

DEIVID ALMEIDA DA COSTA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB O
CULTIVO *IN VITRO* EM DIFERENTES MICROAMBIENTES**

Recife

2012

DEIVID ALMEIDA DA COSTA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB O
CULTIVO *IN VITRO* EM DIFERENTES MICROAMBIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo aluno **Deivid Almeida da Costa**, como requisito para obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientadora: DSc. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química

Recife
Pernambuco – Brasil
Fevereiro - 2012

DEIVID ALMEIDA DA COSTA

Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo in vitro em diferentes microambientes

Tese defendida e _____ pela banca examinadora:

Orientadora: _____

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Rangel Câmara – UFRPE

Examinadores:

Dra. Ana Lúcia Porto (UFRPE)

Dra. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva (UFRPE)

Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque (UERN)

Dra. Lilia Gomes Willadino (UFRPE)

Dra. Josabete Salgueiro Bezerra de Carvalho (UFRPE) - Suplente

Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos (UFAL) - Suplente

Recife 2012

A meu Deus, aos meus pais e minha esposa, pela, força, incentivo e apoio incondicional que me conduziu a cada vitória. E a minha filha, que a cada sorriso renova minha vontade de vencer.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada passo que dei e cada vitória que alcancei, pois sei que a força que precisei ele me deu e a fé que tive sempre me manteve durante toda a caminhada.

Aos meus pais, que sempre me deram suporte e me ensinaram a perseverar nas dificuldades, apoiaram minhas decisões e sempre me confortaram quando precisei. Obrigado pelo amor, carinho e paciência!

A minha esposa Monik, por acreditar em mim e pelo incentivo em cada caminhada. Obrigado pelo amor, companheirismo e pela paciência nas horas que me estressei. Também agradeço a minha filha Ana Clara, por cada gargalhada e sorriso, pois basta um minuto com você para esquecer as dificuldades e renovar as forças.... Te amo!

A minha Orientadora e amiga Terezinha Câmara, por toda disposição, paciência e respeito em todos os momentos. Obrigado por acreditar no meu desempenho. Agradeço por todos os anos de amizade e formação profissional, que certamente fez e faz diferença para mim.

Aos membros da banca, Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque, Dra. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva, Dra. Lilia Gomes Willadino, Dra. Ana Lúcia Porto, Dra. Josabete Salgueiro Bezerra de Carvalho, Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, pelas críticas e contribuições que enriqueceram o conteúdo desta obra.

Ao Programa de Pós Graduação em Botânica da UFRPE, e a todos os professores do programa, os quais contribuíram para minha formação profissional. A Prof^a. Dr^a. Carmem Sílvia zickel, por toda a atenção, disposição e apoio enquanto coordenadora do programa de pós-graduação.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), que me apoiou e disponibilizou recursos para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço aos

Diretores Dr. Fernando Jucá e Dr. André Galembeck e a colega de trabalho e a Coordenadora de Tecnologias Dr. Andréa Baltar, por acreditar em meu trabalho.

Aos amigos Emmanuel Cabral e Gileno Vitor, pela ajuda na preparação e análises dos experimentos. Valeu pela disposição em todos os momentos que precisei. Obrigado pela força e pela amizade!

Aos companheiros do CETENE, Robson e Lúcio. E em especial a Gessiane Borely. Obrigado pela ajuda nas análises biométricas! Se não fosse por vocês, estaria até agora pesando, medindo e congelando amostras.....Valeu!

Aos colegas do Laboratório de cultura de Tecidos Vegetais da UFRPE, e em especial ao amigo Francisco Wellington, muito obrigado pela enorme ajuda nas análises enzimáticas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa tese, muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO GERAL	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO GERAL	16
REVISÃO DA LITERATURA	19
ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NAS PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	19
Hiperidricidade	19
Estrutura foliar	20
CARACTERÍSTICAS DO MICROAMBIENTE <i>IN VITRO</i>	23
Umidade	23
Influência da sacarose e Co₂ no cultivo <i>in vitro</i>	24
ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO	27
ESTRESSE <i>IN VITRO</i>	30
Estresse Oxidativo	30
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO I	41
Resumo.....	42
Introdução	42
Materiais e métodos	44
Resultados e Discussão	45
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO II	53
Resumo.....	54
Introdução	54
Materiais e métodos	55
Resultados e Discussão	56
REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO III	66
Resumo.....	67
Introdução	67
Materiais e métodos	68
Resultados	69
Discussão	70
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Páginas

