 1 cm de comprimento, foram utilizados como explantes e inoculados em meios MS, contendo diferentes concentrações de sacarose (Reagen) (5, 10, 20, 30 e 40 g L<sup>-1</sup>). Aos diversos meios foram acrescentados 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP

(Sigma), sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição de ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ). Os meios foram distribuídos em erlenmeyers de 250 mL e os frascos vedados com algodão. A esterilização dos meios de cultura foi feita por autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  e 1,5 atm, por 20 minutos.

O cultivo *in vitro* foi realizado, durante 60 dias, em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante o período claro e  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  durante o período escuro e sob diferentes densidades de fluxo de fótons: 14, 21, 42 e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , determinadas através de um sensor quântico (Hansatech QSRED) e fornecidas por lâmpadas fluorescentes “luz do dia especial”.

### **Variáveis e delineamento experimental**

No primeiro experimento, características morfológicas foram avaliadas por meio das médias das seguintes variáveis: altura da parte aérea, número de folhas, comprimento do sistema radicular, número de raízes, área foliar e massa seca da parte aérea e do sistema radicular.

A altura da parte aérea foi determinada a partir da medida entre a base e o ápice do caule, enquanto que o comprimento médio do sistema radicular foi obtido da base do caule ao ápice radicular de cada raiz, ambos expressos em cm.

Para a determinação da área foliar foi utilizado um integrador de área modelo LI3000, sendo essa expressa em  $\text{cm}^2$ . Para esta avaliação, foram utilizadas quatro repetições contendo 25 folhas cada.

Para a determinação da massa seca, a parte aérea foi separada do sistema radicular, os quais foram acondicionados separadamente em sacos de papel e colocados em estufa de secagem a  $70^\circ\text{C}$ , por um período de 72 horas, sendo os valores expressos em mg por planta.

Um segundo experimento foi realizado para quantificação dos teores de pigmentos cloroplastídicos (clorofilas e carotenóides totais). Para extração destes pigmentos folhas frescas foram maceradas (aproximadamente 150 mg) com acetona 80% gelada, em almofariz com auxílio de pistilo, sendo, posteriormente, os extratos filtrados em funil com papel filtro e transferidas para balão

volumétrico (25 mL), em sala com luz verde. Os teores dos pigmentos presentes nos extratos foram medidos, por meio de leituras de absorbâncias, em espectrofotômetro UV-VIS, nos comprimentos de onda de 663 nm, 645 nm para o cálculo dos teores das clorofilas e 470 nm para o cálculo dos teores dos carotenóides e calculados, conforme Lichtenthaler (1987), utilizando as seguintes equações, dadas em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ :

$$\text{Clorofila } a: 12,23 A_{663} - 2,79 A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b: 21,50 A_{645} - 5,10 A_{663}$$

$$\text{Clorofila total: } 7,15 A_{663} + 18,71 A_{645}$$

$$\text{Carotenóides totais: } (1000 A_{470} - 1,82 \text{ Chl } a - 85,02 \text{ Chl } b) / 198$$

Os valores foram corrigidos para miligramas de pigmento fotossintético por grama de massa fresca através da multiplicação do resultado pelo volume final do extrato (mL), dividido pela massa fresca (g) e multiplicado por 0,001, sendo o resultado final expresso em miligramas de pigmento por grama de massa fresca ( $\text{mg g}^{-1}$  MF).

O delineamento experimental utilizado em cada experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x4, sendo cinco concentrações de sacarose e quatro densidades de fluxo de fótons, com 5 repetições. Cada repetição foi constituída por 5 explantes, totalizando 25 explantes por tratamento. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes.

A análise estatística foi realizada pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores – SANEST (Zonta & Machado, 1987) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às densidades de fluxo de fótons estudadas, observou-se que  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinou maior altura da parte aérea, em todas as concentrações de sacarose, embora não diferindo estatisticamente dos demais fluxos quando utilizado  $5 \text{ g L}^{-1}$  deste carboidrato (Tabela 1). Em todas as densidades de fluxo de fótons, a altura da parte aérea ao final do cultivo *in vitro*, foi maior nas concentrações mais elevadas de sacarose, sendo 12,86 vezes maior em plantas cultivadas sob  $40 \text{ g L}^{-1}$  em relação a  $5 \text{ g L}^{-1}$ , sob a densidade de fluxo de fótons de  $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com Nicoloso *et al.* (2003), os quais estudaram o efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*, e verificaram que a altura média das brotações e altura da maior brotação aumentaram com o acréscimo da concentração de sacarose (de 30 até  $60 \text{ g L}^{-1}$ ). A maior altura média da parte aérea (6,20 cm), obtida sob  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, foi similar a obtida por Souza (1990) para a multiplicação *in vitro* desta mesma espécie, mesmo quando utilizando o meio de cultura MS, contendo  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido giberélico e fluxo de fótons de  $53,32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Fuentes *et al.* (2005), trabalhando com crescimento *in vitro* de plantas de coco sob diferentes concentrações de sacarose e diferentes densidades de fluxo

de fótons, observaram que baixas densidades de fluxo de fótons e baixas concentrações de sacarose proporcionavam plantas maiores, enquanto que altas concentrações deste açúcar, no meio de cultivo, induzia menor crescimento. No presente estudo, a altura da parte aérea foi maior sob  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo similares aos obtidos pelos autores citados acima, visto que a baixa densidade de fluxo de fótons utilizada pelos mesmos foi de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Entretanto, observou-se que quanto maior a concentração de sacarose, maior foi a altura média da parte aérea das plantas de batata-doce, diferentemente dos resultados obtidos por Fuentes *et al.* (2005), que relataram que sob  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  as plantas cultivadas em concentrações extremas de sacarose (0 ou  $90 \text{ g L}^{-1}$ ) mostraram menor altura da parte aérea do que as desenvolvidas em 22,5 ou  $45,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose.

Observou-se, neste estudo, que o número médio de folhas por planta foi maior e praticamente constante sob a densidade de fluxo de fótons de  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , não havendo diferenças significativas entre as concentrações de sacarose (Tabela 1). Entretanto, nas demais densidades de fluxo de fótons foi observado que o acréscimo da concentração de sacarose promoveu um aumento significativo do número de folhas, sendo que sob  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o número de folhas foi 4,23 vezes maior em  $40 \text{ g L}^{-1}$  em relação a menor concentração de sacarose. Estes resultados diferem dos resultados obtidos por Ambrósio & Melo (2004), os quais indicaram uma redução no número de folhas de plantas de *Nephrolepis biserrata* (Sw.) devido ao aumento da concentração de sacarose nos meios de cultura. Já no estudo desenvolvido por Zanandrea (2006), o número de folhas por brotação de macieira foi estatisticamente superior aos demais no tratamento com  $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ocorrendo uma redução significativa com  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , independente do meio de cultura utilizado. Fuentes *et al.* (2005) salientaram que o número de folhas de coco foi afetado negativamente somente quando plantas foram submetidas a concentrações extremas de sacarose (0 ou  $90 \text{ g L}^{-1}$ ). No presente trabalho, uma redução brusca do número de folhas foi observado quando plantas de batata-doce foram mantidas em  $5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose associado às densidades de fluxo de fótons extremas ( $14$  ou  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),



enquanto que os maiores valores foram encontrados no cultivo contendo 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo que não houve diferenças significativas entre as densidades de fluxo de fótons nesta concentração de açúcar (Tabela 1).

Observações visuais permitiram verificar que plantas cultivadas sob menor fluxo de fótons (14  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e menor concentração de sacarose (5 g L<sup>-1</sup>) apresentavam caules mais finos, flexíveis e de coloração verde-clara, enquanto que nos tratamentos com maiores concentrações de sacarose e maiores densidades de fluxo de fótons, as plantas apresentavam caules mais rígidos, com maior diâmetro e de coloração marrom. Resultados semelhantes foram observados por Radmann *et al.* (2001) e Zanandrea (2006), trabalhando respectivamente, com multiplicação *in vitro* de *Gypsophila paniculata* e de brotos de macieira sob diferentes densidades de fluxos de fótons.

Em relação ao comprimento do sistema radicular, não foram observadas diferenças significativas entre as densidades de fluxo de fótons quando as plantas cresceram no meio de cultivo contendo 5 ou 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 1). Nestas concentrações observaram-se os menores e os maiores valores para o comprimento do sistema radicular, respectivamente. Nas demais concentrações deste açúcar, a densidade de 42  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou o maior comprimento médio do sistema radicular, apesar de não diferir significativamente da densidade de fluxo de fótons de 21  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nas concentrações de 10 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, bem como da densidade de 14  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na concentração de 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 1). George (1996) relata que, para formação de raízes *in vitro* há necessidade de energia e carboidratos, sendo estes fornecidos através da fotossíntese (em condições autotróficas) ou oriunda de uma fonte exógena de açúcar (em sistemas heterotróficos ou mixotróficos). O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando a fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos e, para a maioria das espécies, a formação de raízes ocorre pela adição de 20 a 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (George, 1996; Leite *et al.*, 2000).

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar que o comprimento do sistema radicular das plantas de batata-doce aumentou com o

acréscimo de sacarose no meio de cultivo (Tabela 1). Souza (1990) verificou que as plantas de batata-doce apresentavam raízes bem desenvolvidas, compridas e ramificadas nos meios em que foi utilizado somente o ácido giberélico. Neste estudo, em que foi utilizado BAP como regulador do crescimento, estas características de raiz estavam presentes em plantas cultivadas com as maiores concentrações (30 e 40 g L<sup>-1</sup>) de sacarose (Tabela 1).

Quanto ao número de raízes, não houve diferenças significativas entre as densidades de fluxo de fótons utilizadas, com exceção de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  que foi significativamente menor que as demais densidades, quando utilizado 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Nesta mesma densidade de fluxo de fótons, não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de 5, 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, ocorrendo, no entanto, um aumento significativo do número de raízes quando as plantas foram cultivadas em 30 e 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 1). Em todas as densidades de fluxo de fótons, baixas concentrações de sacarose (5 e 10 g L<sup>-1</sup>) induziram um número de raízes significativamente menor que as demais concentrações deste açúcar (Tabela 1). Conforme Mc Cown (1988), quando o suprimento de fotossintatos é insuficiente, não há formação de raízes *in vitro*.

A presença de sacarose a partir de 30 g L<sup>-1</sup> mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das raízes *in vitro*, tendo em vista que, o comprimento médio do sistema radicular, bem como o número médio de raízes formadas nas plantas crescidas sob baixas concentrações de sacarose foi bastante inferior aos formados nas demais concentrações deste açúcar. Os dados obtidos são concordantes com as afirmações de vários autores de que a presença de carboidrato é essencial para o enraizamento *in vitro* de muitas espécies (Sriskandarajah & Mullins, 1981; George & Sherrington, 1984; Grattapaglia & Machado, 1990). Entre as densidades de fluxo de fótons, 42  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou o maior comprimento do sistema radicular (23,43 cm) e o maior número de raízes (2,14) por planta (Tabela 1).

Observou-se que a densidade de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinou a maior área foliar quando as plantas foram cultivadas com 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose (5,16 cm<sup>2</sup>). Neste mesmo fluxo de fótons, observou-se o menor valor de área foliar

(0,16 cm<sup>2</sup>), quando as plantas foram cultivadas com 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, mas não diferindo estatisticamente dos demais fluxos de fótons (Tabela 1).

Não foram observadas diferenças significativas entre as densidades de fluxo de fótons, quando as plantas foram cultivadas em 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, concentração na qual se obteve os menores valores de área foliar (Tabela 1). Em geral, a área foliar aumentou gradativamente com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo, atingindo os maiores valores em 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, independente da densidade de fluxo de fótons utilizada. Os baixos valores de área foliar obtidos em 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose poderiam estar correlacionados com o baixo acúmulo de energia e, conseqüentemente, baixa atividade metabólica (Calvete *et al.*, 2002), já que a sacarose quando absorvida do meio de cultivo é rapidamente convertida em hexoses e piruvato, que por sua vez podem ser utilizados na respiração e/ou síntese de outros produtos metabólicos (Geiger & Servaites, 1991). Observou-se, portanto, que houve uma maior capacidade de expansão foliar com o aumento da concentração de sacarose, principalmente em 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, densidade de fluxo de fótons que pode induzir processos de fotoinibição durante o cultivo *in vitro*, conforme observado por Zanandrea (2006).

**Tabela 1.** Características morfológicas de plantas de batata-doce, cv. ILS 19, cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose e densidades de fluxos de fótons

| Características morfológicas                            | DFF*  | Concentração de sacarose (g L <sup>-1</sup> ) |             |              |              |              | média        |
|---|-------|---|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   |       | 5   | 10          | 20           | 30           | 40           |              |
| Altura da parte aérea (cm)                              | 14    | 0,30 aC                                       | 0,86 bC     | 1,37 bBC     | 2,59 cAB     | 3,86 bA      | <b>1,80</b>  |
|   | 21    | 0,48 aC                                       | 1,15 abC    | 2,04 bC      | 4,35 abB     | 6,03 aA      | <b>2,81</b>  |
|   | 42    | 1,75 aD                                       | 2,40 aCD    | 3,95 aBC     | 5,44 aAB     | 6,20 aA      | <b>3,95</b>  |
|   | 60    | 1,00 aC                                       | 1,11 abC    | 1,38 bC      | 3,14 bcB     | 5,36 aA      | <b>2,40</b>  |
|   | média | <b>0,88</b>                                   | <b>1,38</b> | <b>2,19</b>  | <b>3,88</b>  | <b>5,36</b>  |              |
| Número de folhas  | 14    | 2,12 bcC                                      | 5,77 bAB    | 4,88 bB      | 5,68 bAB     | 8,16 aA      | <b>5,32</b>  |
|   | 21    | 3,52 bB                                       | 4,37 bB     | 4,73 bB      | 7,19 abA     | 9,28 aA      | <b>5,82</b>  |
|   | 42    | 7,29 aA                                       | 8,43 aA     | 7,39 aA      | 8,43 aA      | 8,22 aA      | <b>7,95</b>  |
|   | 60    | 1,95 cC                                       | 5,38 bB     | 6,52 abAB    | 7,07 abAB    | 8,33 aA      | <b>5,85</b>  |
|   | média | <b>3,72</b>                                   | <b>5,99</b> | <b>5,88</b>  | <b>7,09</b>  | <b>8,50</b>  |              |
| Comprimento do Sistema Radicular (cm)                   | 14    | 0,45 aD                                       | 8,90 abCD   | 12,46 bcBC   | 21,80 bAB    | 27,81 aA     | <b>14,28</b> |
|   | 21    | 2,78 aC                                       | 8,73 abBC   | 17,11 bB     | 32,04 aA     | 32,90 aA     | <b>18,71</b> |
|   | 42    | 1,22 aC                                       | 13,60 aB    | 31,86 aA     | 35,60 aA     | 34,88 aA     | <b>23,43</b> |
|   | 60    | 1,42 aC                                       | 3,17 bC     | 6,55 cC      | 22,43 bB     | 33,20 aA     | <b>13,35</b> |
|   | média | <b>1,47</b>                                   | <b>8,60</b> | <b>17,00</b> | <b>27,97</b> | <b>32,20</b> |              |
| Número de raízes  | 14    | 0,22 aB                                       | 1,59 aA     | 1,82 aA      | 1,53 aA      | 2,29 aA      | <b>1,49</b>  |
|   | 21    | 0,23 aC                                       | 1,44 aB     | 2,09 aAB     | 2,33 aAB     | 3,40 aA      | <b>1,90</b>  |
|   | 42    | 0,70 aC                                       | 1,54 aBC    | 2,62 aAB     | 2,33 aAB     | 3,53 aA      | <b>2,14</b>  |
|   | 60    | 0,67 aB                                       | 0,85 aB     | 0,83 bB      | 2,61 aA      | 3,25 aA      | <b>1,64</b>  |
|   | média | <b>0,46</b>                                   | <b>1,36</b> | <b>1,84</b>  | <b>2,20</b>  | <b>3,12</b>  |              |
| Área foliar (cm <sup>2</sup> )                          | 14    | 0,26 aAB                                      | 1,22 abAB   | 1,52 aAB     | 1,74 bA      | 2,48 bA      | <b>1,44</b>  |
|   | 21    | 0,51 aC                                       | 1,42 abBC   | 2,07 aAB     | 2,30 abAB    | 3,43 bA      | <b>1,95</b>  |
|   | 42    | 0,58 aB                                       | 2,17 aA     | 2,36 aA      | 3,17 aA      | 2,93 bA      | <b>2,23</b>  |
|   | 60    | 0,16 aD                                       | 0,70 bCD    | 1,86 aC      | 3,34 aB      | 5,16 aA      | <b>2,24</b>  |
|   | média | <b>0,38</b>                                   | <b>1,38</b> | <b>1,95</b>  | <b>2,64</b>  | <b>3,50</b>  |              |
| Massa seca parte aérea (mg planta <sup>-1</sup> )       | 14    | 2,86 dE                                       | 9,23 bD     | 11,11 dC     | 21,43 dB     | 33,33 dA     | <b>15,59</b> |
|   | 21    | 5,00 bE                                       | 6,15 cD     | 16,00 bC     | 28,42 cB     | 65,56 bA     | <b>24,23</b> |
|   | 42    | 7,78 aE                                       | 18,50 aD    | 23,64 aC     | 46,67 aB     | 58,00 cA     | <b>30,92</b> |
|   | 60    | 3,08 cE                                       | 3,57 dD     | 14,00 cC     | 35,33 bB     | 76,00 aA     | <b>26,40</b> |
|   | média | <b>4,68</b>                                   | <b>9,36</b> | <b>16,19</b> | <b>32,96</b> | <b>58,22</b> |              |
| Massa seca sistema radicular (mg planta <sup>-1</sup> ) | 14    | 0,01 bE                                       | 3,08 bD     | 5,55 bC      | 10,00 dB     | 12,21 dA     | <b>6,17</b>  |
|   | 21    | 2,00 aE                                       | 3,85 aD     | 5,00 cC      | 13,68 cB     | 34,43 bA     | <b>11,79</b> |
|   | 42    | 0,01 bE                                       | 3,00 cD     | 8,64 aC      | 22,67 aB     | 33,00 cA     | <b>13,46</b> |
|   | 60    | 0,01 bE                                       | 1,50 dD     | 1,55 dC      | 15,33 bB     | 46,66 aA     | <b>13,01</b> |
|   | média | <b>0,51</b>                                   | <b>2,86</b> | <b>5,19</b>  | <b>15,42</b> | <b>31,58</b> |              |

\* DFF – Densidade de Fluxo de Fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey, dentro de cada característica morfológica estudada.

Níveis crescentes de sacarose resultaram em aumento da biomassa *in vitro*, tanto para a parte aérea como para o sistema radicular (Tabela 1). Quando submetidas a 5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a massa seca da parte aérea das plantas de batata-doce variou, nas densidades de fluxo de fótons utilizadas, entre 2,86 e 7,78 mg planta<sup>-1</sup>, enquanto que sob 40 g L<sup>-1</sup> foram encontrados os valores entre 33,33 e 76,00 mg planta<sup>-1</sup> (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com Calvete *et al.* (2002), que relataram que o maior conteúdo de sacarose no meio de cultivo corresponde à maior concentração de reservas no tecido foliar, o que aumenta a capacidade das folhas de permanecer por mais tempo na planta. Conforme Haimerong & Kubota (2003) a área foliar é um importante determinante para a produção de massa seca.

Em relação à massa seca do sistema radicular (Tabela 1), observou-se que ocorreu um aumento desta variável dependente da concentração de sacarose, a qual determinou níveis de densidade de fluxo de fótons diferentes para um máximo crescimento. Assim, nas concentrações de 5 e 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o melhor fluxo de fótons foi de 21  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aumentando para 42  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  quando utilizado 20 ou 30 g L<sup>-1</sup> deste açúcar. Tendência similar foi obtida quando as plantas foram cultivadas com 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, quando se verificou maior acúmulo de massa seca sob 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Nos resultados obtidos por Fuentes *et al.* (2005), a massa seca da parte aérea e do sistema radicular de plantas de coco submetidas ao fluxo de fótons de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , foi maior nas concentrações intermediárias de sacarose (22,5 e 45 g L<sup>-1</sup>). Ainda segundo estes autores, houve um pequeno decréscimo na massa seca tanto da parte aérea quanto do sistema radicular quando cultivadas sob a concentração de 45 g L<sup>-1</sup>, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, em que a massa seca das plantas de batata-doce foi significativamente maior sob 40 g L<sup>-1</sup> do que nas demais concentrações de sacarose, em todas densidades de fluxo de fótons (Tabela 1).