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica mostrando a cera epicuticular na superfície de folhas de *citrus* em casa de vegetação (a) e *in vitro* (b). (HAZARIKA, 2003).....22
- Figura 2. Aspectos do sistema fotossintético de plantas de couve-flor *in vitro*, aclimatizada (4 semanas) e plântulas com 2 semanas de germinação (GROUT e DONKIN, 1987).26
- Figura 3. Resumo dos principais efeitos do estresse hídrico nos parâmetros fotossintéticos de folhas de plantas C4. Fatores estomáticos e não estomáticos estão indicados pelas linhas pontilhadas e contínuas, respectivamente. O sinal (-) indica um efeito na direção oposta. (GHANNOUM, 2009).29
- Figura 4. Espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas constitutivamente nas células. A seção logo abaixo mostra as enzimas antioxidantes usadas para minimizar o efeito tóxico das ROS. Mais abaixo é mostrado os exemplo dos efeitos das ROS quando o balanço pro e pré-oxidante é perturbado no estresse oxidativo (Adaptado de CASSELLS e CURRY, 2001).31
- Figura 5. Esquema mostrando os mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS: (a) Ciclo da glutathiona-ascorbato. (b) Ciclo da glutathiona peroxidase (GPX). (c) Catalase (CAT). (d) Superoxido-dismutase (SOD). Adaptado de Carvalho, 2009.32

CAPÍTULO I

- Figura 1. Diferentes tipos de tampas utilizadas no experimento. T0 – tampa sem orifício; T1 – tampa com 1 orifício; T2- tampa com 3 orifícios; T3 – tampa com 7 orifícios.....49
- Figura 2. Aspecto de uma touceira no final da fase de multiplicação (à esquerda da seta), e a separação das plantas de uma touceira (à direita da seta).....49
- Figura 3. Aspecto das plantas nos frascos de cultivo *in vitro*, 16 dias após a inoculação no meio de multiplicação. T0 – tampa sem orifício; T1 – tampa com 1 orifício; T2- tampa com 3 orifícios; T3 – tampa com 7 orifícios..49

Figura 4. Valores médios das atividades específicas ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) da catalase após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.50

Figura 5. Valores médios das atividades específicas ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) Peroxidase após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.50

Figura 6. Valores médios das atividades específicas ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) da Peroxidase do Ascorbato após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.50

Figura 7. Valores médios das atividades específicas ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) da Polifenoloxidase após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.50

CAPÍTULO III

Figura 1. Comparação entre as touceiras no final da fase de multiplicação. T1 = tratamento com 30 g L^{-1} de sacarose, $0,11 \text{ ml d}^{-1}$ de troca gasosa e $55,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa. T10 = tratamento com 15 g L^{-1} de sacarose, $0,59 \text{ ml d}^{-1}$ de troca gasosa e $147,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa.....75

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL Páginas

Tabela 1. Produção, Remoção e interferência das ROS nas plantas (MITLER, 2002).
.....33

CAPÍTULO I

Tabela 1. Taxa de evaporação (em ml.d⁻¹) do meio de cultura calculado a partir dos diferentes tipos de tampas utilizadas.....48

Tabela 2. Numero médio de folhas expandidas, tamanho, matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e numero de perfilhos, das plantas matrizes após 16 dias de cultivo em meio de multiplicação. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5 %). T0, tampa sem orifício; T1 tampa com 1 orifício; T2 tampa com 3 orifícios; T3 tampa com 7 orifícios.....48

CAPÍTULO II

Tabela 1. Combinações de diferentes tipos de tampas e concentrações de sacarose utilizados no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar. F= orifícios na tampa. S= quantidade de sacarose no meio (g l⁻¹).....61

Tabela 2. Matérias fresca e seca da parte aérea e número de folhas em plantas no final da fase de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre furos na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....61

Tabela 3. Tamanho e número de perfilhos das plantas matrizes, no final da fase de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre furos na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....61

Tabela 4. Mortalidade e numero de perfilhos das plantas matrizes, no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre

concentração de sacarose e maiúsculas entre furos na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.62

Tabela 5. Valores biométricos médios das plantas matrizes (número de folhas, altura, matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), percentual de plantas enraizadas e matéria seca de raiz (MSR)) de cana-de-açúcar após 14 dias em meio de enraizamento, em frascos com 30 g L⁻¹ de sacarose com tampas sem orifício (T1-0) ou com um orifício (T1-1)..62