Zanandrea (2006) estudando o desenvolvimento *in vitro* de plantas de macieira ‘M-9’ submetidas a diferentes fluxos de fótons (7, 14, 21 ou 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e concentrações de sacarose (10 ou 30 g L<sup>-1</sup>), verificou que o

melhor fluxo de fótons para maximizar o crescimento, número de brotações e de folhas foi de  $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , enquanto que a redução na concentração de sacarose não afetou os parâmetros analisados. Neste estudo, verificou-se que a densidade de  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou os maiores valores em todas as características morfológicas analisadas. Também contrastando com o exposto por Zanandrea (2006), a concentração de sacarose influenciou significativamente o crescimento e morfologia das plantas de batata-doce, sendo que seu acréscimo no meio de cultura promoveu um aumento significativo dos parâmetros avaliados. Obviamente, além dos fatores inerentes a peculiaridade de cada espécie, esta discordância entre trabalhos tão similares pode ser devido à forma de multiplicação da macieira (multiplicação por gemas adventícias) e da batata-doce (através de gemas axilares), para os quais utilizam-se altas e baixas concentrações de citocininas, respectivamente.

De forma análoga ao que ocorreu com as análises das características morfológicas, o conteúdo de clorofila *a* das plantas de batata-doce aumentou com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo (Tabela 2). Os menores teores de clorofila *a* foram encontrados em folhas de plantas submetidas a  $5 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, independentemente da densidade de fluxo de fótons. Já o cultivo com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose proporcionou os maiores teores deste pigmento, variando entre  $0,52$  e  $0,63 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ , nas densidades de  $14$ ,  $21$  e  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fluxo de fótons. Apenas sob a densidade de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  houve um aumento do teor de clorofila *a* em  $40 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,87 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) em relação ao obtido com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose ( $0,64 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Tabela 2). De maneira geral, o conteúdo de clorofila *a* não variou entre as densidades de fluxo de fótons, porém  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que proporcionou menor concentração média deste pigmento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Teor de clorofila *a* e *b*, clorofila total e carotenóides totais em plantas de batata-doce, cv. ILS 19, cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose e densidades de fluxos de fótons

| Pigmentos fotossintéticos (mg g <sup>-1</sup> MF*) | DFP** | Concentração de sacarose (g L <sup>-1</sup> ) |             |             |             |             | média       |
|--|-------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|  |       | 5   | 10          | 20          | 30          | 40          |             |
| Clorofila <i>a</i>                                 | 14    | 0,32 aB                                       | 0,47 aAB    | 0,40 bAB    | 0,63 aA     | 0,56 bAB    | <b>0,48</b> |
|  | 21    | 0,18 abC                                      | 0,24 bBC    | 0,31 bABC   | 0,52 aA     | 0,48 bAB    | <b>0,35</b> |
|  | 42    | 0,14 abC                                      | 0,23 bBC    | 0,69 aA     | 0,53 aA     | 0,41 bAB    | <b>0,40</b> |
|  | 60    | 0,07 bC                                       | 0,12 bC     | 0,49 abB    | 0,64 aAB    | 0,87 aA     | <b>0,44</b> |
|  | média | <b>0,18 B</b>                                 | <b>0,27</b> | <b>0,47</b> | <b>0,58</b> | <b>0,58</b> |             |
| Clorofila <i>b</i>                                 | 14    | 0,12 aB                                       | 0,17 aAB    | 0,14 bcB    | 0,24 aA     | 0,21 abAB   | <b>0,18</b> |
|  | 21    | 0,07 aC                                       | 0,09 abBC   | 0,11 cABC   | 0,21 aA     | 0,18 bAB    | <b>0,13</b> |
|  | 42    | 0,05 aD                                       | 0,09 abCD   | 0,26 aA     | 0,22 aAB    | 0,16 bBC    | <b>0,16</b> |
|  | 60    | 0,03 aB                                       | 0,04 bB     | 0,20 abA    | 0,24 aA     | 0,29 aA     | <b>0,16</b> |
|  | média | <b>0,07</b>                                   | <b>0,10</b> | <b>0,18</b> | <b>0,23</b> | <b>0,21</b> |             |
| Clorofila total                                    | 14    | 0,44 aB                                       | 0,66 aAB    | 0,53 bAB    | 0,87 aA     | 0,77 bA     | <b>0,65</b> |
|  | 21    | 0,25 aC                                       | 0,34 abBC   | 0,41 bABC   | 0,72 aA     | 0,66 bAB    | <b>0,48</b> |
|  | 42    | 0,19 aC                                       | 0,31 bBC    | 0,93 aA     | 0,75 aA     | 0,58 bAB    | <b>0,55</b> |
|  | 60    | 0,10 aC                                       | 0,16 bC     | 0,69 abB    | 0,88 aAB    | 1,16 aA     | <b>0,60</b> |
|  | média | <b>0,25</b>                                   | <b>0,37</b> | <b>0,64</b> | <b>0,81</b> | <b>0,79</b> |             |
| Carotenóides totais                                | 14    | 0,06 aA                                       | 0,09 aA     | 0,09 aA     | 0,09 aA     | 0,09 bA     | <b>0,08</b> |
|  | 21    | 0,03 abB                                      | 0,05 bAB    | 0,06 aAB    | 0,08 aA     | 0,08 bA     | <b>0,06</b> |
|  | 42    | 0,03 abB                                      | 0,04 bB     | 0,09 aA     | 0,09 aA     | 0,07 bAB    | <b>0,06</b> |
|  | 60    | 0,02 bD                                       | 0,03 bCD    | 0,06 aBC    | 0,09 aB     | 0,15 aA     | <b>0,07</b> |
|  | média | <b>0,04</b>                                   | <b>0,05</b> | <b>0,08</b> | <b>0,09</b> | <b>0,10</b> |             |

\* MF – Massa Fresca

\*\* DFP – Densidade de Fluxo de Fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Quanto ao conteúdo de clorofila *b*, observou-se um aumento significativo no teor deste pigmento quando as plantas foram cultivadas em meios com concentrações iguais ou superiores a 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 2). Não houve diferenças significativas quanto às densidades de fluxo de fótons quando plantas foram cultivadas em 5 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose variando, dentre estas concentrações, entre 0,03 e 0,24 mg g<sup>-1</sup> MF (Tabela 2). Observou-se que a densidade de fluxo de fótons de 14  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou o maior conteúdo médio de clorofila *b* (Tabela 2).

Observou-se que houve um aumento no teor de clorofila total com o acréscimo da concentração de sacarose no meio de cultura, a partir de 20 g L<sup>-1</sup> deste carboidrato. Os menores e os maiores valores de clorofila total foram de

0,10 e 1,16 mg g<sup>-1</sup> MF, sendo estes valores encontrados em folhas cultivadas sob 5 e 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente, ambos sob a densidade de fluxo de fótons de 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Tabela 2). A densidade de 14 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proporcionou o maior conteúdo médio deste pigmento (0,65 mg g<sup>-1</sup> MF) (Tabela 2).

Viña *et al.* (2001) estudando o efeito das densidades de fluxo de fótons de 35, 60 e 85 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> no crescimento e morfologia de *Persea americana*, verificaram que o conteúdo de clorofila diminuiu com o aumento do fluxo de fótons, entretanto, os resultados não diferiram significativamente entre as densidades de 35 e 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. De acordo com Seon *et al.* (2000), o conteúdo de clorofila pode refletir na competência fotossintética das plantas, sendo que baixo teor de clorofila pode indicar que as folhas foram danificadas devido a processos de fotoinibição.

De modo geral, a baixa concentração de sacarose diminuiu os teores de clorofila (Tabela 2), entretanto não afetou a razão clorofila *a/b*, a qual manteve-se entre 2,55 e 2,75 mg g<sup>-1</sup> MF entre os tratamentos com este carboidrato. Entre as densidades de fluxo de fótons, a razão clorofila *a/b* variou entre 2,60 e 2,72 mg g<sup>-1</sup> MF. Segundo Ito *et al.* (1993), ocorre uma interconversão significativa entre as clorofilas *a* e *b*, de forma a estabelecer uma razão clorofila *a/b* adequada durante a adaptação das folhas a alta ou baixa densidade de fluxo de fótons.

Pandey *et al.* (2006) realizaram um experimento com plantas de *Anoectochilus formosanus* cultivadas *in vitro* e aclimatizadas sob diferentes densidades de fluxo de fótons (60, 180 e 300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os autores observaram que nas plantas aclimatizadas sob alto fluxo de fótons a razão clorofila *a/b* mostrou-se constante, entretanto houve uma forte diminuição do conteúdo de clorofilas *a* e *b* e sugeriram que este resultado foi obtido devido ao excesso de fótons que atuariam na degradação do aparato fotossintético e/ou na redução do tamanho do sistema antena.

Amâncio *et al.* (1999), em um estudo de aclimatização de plantas de videira multiplicadas *in vitro* utilizaram as densidades de fluxo de fótons de 40 ou



90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Sob baixo fluxo de fótons, houve um acréscimo na concentração de clorofila *a* e *b* de folhas novas e persistentes, quando comparadas com folhas originadas *in vitro*, mantendo constante a razão clorofila *a/b*. Entretanto, sob alto fluxo de fótons, o teor de clorofila *a* manteve-se praticamente constante, enquanto que o teor de clorofila *b* diminuiu, promovendo um aumento na relação clorofila *a/b*, quando comparadas com folhas *in vitro* e com os mesmos tipos foliares submetidos à baixa densidade de fluxo de fótons.

Serret *et al.* (2001), em um estudo com plantas de gardênia (*Gardenia jasminoides*) submetidas ao cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de sacarose (0; 0,5 e 3%) e densidades de fluxo de fótons (50 e 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), verificaram que baixa concentração de sacarose diminuiu não só os teores de clorofila mas também a razão clorofila *a/b* e a razão clorofila/carotenóides, sugerindo baixa síntese e/ou maior degradação da clorofila *a* (Sesták, 1985 apud Serret *et al.*, 2001). Estes autores sugeriram que a baixa ou nenhuma concentração de sacarose pode induzir danos no aparato fotossintético, em lugar da alta densidade de fluxo de fótons. Também citam Serret e Trillas (2000), os quais demonstraram que a ultraestrutura dos cloroplastos de plantas de gardênia foi alterada quando as plantas foram submetidas à baixa concentração de sacarose e baixa densidade de fluxo de fótons.

Com relação ao teor de carotenóides, observou-se que densidades de fluxo de fótons de 14 e 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionaram as maiores concentrações destes pigmentos (0,08 e 0,07  $\text{mg g}^{-1}$  MF, respectivamente), enquanto que as densidades de 21 e 42  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionaram uma média de 0,06  $\text{mg g}^{-1}$  MF (Tabela 2). Sob 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obteve-se o menor (0,02  $\text{mg g}^{-1}$  MF) e o maior (0,15  $\text{mg g}^{-1}$  MF) teor de carotenóides, nas concentrações de 5 e 40  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose, respectivamente (Tabela 2).

Observou-se também, como em relação ao conteúdo de clorofilas, que houve um aumento no teor de carotenóides com o acréscimo da sacarose no meio de cultivo, sendo que sob as concentrações de 20 e 30  $\text{g L}^{-1}$  deste carboidrato, não

houve diferenças estatísticas entre as densidades de fluxo de fótons utilizadas (Tabela 2).

Segundo Engel & Poggiani (1991), a eficiência fotossintética está ligada ao teor de pigmentos cloroplastídicos das plantas, afetando o crescimento e influenciando a adaptabilidade das mesmas aos diversos ambientes. Em presença da luz, os pigmentos são constantemente sintetizados e destruídos pelo processo da fotooxidação, sendo que a velocidade de decomposição é diretamente proporcional à densidade de fluxo de fótons muito alta, causando dessa forma prejuízos para a fotossíntese. De acordo com Lee (1988), estudos realizados evidenciaram que o teor de clorofila varia muito entre as espécies, assim como entre genótipos de uma mesma espécie.

De maneira geral, verificou-se, neste estudo, que a densidade de fluxo de fótons de  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou a maximização de todas as características morfológicas estudadas. Estas foram influenciadas pela concentração de sacarose no meio de cultura, sendo que a concentração de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose promoveu os maiores valores de altura da parte aérea, número de folhas e de raízes, área foliar, e massas secas da parte aérea e do sistema radicular. Já quanto ao comprimento do sistema radicular não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de  $30$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose.

O acréscimo na concentração de sacarose também proporcionou um aumento significativo nos teores de pigmentos fotossintéticos, a partir de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose para os teores de clorofila e a partir de  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose para os teores de carotenóides. A densidade de fluxo de fótons de  $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou a maximização dos teores destes pigmentos, porém não diferiu estatisticamente das densidades de  $42$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , quando avaliado os teores de clorofila, e da densidade de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , quando avaliado os teores de carotenóides totais.

## CONCLUSÃO

Após a realização deste estudo, pode-se concluir que embora o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas de batata doce, cv. ILS9, sejam influenciados pela densidade de fluxo de fótons, a concentração de sacarose, adicionada aos meios de cultura, tem efeito mais determinante sobre os mesmos, promovendo um acúmulo de biomassa, teor de pigmentos fotossintéticos e reserva energética, com o seu incremento no meio de cultivo.

## **CAPÍTULO 2**

### **FOTOSSÍNTESE POTENCIAL E FLUORESCÊNCIA DAS CLOROFILAS EM PLANTAS DE BATATA-DOCE CULTIVADAS *IN* *VITRO* E ACLIMATIZADAS**

#### **INTRODUÇÃO**

Durante a cultura *in vitro*, as plantas são submetidas a condições especiais, tais como alta umidade relativa do ar, baixa irradiância, baixo teor de gás carbônico e a presença de açúcares e reguladores de crescimento no meio (Kadlecek *et al.*, 2003). Nestas condições, freqüentemente, observa-se baixa capacidade fotossintética das folhas das plantas (Pospíšilová *et al.*, 1997). De acordo com Amâncio *et al.* (1999), a luz influencia o desenvolvimento do mesófilo foliar, principalmente do parênquima paliçádico, podendo, também, gerar deficiências na estrutura dos cloroplastos (desenvolvimento dos grana) e na atividade da rubisco, em nível bioquímico, contribuindo para a baixa taxa fotossintética de plantas cultivadas *in vitro*.

A melhoria da capacidade fotossintética de plantas cultivadas *in vitro* pode ser realizada através do aumento da irradiância, necessitando o suprimento

adicional de gás carbônico em plantas cultivadas em condições autotróficas (Kozai, 1991; Kadlecek *et al.*, 2003), sendo, também, restringida pela susceptibilidade aos processos de fotoinibição em plantas cultivadas sob condições tanto autotróficas (Tichá *et al.*, 1998) como mixotróficas (Serret *et al.*, 2001). Dessa forma, plantas cultivadas *in vitro* são potencialmente capazes de desenvolver um aparato fotossintético funcional (Yue *et al.*, 1993) e apresentarem taxa fotossintética mensurável (Amâncio *et al.*, 1999; Van Huylenbroeck *et al.*, 2000). Entretanto, esta capacidade fotossintética potencial não previne os sintomas de fotoinibição, a que as plantas podem ser submetidas, durante a aclimatização, quando expostas a altas densidades de fluxo de fótons (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Carvalho & Amâncio, 2002).

A aclimatização consiste nas adaptações morfoanatômicas-fisiológicas necessárias à sobrevivência das plantas cultivadas *in vitro* quando levadas ao ambiente *ex vitro* (Skrebsky *et al.*, 2004). O aumento, a redução e/ou a eliminação de carboidratos no meio de cultivo pode ser determinante no sucesso da aclimatização (Leite *et al.*, 2000; Skrebsky *et al.*, 2004). De acordo com Carvalho e Amâncio (2002), o aumento da irradiância *ex vitro*, permite a aquisição de estruturas autotróficas e, conseqüentemente, maior taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização.

A cinética de emissão da fluorescência das clorofilas fornece um indicativo da performance fotossintética das plantas, pois reflete mudanças na organização e funcionamento das membranas dos tilacóides (Ouzonidou & Ilias, 2005). Recentemente, tem sido relacionada com a taxa de assimilação fotossintética de carbono e amplamente utilizada para estudos quanto à capacidade fotossintética de folhas (Barbagallo *et al.*, 2003), sendo um método rápido e não destrutivo capaz de detectar condições de estresse e injúrias nos tecidos vegetais (Saquet & Streift, 2002).

O objetivo do presente estudo foi monitorar características fotossintéticas em plantas de batata-doce, cv. ILS 19, cultivadas *in vitro* e, posteriormente, aclimatizadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e na casa de vegetação do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFPel.

### **Multiplicação do Material vegetal**

Para a realização do ensaio foram utilizadas plantas de batata-doce (*I. batatas*), cv. ILS19, oriundas da cultura de meristemas. A partir desta cultura, foram realizadas várias multiplicações, por meio de segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Sigma) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Reagen) até a obtenção da quantidade de plantas necessárias para a instalação do experimento.

### **Cultivo *in vitro* e aclimatização**

Segmentos nodais com cerca de 1 cm de comprimento foram utilizados como explantes e inoculados em meios MS, contendo duas concentrações de sacarose (20 e 40 g L<sup>-1</sup>). A estes meios foram acrescentados 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-

inositol e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ). Os meios foram distribuídos em erlenmeyers de 250 mL e os frascos vedados com algodão, sendo autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  e 1,5 atm, por 20 minutos.

As culturas permaneceram em sala de crescimento durante 45 dias, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante o período claro, e  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante o período escuro, e em duas densidades de fluxo de fótons ( $21$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), fornecidas por lâmpadas fluorescentes “luz do dia especial”.

Ao término do cultivo, folhas geradas *in vitro* foram utilizadas para determinações de parâmetros de fluorescência das clorofilas (dia zero) e taxa de liberação de oxigênio. Como a determinação da taxa de liberação de oxigênio é um método destrutivo, outras plantas obtidas dos mesmos tratamentos foram transplantadas para recipientes contendo cerca de dois litros de substrato comercial (PlantMax) e aclimatizadas em casa de vegetação sob temperatura e umidade controladas ( $23\text{-}28^\circ\text{C}$  e 80%, respectivamente). O monitoramento dos parâmetros de fluorescência das clorofilas em folhas geradas *in vitro* iniciou-se imediatamente após o transplante, seguindo-se semanalmente, por 29 dias, quando as folhas já se encontravam senescentes, momento que antecedeu a abscisão foliar.

Duas semanas após o término das avaliações citadas acima, folhas novas, geradas sob as condições de temperatura, umidade e luminosidade da casa de vegetação (denominadas *ex vitro*) foram utilizadas para uma nova determinação da taxa de liberação de oxigênio. Dois meses após a transferência das plantas para a casa de vegetação, folhas geradas *ex vitro* foram demarcadas e os mesmos parâmetros de fluorescência das clorofilas foram medidos, semanalmente, partindo-se de folhas incompletamente expandidas (dia 1) até o momento que antecedeu a abscisão foliar (dia 29).

## **Análise da Cinética de Fluorescência das Clorofilas**

Os parâmetros de fluorescência das clorofilas foram medidos, seguindo o modelo descrito por Roháček (2002), usando um fluorômetro modulado (FMS 2, Hansatech, King's Lynn, UK), na segunda ou terceira folha a partir do ápice de cada planta.  $F_0$  (Fluorescência inicial) foi medida em folhas previamente adaptadas ao escuro por 20 minutos usando luz  $< 0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e a fluorescência máxima ( $F_M$ ) após um pulso saturante de 0,8 s ( $> 3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); a fluorescência variável ( $F_V = F_M - F_0$ ) e a eficiência fotoquímica máxima do FS II ( $F_V/F_M$ ) foram calculadas para folhas no estado adaptado ao escuro (EAE).

Determinados os parâmetros em EAE, as folhas foram submetidas à luz actínica para as determinações dos parâmetros do estado adaptado à luz (EAL): fluorescência máxima na luz ( $F'_M$ ) e fluorescência inicial na luz ( $F'_0$ ), os quais permitiram o cálculo dos seguintes parâmetros: fluorescência variável no EAL ( $F'_V = F'_M - F'_0$ ), eficiência quântica fotoquímica efetiva em EAL ( $F'_V/F'_M$ ) e produção quântica efetiva do FS II ( $\Phi\text{PS}_2 = F'_M - F_S$ ) /  $F'_M$ ) (Genty *et al.*, 1989). Os valores dos parâmetros de fluorescência foram normalizados de acordo com  $F_0$  (Roháček & Bartak, 1999).

## **Taxa de evolução de oxigênio**

A taxa fotossintética potencial foi medida na segunda ou terceira folha a partir do ápice de cada planta e estimada como a taxa de evolução ou liberação de  $\text{O}_2$  através da utilização de um eletrodo de oxigênio de fase gasosa tipo eletrodo de Clark (LeafLab 2 Hansatech, UK), com aproximadamente 5% de  $\text{CO}_2$  no interior da câmara, fornecido por tampão carbonato e densidade de fluxo de fótons de  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



## Variáveis e delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial sacarose x fluxo de fótons x tempo, sendo duas concentrações de sacarose (20 e 40 g L<sup>-1</sup>), duas densidades de fluxo de fótons (21 e 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) enquanto que o fator tempo consistiu de dois, cinco ou seis níveis, dependendo da variável estudada. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco contendo 5 explantes durante a cultura *in vitro* e de uma planta após a transferência para a casa de vegetação.