Tabela 6. Médias de altura, matéria fresca da parte aérea (MSPA) e percentual de enraizamento dos perfilhos, no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre furos na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.62

Tabela 7. Médias da atividade da Polifenoloxidase (PPO) e Catalase (CAT) das plantas matrizes, no final das fases de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre furos na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%62

Tabela 8. Médias da atividade da peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POD) nas fases de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre furos na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.....63

Tabela 9. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), numero de folhas, tamanho das plantas no final da fase de multiplicação. E a mortalidade das matrizes no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹ ; 2= 15g L⁻¹. No fator orifícios na tampa 1= sem orifício; 2= 1 orifício; 3= 3 orifícios.....63

Tabela 10. Comparação entre as médias dos fatores na atividades da Peroxidase do ascorbato (APX) e Peroxidase (POD) no final da fase de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹ ; 2= 15g L⁻¹. No fator orifícios na tampa 1= sem orifício; 2= 1 orifício; 3= 3 orifício63

Tabela 11. Comparação entre as médias dos fatores na atividades da Polifenoloxidase (PFO) e Catalase (CAT) no final da fase de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹ ; 2= 15g L⁻¹. No fator orifícios na tampa 1= sem orifício; 2= 1 orifício; 3= 3 orifício64

CAPÍTULO III

Tabela 1. Combinações entre diferentes regimes de troca gasosa, concentrações de sacarose e intensidade luminosa utilizados no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar.....73

Tabela 2. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, altura, numero de folhas e numero de perfilhos das plantas matrizes no final da fase de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹; 2= 15g L⁻¹. No troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹73

Tabela 3. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), numero de folhas, tamanho das plantas matrizes e número de perfilhos no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹; 2= 15g L⁻¹. No troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹74

Tabela 4. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca (MFR) e seca (MSR) das raízes das plantas na touceira, percentual de touceiras enraizadas, matéria seca (MSPA) da parte aérea dos perfilhos e altura dos perfilhos no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹; 2= 15g L⁻¹. No troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹74

Tabela 5. Comparação entre as médias dos fatores na atividades da Peroxidase do ascorbato (APX), Peroxidase (POD), Catalase (CAT) e Polifenoloxidase (PFO) no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹; 2= 15g L⁻¹. No troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹75

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* e a resposta antioxidativa da cana-de-açúcar, micropropagada em diferentes condições de troca gasosa, sacarose e luminosidade. As plantas foram cultivadas em meio de multiplicação e enraizamento, compostos por: Sais e vitaminas MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 g.L⁻¹ de inositol, 8 g.L⁻¹ de agar e 0,3mg/L⁻¹ de Kinetin, 0,2 mg/L⁻¹ de BAP (multiplicação) ou 1 mg.L⁻¹ de ANA (enraizamento). Para avaliar o efeito da troca gasosa, utilizou-se 4 diferentes tampas as quais permitiam diferentes regimes de troca gasosa (0,0787 ml.d⁻¹; 0,3446 ml.d⁻¹; 0,7330 ml.d⁻¹; 1,1970 ml.d⁻¹), em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de 47,6 μmol m⁻² s⁻¹. No experimento que avaliou o efeito da interação entre a troca gasosa e a concentração de sacarose no meio de cultura, foram utilizados 3 concentrações de sacarose (0, 30 e 15 g.L⁻¹) e três regimes de troca gasosa (0,0787 ml.d⁻¹; 0,3446 ml.d⁻¹ e 0,7330 ml.d⁻¹). Já no experimento que avaliou a interação entre troca gasosa, sacarose e intensidade luminosa, as plantas foram cultivadas à temperatura de 30 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 horas em 3 diferentes intensidades luminosas (55,2 μmol m⁻² s⁻¹; 100,8 μmol m⁻² s⁻¹; 147,9 μmol m⁻² s⁻¹), 2 concentrações de sacarose (30 e 15 g.L⁻¹) e dois regimes de troca gasosa (0, 11 e 0,59 ml.d⁻¹). Foram avaliados os parâmetros biométricos e a atividade das enzimas antioxidativas Peroxidase, Catalase, polifenoloxidase e peroxidase do ascorbato, no final da fase de multiplicação e enraizamento. Com relação ao efeito das trocas gasosa, as plantas apresentaram alta mortalidade em regimes de troca gasosa de 1,1970 ml.d⁻¹. Contudo, as condições de troca gasosa de 0,3446 ml.d⁻¹ a 0,7330 ml.d⁻¹ apresentou os maiores valores de matéria fresca e número de folhas bem como promoveu a redução na atividade das enzimas antioxidativas, quando comparadas com o tratamento controle (0,0787 ml.d⁻¹). Os experimentos que avaliaram a interação entre a troca gasosa e as concentrações de sacarose mostraram que a redução da sacarose de 30 g.L⁻¹ para 15 g.L⁻¹ promoveu uma redução da biomassa seca e a ausência de açúcar no meio de cultura provocou a morte de todas as plantas no final da fase de multiplicação. Houve um aumento na biomassa seca e número de folhas com o aumento das trocas gasosas. E na fase de enraizamento o aumento da troca gasosa estimulou a produção de raízes. Com relação a atividade enzimática, na fase de enraizamento, todas as enzimas mostraram diferenças significativas no fator troca gasosa e sacarose. O que se observou é que os tratamentos com 0,3446 ml.d⁻¹ de troca gasosa (com 15 e 30g.L⁻¹ de sacarose) em todas as enzimas analisadas, apresentou significativamente menores médias de atividade enzimática. Com relação ao efeito da interação entre troca gasosa, sacarose e intensidade luminosa os melhores resultados de crescimento e redução de atividade das enzimas foram observados nos tratamentos com 30g.L⁻¹ de sacarose, 100,8 μmol m⁻² s⁻¹ de luz e troca gasosa de 0,59 ml.d⁻¹. Os resultados sugerem uma redução no estresse oxidativo e melhor desenvolvimento das plantas em condições que promovem maior intensidade luminosa e troca gasosa, quando comparadas com o sistema de cultivo em frascos vedados e com baixa luminosidade.