A análise estatística foi realizada pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores – SANEST (Zonta & Machado, 1997) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1) Eficiência fotoquímica durante a aclimatização de folhas geradas na cultura *in vitro*

O estado adaptado ao escuro é uma situação em que a folha encontra-se fotoquimicamente inativa, ou seja, onde todos os processos de transporte de elétrons na membrana do tilacóide estão desativados, resultando em um gradiente transtilacoidal mínimo e baixíssimas concentrações de NADPH e ATP. Isso permite a obtenção de valores de eficiência máxima para os processos fotoquímicos da fotossíntese (Roháček & Bartak, 1999).

Segundo Baker (1991) e Krause & Weis (1991), a razão  $F_V/F_M$  expressa a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do Fotossistema II, podendo, de acordo com Haehnel *et al.* (1982) representar a eficiência quântica do transporte de elétrons através do Fotossistema II (FSII), sendo, também, um indicador válido para danos fotoinibitórios (Krause & Weis, 1991). Além dos fatores genéticos, fatores ambientais como temperatura, salinidade, radiação, seca, entre outros, afetam o crescimento das plantas e os seus efeitos têm sido pesquisados usando medições da eficiência máxima do fotossistema II estimada através da razão entre a fluorescência variável e a máxima (Havaux *et al.*, 1988).

Nas avaliações realizadas ao término da cultura *in vitro* (dia 0), observou-se o menor valor da relação  $F_V/F_M$  em folhas oriundas do tratamento com o fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (0,773). Para os demais tratamentos os valores determinados da relação  $F_V/F_M$  foram similares (Tabela 1). Embora não havendo diferenças estatísticas, a razão  $F_V/F_M$  aumentou após a primeira semana de aclimatização (dia 8) nas plantas de batata-doce dos tratamentos com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, enquanto que nos tratamentos com  $40 \text{ g L}^{-1}$  houve um pequeno decréscimo desta relação, independentemente da densidade de fluxo de fótons utilizada durante a cultura *in vitro*. Após este período, a razão  $F_V/F_M$  decresceu gradualmente ao longo do tempo (Tabela 1), sendo observado valores significativamente menores a partir do 15º dia nas folhas originadas do tratamento com  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, enquanto que no tratamento com  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose o decréscimo significativo da razão  $F_V/F_M$  ocorreu apenas no último dia (dia 29) quando as folhas já apresentavam sinais de senescência (Tabela 1). Destaca-se como fato mais marcante o maior decréscimo da relação  $F_V/F_M$  medidos nas folhas originadas dos tratamentos com a densidade de fluxo de fótons de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , podendo ser indicativo de que as folhas originadas em meios com  $20 \text{ g L}^{-1}$  sacarose, apresentem alguma característica fisiológica que as permitem adaptarem-se mais eficientemente à aclimatização.

**Tabela 1.** Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_V/F_M$ ) em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* (dia zero), e após transferência para casa de vegetação (dia 8-29)

| Fluxo de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a aclimatização) |                   |                   |                   |                  |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|   |                                   | 0                                 | 8                 | 15                | 22                | 29               |
| 21  | 20                                | 0,773Aa $\beta$                   | 0,830Aa $\infty$  | 0,779Aa $\infty$  | 0,782Aa $\infty$  | 0,687Ba $\infty$ |
|   | 40                                | 0,822Aa $\infty$                  | 0,786ABa $\infty$ | 0,771ABa $\infty$ | 0,746BCa $\infty$ | 0,681Ca $\infty$ |
| 60  | 20                                | 0,827Aa $\infty$                  | 0,855Aa $\infty$  | 0,807ABa $\infty$ | 0,750Ba $\infty$  | 0,668Ca $\infty$ |
|   | 40                                | 0,823Aa $\infty$                  | 0,799Ab $\infty$  | 0,666Bb $\beta$   | 0,650Bb $\beta$   | 0,603Bb $\beta$  |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de sacarose dentro de cada nível dos fatores luz e tempo. Letras maiúsculas na linha comparam medias de tempo dentro de cada nível dos fatores sacarose e luz. Letras gregas na coluna comparam médias de luz dentro de cada nível dos fatores sacarose e tempo. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Carvalho & Amâncio (2002) combinaram alta e baixa irradiância ( $150$  e  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) com alta e baixa concentração de gás carbônico ( $350$  e  $700$  ppm) durante o período de aclimatização de plantas de castanheira híbrida e observaram um decréscimo da eficiência fotoquímica máxima de folhas persistentes já no primeiro dia de aclimatização, quando submetidos a baixa concentração de  $\text{CO}_2$ , independentemente da intensidade luminosa, sendo recuperados quando submetidos a alta concentração de  $\text{CO}_2$ . Nas folhas novas a relação  $F_V/F_M$  manteve-se praticamente constante durante o período experimental. Segundo os autores, estes resultados podem indicar que plantas aclimatizadas sob alta concentração de  $\text{CO}_2$  estão aptas a fazer um bom uso da luz pelo aumento do rendimento de FSII.

A eficiência quântica fotoquímica efetiva em estado adaptado a luz ( $F_V'/F_M'$ ) é uma estimativa da eficiência fotoquímica do FSII em determinada intensidade luminosa e representa a eficiência operacional do FSII (Baker & Rosenqvist, 2004), estando associado à mudanças na produção de fluorescência associadas a co-ação simultânea de processos fotoquímicos e não-fotoquímicos, sendo, também, caracterizado pela contínua síntese de ATP, NADPH e concorrente fixação de gás carbônico (Roháček, 2002).

Para este parâmetro observou-se interação significativa entre os fatores sacarose e tempo e entre os fatores luz e tempo (Tabelas 2 e 3). Quanto à relação  $F_V'/F_M'$  nas folhas geradas durante a cultura *in vitro* e avaliadas imediatamente antes da aclimatização (dia 0), não foram observados efeitos da concentração de sacarose nem da densidade de fluxo de fótons a que as plantas foram submetidas durante o cultivo *in vitro*, apesar de ser ligeiramente superior para a condição de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e para a densidade de fluxo de fótons de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Eficiência quântica fotoquímica efetiva em estado adaptado a luz ( $F_V'/F_M'$ ) em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* (dia zero) sob duas concentrações de sacarose (20 e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ), e após transferência para casa de vegetação (dia 1-29)

| Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a aclimatização) |          |          |          |          |          |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                   | 0                                 | 1        | 8        | 15       | 22       | 29       |
| 20                                | 0,707 Aa                          | 0,683 Aa | 0,593 Aa | 0,425 Ba | 0,289 Ca | 0,207 Ca |
| 40                                | 0,762 Aa                          | 0,502 Bb | 0,458 Bb | 0,160 Cb | 0,169 Cb | 0,148 Ca |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de sacarose dentro de cada nível do fator tempo. Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível do fator sacarose. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, a relação  $F_V'/F_M'$  foi maior ao término do cultivo *in vitro* (dia zero). Nas plantas cultivadas sob  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, os valores obtidos para a razão  $F_V'/F_M'$  não foram estatisticamente diferentes até o 15º dia, diminuindo a partir deste tempo. Entretanto, nas plantas cultivadas em meio contendo  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, ocorreu um decréscimo significativo a partir da primeira avaliação (dia 1) imediatamente após a transferência das plantas para o solo (Tabela 2).

**Tabela 3.** Eficiência quântica fotoquímica efetiva em estado adaptado a luz ( $F_V'/F_M'$ ) em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* (dia zero), sob duas densidades de fluxo de fótons (21 e 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e após transferência para casa de vegetação (dia 1-29)

| Fluxo<br>de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a aclimatização) |          |          |          |           |          |
|--|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|  | 0                                 | 1        | 8        | 15       | 22        | 29       |
| 21   | 0,706 Aa                          | 0,689 Aa | 0,528 Ba | 0,285 Ca | 0,264 Ca  | 0,196 Ca |
| 60   | 0,762 Aa                          | 0,496 Bb | 0,523 Ba | 0,300 Ca | 0,194 CDa | 0,159 Da |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de luz dentro de cada nível do fator tempo. Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível do fator luz. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Analisando os valores de fluxo de fótons dentro de cada nível do fator tempo (Tabela 3), também observou-se que a razão  $F_V'/F_M'$  foi maior ao término do cultivo *in vitro* (dia zero). Verificou-se um decréscimo significativo da razão  $F_V'/F_M'$  já no primeiro dia de avaliação (dia 1) após a transferência das plantas para a casa de vegetação, oriundas do tratamento com a densidade de fluxo de fótons de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a partir do 8º dia para o tratamento com 21  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabela 3). Exceto no primeiro dia, não houve diferenças estatísticas entre os fluxos de fótons dentro de cada nível do fator tempo (Tabela 3).

A produção quântica efetiva do FS II ( $\Phi\text{PS2} = (F_M' - F_S)/F_M'$ ) representa a capacidade da planta de converter energia do fóton em energia química uma vez que o transporte de elétrons atinge o *state-steady* (Juneau *et al.*, 2005), permitindo assim, avaliar o rendimento e funcionamento do FSII (Genty *et al.*, 1989). Para este parâmetro, observou-se interação significativa entre os fatores sacarose e tempo e entre luz e tempo (Tabelas 4 e 5) para folhas geradas *in vitro* que persistiram após a transferência para a casa de vegetação. Os maiores valores de  $\Phi\text{PS2}$  foram observados ao término do cultivo *in vitro* (dia zero), não havendo diferenças significativas entre as concentrações de sacarose nesta avaliação

(Tabela 4). Após a transferência das plantas para a casa de vegetação,  $\Phi\text{PS2}$  foi diminuindo significativamente ao longo do tempo (Tabela 4). Para o tratamento com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, este decréscimo ocorreu a partir do 15º dia, sendo que no último dia,  $\Phi\text{PS2}$  foi de 0,174. Para o tratamento com  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, este decréscimo significativo ocorreu já no primeiro dia de avaliação (dia 1) após a transferência das plantas para a casa de vegetação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Produção quântica efetiva do FS II ( $\Phi\text{PS2}$ ) em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* (dia zero), sob duas concentrações de sacarose ( $20$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$ ), e após transferência para casa de vegetação (dia 1-29)

| Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a aclimatização) |          |          |          |          |          |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                   | 0                                 | 1        | 8        | 15       | 22       | 29       |
| 20                                | 0,670 Aa                          | 0,681 Aa | 0,580 Aa | 0,399 Ba | 0,211 Ca | 0,174 Ca |
| 40                                | 0,726 Aa                          | 0,519 Bb | 0,439 Bb | 0,094 Cb | 0,111 Cb | 0,113 Ca |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de sacarose dentro de cada nível do fator tempo. Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível do fator sacarose. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Analisando os valores de  $\Phi\text{PS2}$  nas densidades de fluxo de fótons em função do tempo (Tabela 5), observou-se que o fluxo de fótons de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  proporcionou o valor significativamente maior de  $\Phi\text{PS2}$  (0,738) ao término do cultivo *in vitro* (dia zero), entretanto nas avaliações que se prosseguiram (dia 1 a dia 29) a densidade de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  tendeu a proporcionar os maiores valores de  $\Phi\text{PS2}$ . Verificou-se, também, que o decréscimo desta variável se deu a partir do primeiro dia de aclimatização em plantas oriundas do tratamento com o fluxo de fótons de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , enquanto que naquelas submetidas à densidade de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  o decréscimo ocorreu a partir do 8º dia (Tabela 5).

**Tabela 5.** Produção quântica efetiva do FS II ( $\Phi_{PS2}$ ) em plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* (dia zero) sob diferentes densidades de fluxo de fótons (21 e 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e após transferência para casa de vegetação (dia 1-29)

| Fluxo<br>de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a aclimatização) |          |          |          |          |          |
|--|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|  | 0                                 | 1        | 8        | 15       | 22       | 29       |
| 21   | 0,658 Ab                          | 0,679 Aa | 0,507 Ba | 0,251 Ca | 0,203 Ca | 0,163 Ca |
| 60   | 0,738 Aa                          | 0,522 Bb | 0,513 Ba | 0,242 Ca | 0,119 Db | 0,124 Da |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de luz dentro de cada nível do fator tempo. Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível do fator luz. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 2) Eficiência fotoquímica de folhas geradas *ex vitro* sob as condições da casa de vegetação

Para a eficiência fotoquímica máxima para as folhas originadas durante aclimatização foi observado apenas o efeito do fator tempo (Tabela 6). Desta forma, as condições de densidade de fluxo de fótons e sacarose a que as plantas foram submetidas durante o cultivo *in vitro* não influenciaram a razão  $F_V/F_M$  das folhas geradas posteriormente na casa de vegetação. Os valores obtidos para estes tratamentos foram bastante similares em cada um dos dias em que as análises foram realizadas (Tabela 6). Observou-se que, no primeiro dia de avaliação as folhas eram muito jovens e, conforme indicado pelos valores obtidos da razão  $F_V/F_M$ , poderiam ainda não ter desenvolvido completamente o aparato fotossintético. Após uma semana (dia 8), verificou-se que a razão  $F_V/F_M$  aumentou significativamente, permanecendo alta e constante por mais duas semanas (dia 22). Após este período, observou-se um decréscimo significativo da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (dia 29), atingindo uma média de 0,842, momento que antecedeu a abscisão foliar.



**Tabela 6.** Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_V/F_M$ ) em folhas geradas *ex vitro* (dia 1-29) nas plantas de batata-doce oriundas do cultivo *in vitro*

| Fluxo de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a emergência de folhas <i>ex vitro</i> ) |         |         |         |         |
|---|-----------------------------------|---|---------|---------|---------|---------|
|   |                                   | 1   | 8       | 15      | 22      | 29      |
| 21  | 20                                | 0,831   | 0,875   | 0,883   | 0,882   | 0,829   |
|   | 40                                | 0,834   | 0,872   | 0,885   | 0,875   | 0,844   |
| 60  | 20                                | 0,837   | 0,875   | 0,883   | 0,878   | 0,852   |
|   | 40                                | 0,808   | 0,871   | 0,881   | 0,883   | 0,846   |
|   | <b>Média</b>                      | 0,827 C   | 0,873 A | 0,883 A | 0,879 A | 0,842 B |

Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível dos fatores sacarose e luz. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Segundo Krause & Weis (1991) este parâmetro da fluorescência das clorofilas é válido como indicador de processos de fotoinibição, sendo também utilizado como indicativo de estresse (Havaux *et al.*, 1988). □ê *et al.* (2001) relataram, em um estudo com plantas de tomate, que valores em torno de 0,830 são típicos de plantas não estressadas, enquanto que Van Huylenbroeck *et al.* (1998), em um estudo com plantas de *Calathea louisae*, encontraram valores de  $F_V/F_M$  de 0,660, e o atribuíram como indicador de estresse. Outros estudos evidenciaram que o valor de  $F_V/F_M$  é reduzido com a senescência foliar de plantas de batata-doce (Haimeirong & Kubota, 2003). No presente estudo observou-se uma redução da razão  $F_V/F_M$  para valores entre 0,603 e 0,687 no último dia de avaliação (dia 29) quando as folhas geradas *in vitro* já se encontravam senescentes (Tabela 1), estando, portanto, de acordo com os resultados obtidos pelos autores citados acima. Entretanto, nas folhas geradas *ex vitro*, os valores entre 0,829 e 0,852 no último dia das avaliações da razão  $F_V/F_M$  (Tabela 6), apesar de significativamente menores, indicam que as plantas de batata-doce estavam amplamente adaptadas às condições ambientais da casa de vegetação, mesmo a folha avaliada encontrando-se num processo de senescência foliar.

Houve interação tripla entre os fatores testados para a relação  $F_V'/F_M'$  em folhas novas geradas sob as condições da casa de vegetação (Tabela 7). De uma maneira geral, observou-se que a razão  $F_V'/F_M'$  de folhas formadas *ex vitro* foi baixa no primeiro dia das avaliações, atingindo um máximo entre o 8° e 15° dia

para os tratamentos com a densidade de fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e aos 15 dias para os tratamentos com o fluxo de fótons de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , independente da concentração de sacarose (Tabela 7). Tal fato pode indicar um adiantamento no desenvolvimento fotossintético das folhas das plantas que foram inicialmente submetidas à baixa densidade de fluxo de fótons, podendo ter um efeito residual da condição de cultivo *in vitro*. Contudo, o comportamento da eficiência fotoquímica efetiva para todos os tratamentos, esteve como previsto, ou seja, um incremento com o crescimento da folha, similar ao ocorrido com a eficiência fotoquímica máxima (Tabela 6).

**Tabela 7.** Eficiência quântica fotoquímica efetiva em estado adaptado a luz ( $F_v'/F_M'$ ) em folhas geradas *ex vitro* (dia 1-29) nas plantas de batata-doce oriundas do cultivo *in vitro*

| Fluxo de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a emergência de folhas <i>ex vitro</i> ) |                    |                   |                    |                    |
|---|-----------------------------------|---|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|   |                                   | 1   | 8                  | 15                | 22                 | 29                 |
| 21  | 20                                | 0,432 Ca $\infty$   | 0,741 Aba $\infty$ | 0,815 Aa $\infty$ | 0,643 Ba $\infty$  | 0,594 Ba $\beta$   |
|   | 40                                | 0,440 Ca $\infty$   | 0,723 Aba $\infty$ | 0,816 Aa $\infty$ | 0,614 Ba $\infty$  | 0,679 Aba $\infty$ |
| 60  | 20                                | 0,476 Ca $\infty$   | 0,641 Ba $\infty$  | 0,815 Aa $\infty$ | 0,584 Bca $\infty$ | 0,706 Aba $\infty$ |
|   | 40                                | 0,521 Ba $\infty$   | 0,606 Ba $\beta$   | 0,817 Aa $\infty$ | 0,611 Ba $\infty$  | 0,490 Bb $\beta$   |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de sacarose dentro de cada nível dos fatores luz e tempo. Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível dos fatores sacarose e luz. Letras gregas na coluna comparam médias de luz dentro de cada nível dos fatores sacarose e tempo. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Analisando a produção quântica efetiva do FS II em folhas geradas *ex vitro*, observou-se interação tripla entre os fatores testados (Tabela 8). As folhas apresentaram valores significativamente baixos de  $\Phi\text{PS2}$  no primeiro dia de avaliação, os quais, de um modo geral, aumentaram a partir do 8º dia e atingiram um máximo no 15º dia. Para as folhas das plantas submetidas aos tratamentos com o fluxo de fótons de  $21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  os valores máximos ocorreram no 15º dia, porém não diferiram estatisticamente do obtido no 8º dia (Tabela 8). No entanto, após este período,  $\Phi\text{PS2}$  voltou a decrescer, sendo o menor valor (0,382)

obtido no último dia de avaliação (dia 29) para o tratamento com  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose (Tabela 8).

**Tabela 8.** Produção quântica efetiva do FS II ( $\Phi\text{PS2}$ ) em folhas geradas *ex vitro* (dia 1-29) nas plantas de batata-doce oriundas do cultivo *in vitro*

| Fluxo de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Tempo (dias após a emergência de folhas <i>ex vitro</i> ) |                         |                   |                         |                    |
|---|-----------------------------------|---|-------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|
|   |                                   | 1   | 8                       | 15                | 22                      | 29                 |
| 21  | 20                                | 0,389 Ca $\infty$   | 0,711 Ab $\alpha\infty$ | 0,796 Aa $\infty$ | 0,558 Bca $\infty$      | 0,580 Bca $\infty$ |
|   | 40                                | 0,442 Ca $\infty$   | 0,720 Ab $\alpha\infty$ | 0,796 Aa $\infty$ | 0,551 Bca $\infty$      | 0,572 Bca $\infty$ |
| 60  | 20                                | 0,391 Ba $\infty$   | 0,680 Aa $\infty$       | 0,803 Aa $\infty$ | 0,461 Bb $\infty$       | 0,696 Aa $\infty$  |
|   | 40                                | 0,421 Ca $\infty$   | 0,545 Bca $\beta$       | 0,805 Aa $\infty$ | 0,658 Ab $\alpha\infty$ | 0,382 Cb $\beta$   |

Letras minúsculas na coluna comparam médias de sacarose dentro de cada nível dos fatores luz e tempo. Letras maiúsculas na linha comparam médias de tempo dentro de cada nível dos fatores sacarose e luz. Letras gregas na coluna comparam médias de luz dentro de cada nível dos fatores sacarose e tempo. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

### 3) Fotossíntese potencial ao término do cultivo *in vitro* e em folhas geradas *ex vitro*

Quando se comparou a taxa de liberação de oxigênio, que representa a taxa fotossintética potencial de folhas imediatamente após a retirada das plantas do cultivo *in vitro* com a taxa medida de uma folha originada após a aclimatização (*ex vitro*), observou-se que apenas o fator condição em que as folhas foram geradas foi significativo (Tabela 9). As folhas geradas durante a cultura de tecidos apresentaram uma taxa fotossintética potencial média significativamente superior ( $29,60 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) do que a exibida por folhas geradas *ex vitro* ( $22,21 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Cabe salientar que independente da condição em que foram geradas, as folhas utilizadas para esta análise se encontravam expandidas e verdes.