Palavras-chave: estresse; sacarose, intensidade luminosa, troca gasosa.

GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* development and antioxidative response of cane sugar, micropropagated in different conditions of gas exchange, sucrose and light. Plants were grown in multiplication and rooting medium, composed of: MS salts and vitamins, supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 100 g L⁻¹ of inositol, 8 g L⁻¹ of agar and 0.3 of mg L⁻¹ kinetin, 0.2 mg.L⁻¹ BAP (multiplication) or 1 mg.L⁻¹ NAA (rooting). To evaluate the effect of gas exchange, we used 4 different caps, which allow different schemes of gas exchange (0.0787 ml d⁻¹; 0.3446 ml d⁻¹; 0.7330 ml d⁻¹; 1.1970 ml d⁻¹) in a growth room at 27 ± 2 °C with 16 hours photoperiod under a light intensity of 47.6 μmol m⁻² s⁻¹. In the experiment that evaluated the interaction effect between gas exchange and sucrose concentration in the culture medium, we used three concentrations of sucrose (0, 30 and 15 g L⁻¹) and three regimes of gas exchange (0.0787 ml d⁻¹, 0.3446 ml d⁻¹ and 0.7330 ml d⁻¹). In the experiment that evaluated the interaction between gas exchange, sucrose and light intensity, plants were grown at a temperature of 30 ± 1 °C with a photoperiod of 16 hours in three different light intensities (55.2 μmol m⁻² s⁻¹, 100.8 μmol m⁻² s⁻¹, 147.9 μmol m⁻² s⁻¹), two concentrations of sucrose (30 to 15 g L⁻¹) and two gas exchange systems (0.11 and 0.59 ml.d⁻¹). Biometric parameters and the antioxidant enzymes activity of peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase were evaluated in the late phase of multiplication and rooting. In the experiment that evaluated the four regimes of gas exchange, the plants showed high mortality in 1.1970 ml.d⁻¹ gas exchange. However, the conditions of 0.3446 ml d⁻¹ until 0.7330 ml d⁻¹ gas exchange, showed the highest values of fresh weight and leaves number, promoting a decrease in activity of antioxidant enzymes when compared with the control treatment (0.0787 ml.d⁻¹). In the experiments evaluating that evaluated the interaction between the gas exchange and sucrose showed that the reduction in sucrose of 30 to 15 g.L⁻¹ promoting a reduction in dry weight, and the absence of sugar in the culture medium led to the death all plants at the end of the multiplication phase. There was an increase in biomass and number of leaves with the increase in gas exchange. In the rooting phase the increasing of gas exchange stimulated the production of roots. The enzyme activity in the rooting phase, for all enzymes showed significant differences in gas exchange and sucrose factor. What was observed is that the treatments with 0.3446 ml d⁻¹ (with 15 and 30g L⁻¹ sucrose) in all the enzymes analyzed, showed significantly lower mean of enzymatic activity. The effect of the interaction between gas exchange, sucrose and light intensity showed better growth and reduction of enzyme activity with 30g L⁻¹ sucrose, 100.8 μmol m⁻² s⁻¹ light and evaporation rate of 0.59 ml d⁻¹ treatments. The results suggested a reduction in oxidative stress and improved development of the plants under conditions that increased light intensity and gas exchange as compared to the cultivation system with sealed caps and low light.