**Tabela 9.** Taxa de evolução de oxigênio ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) em folhas de plantas de batata-doce geradas *in vitro* e em folhas geradas *ex vitro*, após transferência para a casa de vegetação

| Fluxo de fótons<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | Sacarose<br>( $\text{g L}^{-1}$ ) | Taxa de evolução de oxigênio<br>( $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) |                 |
|--|-----------------------------------|---|-----------------|
|  |                                   | <i>In vitro</i>   | <i>Ex vitro</i> |
| 21   | 20                                | 27,08   | 21,65           |
|  | 40                                | 31,03   | 21,26           |
| 60   | 20                                | 30,46   | 22,18           |
|  | 40                                | 29,84   | 23,75           |
| <b>Média</b>   |                                   | 29,60 A   | 22,21 B         |

Letras maiúsculas na linha comparam médias de condição em que as folhas foram geradas. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme Harel *et al.* (2004), o rendimento quântico da evolução fotossintética de oxigênio ou a assimilação de  $\text{CO}_2$  estão fortemente correlacionados com a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_V/F_M$ ) e por isso este último parâmetro é amplamente utilizado como indicador de fotoinibição. Em nossos estudos, verificou-se que a razão  $F_V/F_M$  é bastante alta ao término do cultivo *in vitro*, porém não se diferencia muito dos valores obtidos em folhas geradas *ex vitro*.

Le *et al.* (2001) estudaram o efeito da sacarose exógena (0 e 3%) na taxa de evolução de oxigênio de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivadas *in vitro* e submetidas aos tratamentos com baixa ou alta densidade de fluxo de fótons (50 ou  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e baixa ou alta concentração de gás carbônico (400 ou 4000 ppm). Os autores verificaram que a sacarose exógena promoveu um aumento na taxa de evolução de oxigênio (de 11,22 para  $15,75 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), após 20 dias de cultivo *in vitro* com baixo fluxo de fótons e baixa concentração de gás carbônico, evidenciando os efeitos positivos da sacarose exógena. Segundo os autores, esta condição, típica da cultura *in vitro*, certamente limita a atividade fotossintética (limitação de fonte) e favorece a condição fotomixotrófica. Entretanto, quando as plantas foram cultivadas sob alta

densidade de fluxo de fótons e alta concentração de gás carbônico, o equilíbrio fonte-dreno foi direcionado para a limitação do dreno, e os efeitos no crescimento e na fotossíntese foram menores na presença da sacarose.

Diversos autores relatam que durante o cultivo *in vitro* condições tais como baixa densidade de fluxo de fótons, alta umidade, baixa disponibilidade de gás carbônico e alta concentração de açúcar no meio de cultura caracterizam condições heterotróficas e/ou mixotróficas, o que minimiza a capacidade fotossintética das plantas (Amâncio *et al.*, 1999; Seon *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2001). Isto ocorre porque o ambiente *in vitro* pode determinar características morfológicas, anatômicas e fisiológicas anormais, como precário desenvolvimento dos grana dos cloroplastos (Carvalho *et al.*, 2001) e dos estômatos (Seon *et al.*, 2000), retardo no desenvolvimento da cutícula e de ceras epicuticulares (Pospíšilová *et al.*, 1998). Estas anormalidades são reparadas após o transplante para condições *ex vitro*, sendo necessário, em muitos casos, semanas de aclimatização em ambiente sombrio e com decréscimo gradual da umidade do ar (Pospíšilová *et al.*, 1998). Dessa forma, a aclimatização de plantas em casa de vegetação ou em condições de campo torna-se um passo crítico para o desenvolvimento de estruturas autotróficas em muitas espécies (Carvalho & Amâncio, 2002), requerendo tempo e gastos que restringem a aplicação comercial do processo de micropropagação (Seon *et al.*, 2000).

Haimeirong & Kubota (2003) estudaram o efeito do estresse de seca e da idade foliar no processo fotossintético de quatro cultivares de batata-doce e verificaram que os valores de  $\Phi_{PS2}$  diminuíram para 47,5%, em relação ao controle, nas cultivares submetidas à seca, enquanto que para os valores de  $F_V/F_M$  houve uma grande variação entre as cultivares. A seca e a idade foliar não afetaram muito a razão  $F_V/F_M$  da cultivar KOG, que permaneceu em torno de 0,8, indicando que não ocorreu danos funcionais ao fotossistema destas folhas. Já para a cultivar BEM, este parâmetro decresceu rapidamente com a idade foliar, enquanto que para as cultivares OKI e TSU este parâmetro foi consideravelmente baixo (próximos a 0,72). Comparando-se os valores de  $F_V/F_M$  obtidos por estes autores com os observados neste estudo, observou-se que há uma similaridade

com os resultados encontrados para as folhas que persistiram após a transferência das plantas para a casa de vegetação, entretanto são menores quando comparados com os obtidos com as folhas geradas *in vitro* ou *ex vitro*, os quais se mantiveram acima de 0,81. Salienta-se, ainda, que a idade foliar a que os autores se referem são na verdade a posição em que as folhas se encontravam a partir do ápice caulinar.

Pandey *et al.* (2006) estudaram o efeito da aclimatização no processo fotossintético de plantas de *Anoectochilus formosanus* sob densidades de fluxo de fótons de 60, 180 e 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e verificaram que o maior fluxo de fótons induziu processos fotoinibitórios em virtude da diminuição significativa dos valores das razões  $F_V/F_M$  e  $F_V'/F_M'$  e  $\Phi\text{PS2}$ .

Os resultados desta pesquisa estão de acordo com Carvalho *et al.* (2001), os quais cultivaram explantes de videira (*Vitis vinifera* L.) e de castanheira híbrida (*Castanea sativa*  $\times$  *C. crenata*) *in vitro* com uma densidade de fluxo de fótons de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com posterior irradiância durante a fase de aclimatização de 150 e 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os autores verificaram que a capacidade fotossintética de folhas persistentes em ambas as espécies e submetidas a qualquer tratamento, não se diferenciou significativamente da capacidade fotossintética das formadas *in vitro*. Estes mesmos autores também observaram que a razão  $F_V/F_M$  das folhas que persistiram à aclimatização diminuiu com o tempo, especialmente 24 horas após a transferência das plantas para a casa de vegetação, sendo que este decréscimo ocorreu mais rapidamente nos tratamentos com alta irradiância (300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e que em folhas novas, a razão  $F_V/F_M$  permaneceu praticamente constante ao longo do período experimental.

Van Huylenbroeck *et al.* (1998) verificaram que o coeficiente de extinção fotoquímico (qP) de *Spathiphyllum floribundum* cultivadas em meio contendo 3% de sacarose foi maior ao término do cultivo *in vitro*, diminuindo quando as plantas foram aclimatizadas, enquanto que em plantas de *Calathea louisae* submetidas a 3% de sacarose e 2% de glicose no cultivo *in vitro*, houve um aumento do qP na aclimatização. Entretanto, em ambas espécies, folhas novas desenvolvidas após a aclimatização apresentaram um qP bem maior, enquanto

que diferenças significativas da relação  $F_v/F_M$  não foram observadas entre as condições foliares. Os mesmos autores relatam a resposta fotossintética positiva de *Spathiphyllum* em virtude dos altos valores de  $F_v/F_M$  e qP ao término do cultivo *in vitro*, enquanto que *Calathea* apresentou baixa (0,66) eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II e baixo *quenching* fotoquímico, indicando que houve uma regulação negativa da atividade da rubisco em virtude da fonte de carbono adicionada ao meio, sugerindo a inibição do processo fotossintético.

No presente estudo, observou-se, de modo geral, que os parâmetros de fluorescência das clorofilas atingiram valores máximos ao término do cultivo *in vitro* e diminuíram ao longo do tempo após a transferência das plantas para casa de vegetação. Acredita-se que esses decréscimos ocorreram não somente em virtude da senescência foliar, mas também pela transferência de um ambiente heterotrófico/mixotrófico para um autotrófico. Já nas folhas geradas *ex vitro*, os parâmetros de fluorescência foram baixos no primeiro dia de avaliação, possivelmente porque as folhas eram muito jovens e ainda não tinham desenvolvido completamente o aparato fotossintético funcional, atingindo valores máximos no 15º dia e diminuindo nas demais avaliações, quando já se encontravam em processos de senescência foliar.

## CONCLUSÃO

A concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e a densidade de fluxo de fótons de  $21 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  proporcionam condições fisiológicas que permitem alta capacidade fotossintética de folhas geradas *in vitro*, após a transferência das plantas para a casa de vegetação. Entretanto, as concentrações de sacarose nos meios de cultivo e as densidades de fluxo de fótons a que as plantas foram submetidas *in vitro* não interferem na performance fotossintética de folhas geradas *ex vitro*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v. 58, p. 31–37, 1999.

AMARAL, A.F.C. **Comportamento *in vitro* de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003, 118f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luís Queiroz, Piracicaba, Universidade de São Paulo.

AMBRÓSIO, S.T.; MELO, N.F. Interaction between sucrose and pH during *in vitro* culture of *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott (Pteridophyta). **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 4, p. 809-813, 2004.

BAKER, N.R. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 81, p. 563-570, 1991.

BAKER, N.R.; ROSENQVIST. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–162, 2004.

BARBAGALLO, R.; OXBOROUGH, K.; PALLETT, K.E.; BAKER, N.R. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, v. 132, p. 485-493, 2003.

BARRERA, P. **Batata-doce: uma das doze mais importantes culturas do mundo**. São Paulo: Ícone, 1986. 91p. (Coleção Brasil Agrícola).

BOUWKAMP, S.C. Sweet potato products: a natural resource for the tropics. In: BOUWKAMP, J.C. **Production requirements**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 9-57.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S. (Eds.): **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990.

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

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**, v. 67, p. 271–280, 2001.

CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. Effect of *ex vitro* conditions on growth and acquisition of autotrophic behaviour during the acclimatization of chestnut regenerated *in vitro*. **Scientia Horticulture**, v. 95, p. 151–164, 2002.

CASTRO, L.A.S.; GARCIA, A.; FORTES, G.R.L.; ZABALETA, J.P.; LESSA, A.O. **Produção de mudas e raízes de batata-doce livres de viroses**. EMBRAPA Clima Temperado, Circular técnica nº 12. Setembro, 1999.

CORRÊA, R.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; REIS, E.S.R.; SOUZA, A.V.S. Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação do fotoperíodo/ temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p.423-430, 2003.

COURNAC, L.; DIMON, B.; CARRIER, P.; LOHOU, A.; CHAGVARDIEFF, P. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO<sub>2</sub> enrichment. **Plant Physiology**, v. 97, p. 112–117, 1991.

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

EDMOND, J.B.; AMMERMAN, G.R. **Sweet potatoes: production processing marketing**. The Air Publishing Company, 1971.

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

**FAOSTAT** – Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/notes/citation.htm>>. Acesso em: 24 out. 2005.

FLORES, R.; LESSA, A.O.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.L. Efeito da sacarose e do benomyl na multiplicação *in vitro* da macieira, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 2363-2368, 1999.

FOLQUER, F. **La batata (camote): estudio de la planta y su produccion comercial**. San José, Costa Rica : Hemisfério Sul, 1978. 134p.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.M. High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 1, p. 7-15, 2005.

FURBANK, R.T.; PRITCHARD, J.; JENKINS, C.L.D. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C3 plant tobacco and the C4 plant *Flaveria bidentis*. **Australian Journal Plant Physiology**, v. 24, p. 291–299, 1997.

GARCIA, A.; PETERS, J.A.; PIEROBOM, C.R.; ROSSETO, E.A. Principais problemas da cultura da batata-doce no Rio Grande do Sul e algumas recomendações de pesquisa. **Horti Sul**, v. 1, n. 0, p. 30-33, 1989.

GEIGER, D.R.; SERVAITES, J.C. Carbon allocation and response to stress. In: MOONEY, H.A.; WINNER, W.E.; PELL, E.J.; CHU, E. **Response of plants to multiple stresses**. Academic Press, 1991, p. 103-127.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 990, p. 1243-1250, 1989.

GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2. Ed., Part 2: In Practice. Eversley: Exegetics, 1996. 1361 p.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasilia. ABCTP/EMBRAPA- CNPH, 1990. p. 99-169.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. **Rivista di frutticoltura**, v.1, p. 75-79, 1993.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets in vitro, and stress of transplanting. **Acta Horticulturae**, v. 230, p. 129-135, 1988.

HAEHNEL, W.; NAIRN, J. A.; REISBERG, P.; SAUER, K. Picosecond fluorescence kinetics and transfer in chloroplast and algae. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 680, p. 161-173, 1982.

HAIMEIRONG; KUBOTA, F. The effects of drought stress and leaf ageing on leaf photosynthesis and electron transport in photosystem 2 in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. **Photosynthetica**, v. 41, n. 2, p. 253-258, 2003.

HAREL, Y.; OHAD, I.; KAPLAN, A. Activation of photosynthesis and resistance to phoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3070-3079, 2004.

HAVAUX, M.; ERNEZ, M.; LANNOYE, R. Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. **Journal of Plant Physiology**, v. 133, p. 555-560, 1988.

HORTON, P.; RUBAN, A. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. Stress in Plants: Mechanisms and Interactions Special Issue. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 365-373, 2005.

ITO, H.; TANAKA, Y.; TSUJI, H. TANAKA, A. Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a in isolated cucumber etioplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 306, p. 148-151, 1993.

JUNEAU, P.; GREEN, B.R.; HARRISON, P.J. Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. **Photosynthetica**, v. 43, n. 1, p. 75-83, 2005.

KADLECEK, P.; RANK, B.; TICHÁ, I. Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro* grown plantlets. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1017-1024, 2003.

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

KOVTUN, Y.; DAIE, J. End-product control of carbon metabolism in culture-grown sugar beet plants. **Plant Physiology**, n. 108, p. 1647–1656, 1995.

KOZAI, T. Autotrophic (sugar-free) tissue culture for promoting the growth of plantlets *in vitro* and for reducing biological contamination. Intl. Symp. Applic. Biotechnol. p.39-51, 1988. In: KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; HAYASHI, M. **Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation**. v. 1, 1986-1989. 368p.

KOZAI, T. Autotrophic (sugar-free) micropropagation for a significant reduction of production costs. *Chronica Hort.* 29 (2), p. 19-20, 1989. In: KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; HAYASHI, M. **Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation**. v. 1, 1986-1989. 368p.

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

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

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

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

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

LE, V.Q.; SAMSON, G.; DESJARDINS, Y. Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO<sub>2</sub> concentration. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 599-605, 2001.

LEE, D.W. Simulating forest shade to study the development ecology of tropical plants: juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, v.4, p.281-292, 1988.

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

LESS, R.P.; EVANS, E.H.; NICHOLAS, J.R. Photosynthesis in *Clematis*, 'The President', during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 238, p. 605-610, 1991.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. (Ed.): **Methods in Enzymology**, v. 148, Academic Press, 1987. p. 350-382.

LINHARES, S.; GEWANDSNAJDER, F. **Biologia Hoje**, São Paulo: Editora Ática, 1998.

MADEIRA, N.R.; TEIXEIRA, J.B.; ARIMURA, C.T.; JUNQUEIRA, C.S. Influência da concentração de BAP e AG<sub>3</sub> no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.982-985, 2005.

MAGALHÃES, J.S. **Identificação de genótipos de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) factíveis à embriogênese somática e anatomia do desenvolvimento dos embriões**. 2005. 64f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Brasília.

MAGALHÃES, J.S.; SANTOS, M.D.M.; CUNHA, FILHO F.N.; BLUMER, L.; GUERRA, M.P.; TORRES, A.C. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 79-83, 2006.

MARTIN, K.P. *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO<sub>2</sub> enrichment. **Scientia Horticulturae**, v. 102, p. 277-282, 2004.

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

MIRANDA, J.E.C.; FRANCA, F.H.; CARRIJO, O.A.; SOUZA, A.F. PEREIRA, W.; LOPES, C.A.; SILVA, J.B.C. **A cultura da batata-doce**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 94p. (SPI. Coleção Plantar, 30).

MURASHIGE, T.; SKOOG F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n. 15, p. 473- 497, 1962.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

OUZONIDOU, G; ILIAS, I. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 223-228, 2005.

PANDEY, D.M.; WU, R.Z.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Effects of different irradiances on the photosynthetic process during *ex vitro* acclimation of *Anoectochilus* plantlets. **Photosynthetica**, v. 44, n. 3, p. 419-424, 2006.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PERES, L.E.P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 25, p. 44-48, 2002.

PETERS, J.A. Utilização de biotecnologia no melhoramento de fruteiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 8, n. 3, p. 19-22, 1986.

POSPÍŠILOVÁ, J.; CATSKÝ, J.; ŠESTÁK, Z. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. In: PESSARAKLI, M. (Ed). **Handbook of Photosynthesis**. Marcel Dekker, New York, p 525–540, 1997.

POSPÍŠILOVÁ, J.; WILHELMOVÁ, N.; SYNKOVÁ, H.; CATSKÝ, J.; KREBS, D.; TICHÁ, I.; HANÁCKOVÁ, B.; SNOPEK, J. Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 322, p. 863-869, 1998.

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

RITSCHER, P.S.; HUAMÁN, Z.; LOPES, C.A.; MENEZES, J.E.; TORRES, A.C. **Catálogo de germoplasma de batata-doce**: coleção mantida pela Embrapa Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. 47p.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v. 40, n. 1, p. 13-29, 2002.

ROHÁČEK, K.; BARTAK, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basics concepts, useful parameters, and some applications, **Photosynthetica**, v. 37, p. 339-363, 1999.

ROMANO, A.; NORONHA, C.; MARTINS-LOUCAO, M.A. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 159–167, 1995.

SAQUET, A.A.; STREIFT, J. Chlorophyll fluorescence as a predictive method for detection of browning disorders in ‘conference’ pears and ‘jonagold’ apples during controlled atmosphere storage. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, 571-576, 2002.

SEABROOK, J.E.A. Changing the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* by varying the illumination source. **Acta Horticulture**, v. 212, p. 401-410, 1987.

SEMORÁDOVÁ, S.; SYNKOVÁ, H.; POSPÍŠILOVÁ, J. Responses of tobacco plantlets to change of irradiance during transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions. **Photosynthetica**, v. 40, n. 4, p. 605-614, 2002.

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

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I.; MATAS, J.; ARAUS, J.L. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, p. 1–16, 1997.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I. Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. **Journal Plant Science**, v. 116, p. 281-289, 2000.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I.; MATAS, J.; ARAUS, J.L. The effect of photoautotrophy on photosynthesis and photoinhibition of gardenia plantlets during micropropagation. **Photosynthetica**, v. 39, n. 2, p. 245-255, 2001.



SESTAK, Z. **Photosynthesis during leaf development**. Academia, Praha; Dr W. Junk Publ., Dordrecht, Boston, Lancaster, 1985.

SILVA, J.B.C.; LOPES, C.A.; MAGALHÃES, J.S. Cultura da Batata-doce. In: CEREDA, M.C. (Ed.). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargil. 2002. 540p.

SILVA, S.O.C.; SOUZA, A.S.; PAZ, O.P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, n.1, p.47-52, 1991.

SIRSKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v. 56, n. 1, p. 71-71, 1981.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.

SMITH, W.H.; FRANK, J.R. Comparative biomass yields of energy crops. In: PALZ, W.; COOMBS, J.; HALL, D.O. (Ed.) **Energy from biomass**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1984. p. 323-329.

SOUZA, E.D. **Cultura de meristemas e micropropagação para eliminação de vírus de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cv. Americana**. 1990. 61f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento), Universidade Federal de Pelotas.

TICHÁ, I.; CAP, F.; PACOVSKA, D.; HOFMAN, P.; HAISEL, D.; CAPKOVA, V.; SCHÄFER, C. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. **Physiology Plant**, v. 102, p.155-162, 1998.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V.R.; WILLADINO, L.; GERRA, M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A. V. **Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas**. Embrapa – Circular Técnica 24. Brasília, 2001. 20p.

VAN HUYLENBROECK, J.M.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. **Plant Science**, v. 134, p. 21-30, 1998.

VAN HUYLENBROECK, J.M.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. **Plant Science**, v. 155, p. 59-66, 2000.

VIÑA, G.D.L.; MUÑOZ, A.B.; ALFARO, F.P. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea Americana* Mill microcutings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229-237, 2001.

WOOLFE, J.A. The contribution of sweetpotato and its products to human diet. In: HILL, W.A.; BONSE, C.K.; LORETAN, P.A. (Ed.) **Sweet potato technology for the 21 st century**. Tuskegee: Tuskegee University, 1992. p. 367-380.

YUE, D.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, p. 419–424, 1993.

ZANANDREA, I. **Desenvolvimento e caracterização fotossintética de plantas de macieira ‘M-9’ cultivadas *in vitro***. 2006. 50f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Pelotas.

ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of fruits plants. **Acta Horticulturae**, v.120, p. 217-222, 1981.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.



# 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](#)