Keywords: stress, sucrose, light intensity, gas exchange

INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à família Poaceae, da classe Liliopsida e da ordem Ciperales. Possui flores pequenas protegidas por brácteas reunidas em inflorescências e fruto seco do tipo cariopse. As folhas são simples, alternas e estreito-lanceoladas. A planta é ereta, perene, rizomatosa e forma touceiras (ARANHA & YAHN 1987). Possui metabolismo fotossintético do tipo C4 e, portanto, tem alta eficiência fotossintética e ponto de saturação luminosa elevado. Assim sendo, responde positivamente ao aumento da intensidade luminosa, com incremento no desenvolvimento e acúmulo de açúcares (BARBIERI, 1981).

A cana-de-açúcar é originária, presumivelmente, do Norte da Índia. Chegou à América na segunda viagem de Colombo, e o seu plantio teve início em 1494. Chegou ao Brasil em 1522, e em 1533 a Pernambuco (BASTOS, 1987).

A agroindústria canavieira responde por aproximadamente 75% da produção mundial de açúcar (LAKSHMANAN et al., 2005). No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar tornou-se mais importante a partir da década de 1970 e atualmente o país destaca-se como maior produtor e também como maior exportador de açúcar e etanol no mundo (UNICA, 2009). Em 2010 o plantio da cana-de-açúcar ocupou uma área de 8.912.761 ha e gerou um rendimento médio de 71,229 kg.ha⁻¹ (IBGE 2011).

Além de servir como matéria prima para açúcar e álcool, a cultura canavieira pode ser utilizada como forragem animal, matéria prima para aguardente e para processos industriais de produção de ácido acético, butanol, papel, madeira compensada e enzimas industriais (ARENCIBIA, 1998; CIDADE, 2006). A importância da cultura canavieira pode ser atribuída também a sua múltipla utilização, como por exemplo, na forma de forragem animal, matéria prima na fabricação de aguardente, além dos já citados açúcar e álcool. É importante destacar a importância desta cultura na geração de mão-de-obra (NOVARETI, 1981), uma vez que o Brasil gera cerca de 1 milhão de empregos diretos e de 3 a 5 milhões de empregos indiretos (CARVALHO, 1999).

No Brasil, particularmente no Nordeste, destacam-se as variedades RB (República Brasileira) lançadas pelo Programa Nacional de Melhoramento de cana-de-açúcar, conduzido pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. Essas variedades RB caracterizam-se pela produtividade e adaptação às condições edafoclimáticas da Região (RIDESA, 2005).

A cana-de-açúcar geralmente é propagada vegetativamente usando pedaços de 20-30cm do colmo como propágulo. Todos os anos são necessários muitos propágulos para renovação do campo, principalmente quando uma nova variedade é lançada no mercado. Essa propagação vegetativa deve ser feita com cautela para que não sejam disseminadas doenças, como o raquitismo da soqueira, que pode causar prejuízos de 30% no canavial (MATSUOKA, 1984).

A disponibilização em larga escala de novas variedades com certificação genética e fitossanitária da cana-semente é viabilizada pela adoção dos sistemas de micropropagação (LAKSHMANAN et al., 2005).

Essa técnica consiste da propagação vegetativa *in vitro* por meio de pequenos (ou micro) propágulos os quais geralmente são cultivados em frascos ou em biorreatores, onde os meios nutritivos e as condições ambientais do cultivo favorecem a formação e o desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas *in vitro*. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como a multiplicação de grandes quantidades de plantas em espaço físico e tempo reduzidos, e a possibilidade de realizar limpeza clonal, gerando indivíduos livres de patógenos.

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende de diversos fatores, como o genótipo, tipo de explante, estágio de desenvolvimento e idade, estado fisiológico da planta matriz e condições ambientais externas que incluem composição do meio de cultura, luz e temperatura, entre outros (GAJ, 2004).

Durante a micropropagação, as plantas são submetidas a sucessivos subcultivos em condições ambientais e culturais incomuns, quando comparados ao cultivo em campo (GASPAR et al., 2002). O estresse gerado pelo ambiente de cultivo *in vitro* pode influenciar os padrões fisiológicos de maneira positiva (incrementando a atividade fisiológica da planta e favorecendo o crescimento e o desenvolvimento vegetal) ou negativa (promovendo danos celulares e prejudicando o desenvolvimento vegetal).

O cultivo *in vitro* de plantas pode ser realizado de maneira tradicional, conhecida como fotomixotrófica, onde são adicionados os componentes inorgânicos (sais) e orgânicos (vitaminas, hormônios e açúcares). Ou pode ser cultivada sem os componentes orgânicos, e de modo a favorecer a fixação de carbono a partir da fotossíntese (fotoautotrófica).

O cultivo fotomixotrófico induzido, aliado às condições microambientais na micropropagação, gera uma série de estresses que refletem no padrão anatômico, e

morfofisiológico das plantas micropropagadas, de modo a dificultar ou até mesmo impedir a regeneração e aclimatização das plantas. Já o cultivo de forma fotoautotrófica apresenta uma série de vantagens, contribuindo na redução do estresse, causado pela baixa concentração de CO₂ e alta umidade encontrada nos frascos de cultivo *in vitro*.

O estresse vegetal pode ser definido como a quebra da homeostase fisiológica do vegetal, o qual pode se adaptar ou sofrer danos irreversíveis que pode levá-lo a morte. O estresse *in vitro* reflete-se inevitavelmente na forma de estresse oxidativo, gerando o aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS - íon superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila e peroxila), as quais podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucleicos (CASSELLS e CURY, 2001).

Considerando que a criação de um ambiente favorável à fotossíntese por meio do cultivo fotoautotrófico poderá contribuir para o aumento do vigor e o desenvolvimento das plantas pela redução do estresse *in vitro*, surge a hipótese de que as análises dos marcadores de estresse e da atividade fotossintética permitem caracterizar as condições fisiológicas das plantas micropropagadas.

É de grande importância entender como o estresse causado pela alta umidade e condições de hiperhidricidade afetam a capacidade fotossintética das plantas, e como ocorrem as respostas bioquímicas durante esse estresse. Esse entendimento contribuirá para elucidar os mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse *in vitro* e o efeito residual que causa nas plantas submetidas a essa condição durante o processo de aclimatização.

Com a finalidade de avaliar e entender a influência do microambiente *in vitro* na resposta fisiológica da cana-de-açúcar, apresentamos este estudo de tese composto por manuscritos que transcorrem sobre o efeito e interação entre a troca gasosa, concentração de sacarose no meio de cultura e intensidade luminosa durante o cultivo *in vitro*, bem como a resposta antioxidativa das plantas nos diferentes microambientes.

REVISÃO DE LITERATURA

Durante o cultivo *in vitro* as plantas crescem sob condições especiais, dentro de recipientes, onde geralmente existem alta umidade do ar, baixa luminosidade, diversos reguladores de crescimento e açúcares (SILVA, et al., 2005). Essas características do microambiente *in vitro* são bem diferentes daquelas encontradas no ambiente *ex vitro*, e favorecem um desenvolvimento morfofisiológico com algumas alterações. Entre os principais fatores que interferem no desenvolvimento das plantas *in vitro* ou na fase de transição *in vitro/ex vitro*, podemos citar as alterações morfofisiológicas provocadas pelo microambiente e o estresse *in vitro*.

ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NAS PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO*

Hiperidricidade

As taxas de crescimento e de desenvolvimento e muitas das características fisiológicas e morfológicas das plantas formadas *in vitro* são influenciadas pelo ambiente físico químico dos recipientes (KOZAI et al., 1997). Microbrotos, originários de organogênese, podem apresentar alterações morfológicas e fisiológicas *in vitro* as quais são geralmente conhecidas como síndrome da hiperidricidade (ZIV, 1991; DEBERGH et al., 1992). A Hiperidricidade ocorre em resposta a condições de estresse quando o explante encontra-se em um ambiente *in vitro* impróprio (devido a alta umidade), e esse nome é dado devido à aparência vitrificada da planta (PARK, et al 2004). As plantas hiperídricas apresentam baixa resistência da parede celular (KEVERS e GASPAR, 1985), baixos níveis de lignina e celulose (KEVERS et al., 1984; 1987), folhas intumescidas (ZIV et al., 1987), diminuição no conteúdo de proteína e clorofila (PHAN e LETOUZE, 1983) e aumento no conteúdo de água nos tecidos (BOTTCHEER et al., 1988).

Na hiperidricidade pode-se observar ainda outros problemas como; necrose do ápice caulinar ou foliar, hipertrofia tecidual, calejamento dos tecidos, mal funcionamento estomático, pouca deposição de cera cuticular e baixa taxa

fotossintética. Essa síndrome está associada com o desbalanço hormonal, composição mineral do meio, tipo e concentração do agente gelificante, troca gasosa do recipiente e intensidade luminosa (ZIV, 1991). Segundo Cassels e Curry (2001), a hiperidricidade também é associada a alta umidade dentro dos recipientes de cultivo e deficiência da corrente transpiratória dos microbrotos *in vitro*. Quando a vitroplanta se encontra hiperídrica, ela pode se tornar “cancerosa” (formando calos), resultando em necrose do meristema apical (GASPAR et al., 1998).

Ainda de acordo com Cassells & Curry (2001), os estresses abióticos *in vitro*, encontrado durante o cultivo, uma vez caracterizados, podem ser potencialmente controlados pela manipulação dos parâmetros de cultivo, como o designer do recipiente de cultivo e componentes do meio de cultura, inclusive evitando o desbalanço provocado pelos reguladores de crescimento no meio. Esse desbalanço tem sido correlacionado a síndrome da hiperidricidade (ZIV, 1991).

Estrutura foliar

O cultivo *in vitro* é caracterizado por alta umidade e baixa luminosidade, o que pode induzir várias modificações anatômicas nas plantas (RADOCHOVÁ e TICHÁ, 2009), as quais têm um impacto direto na difusão de CO₂ nas folhas, e conseqüentemente na fotossíntese. Tem-se observado que as folhas de vitroplantas possuem menos estômatos e que estes são circulares em vez de elípticos (DESJARDINS, et al, 1995). Isso pode explicar seu mau funcionamento e sua dificuldade em fechar quando necessário (por exemplo, na aclimatização). Também se observou folhas mais finas, com pouca cutícula e um mesofilo com células muito pequenas e com grandes espaços intercelulares, o que certamente interfere na disponibilidade de CO₂ nas células do mesofilo e na capacidade fotossintética (DESJARDINS, et al, 1995).

Mudanças na anatomia foliar ocorrem durante a aclimatização e são percebidas na maioria das folhas que se desenvolvem no cultivo *ex vitro*. Durante a aclimatização as folhas primordiais (vindas do cultivo *in vitro*) apresentam características intermediárias entre as folhas crescidas *in vitro* e as crescidas na casa de vegetação. Apenas as novas folhas que se formaram *ex vitro* se assemelham as de plantas cultivadas em condições de campo.

Em cortes histológicos transversais de folhas de cana-de-açúcar micropropagadas em sistema fotomixotrófico, Rodríguez et al. (2003), relatam que *in vitro*, as folhas apresentaram pouco desenvolvimento da anatomia Krantz, com pequenas células parenquimáticas e feixe vascular. E após um período de cerca de 20 dias de aclimatização, as folhas apresentam uma conformação anatômica típica dessa gramínea.

Em sua revisão sobre desordens morfo-fisiológicas *in vitro*, Hazarika (2003) relata diversos trabalhos onde se discute a funcionalidade dos estômatos de plantas micropropagadas *in vitro*. Ele conclui que não se pode generalizar que os estômatos de todas as plantas micropropagadas *in vitro* são incapazes de fechar corretamente, podendo variar o percentual de estômatos fechados e abertos, sendo isso uma condição do genótipo.

O tamanho da abertura estomática é controlado pelo volume relativo de suas células que depende do turgor. O turgor das células guarda, depende do potencial osmótico. A falha no fechamento estomático pode ser devido a anormalidades na parede celular ou na função do protoplasto (HAZARIKA, 2003).

A cutícula cobre as paredes externas das células epidérmicas e consiste em várias camadas. A primeira camada é composta de ceras depositadas sobre a superfície como uma cera epicuticular e abaixo está a cutícula propriamente dita, que consiste na cera cuticular e cutina. (RAVEN *et al*, 1996).

A função primária da cutícula é limitar a perda da água na transpiração. A permeabilidade da água através da cutícula é influenciada primariamente pela estrutura e quantidade das ceras cuticular e epicuticular (SATHYANARAYANA e VARGHESE, 2007).

A pouca deposição da cera epicuticular na superfície das folhas das plantas cultivadas *in vitro* (figura 1), tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pela perda excessiva de água durante o transplântio (HAZARIKA, 2003).

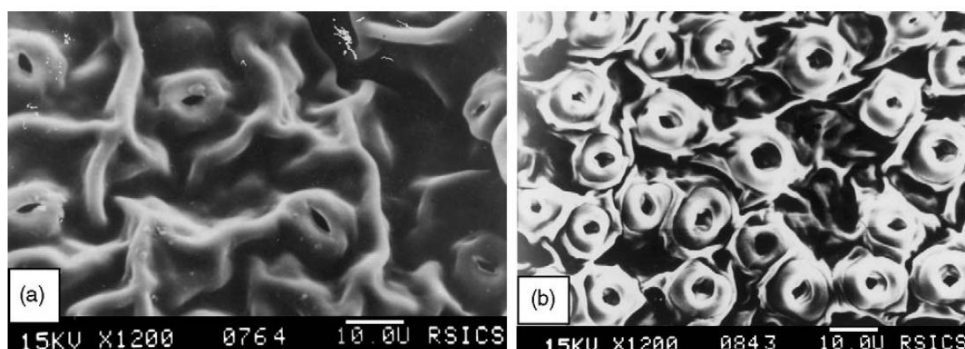


Figura 1. Imagens de microscopia eletrônica mostrando a cera epicuticular na superfície de folhas de *citrus* em casa de vegetação (a) e *in vitro* (b). (HAZARIKA, 2003)

A natureza química da cera depositada na superfície das folhas de plantas *in vitro*, também é diferente da formada em condições naturais, permitindo difusão excessiva de água pelas folhas formadas *in vitro*. A cera dessas vitroplantas possuem altas proporções de ésteres e compostos polares com cadeias de hidrocarbonetos menores do que as folhas de plantas *ex vitro*. Uma vez que os compostos polares permitem uma maior permeabilidade a água, é provável que a composição química da cera contribua para a perda de água (HAZARIKA, 2003).

A luz é um outro fator que tem grande impacto na acumulação de pigmentos, formação da clorofila, diferenciação dos cloroplastos e anatomia foliar. De uma forma geral, as plantas *in vitro* são cultivadas em baixa luminosidade quando comparadas a luz natural (*ex vitro*). O conteúdo e a estrutura dos cloroplastos podem variar em função da intensidade luminosa, como observado em liquidambar (uma planta arbórea) *in vitro* cultivadas sob baixa intensidade luminosa. Nessas condições as membranas internas dos cloroplastos não apresentavam diferenciação em grana e estavam arranjadas de forma irregular. Quando eram submetidas a condições de alta luminosidade *in vitro*, estas plantas apresentavam baixa atividade fotossintética (DESJARDINS, et al, 1995).

Grout (1998) relata que existe dois tipos de plantas com relação a resposta fotossintética *in vitro*. Em um dos tipos, as folhas formadas *in vitro* nunca desenvolvem plenamente a capacidade fotossintética, e ao serem transferidas para casa de vegetação essas folhas servem como fonte de carbono para novas folhas e degeneram. Já o outro tipo de planta, seria aquela que possui folhas persistentes que se adaptam a condição *ex vitro* e vai aumentando a sua atividade fotossintética a medida que se adapta as condições ambientais naturais.

CARACTERÍSTICAS DO MICROAMBIENTE *IN VITRO*

As plantas *in vitro* têm a capacidade de crescer fotoautotroficamente (sem uma fonte açúcar no meio), porém as baixas concentrações de CO₂ nos frascos de cultivo e a presença de açúcar no meio nutritivo utilizado nos sistemas de micropropagação força a planta a crescer fotomixotroficamente (utilizando o açúcar do meio).

O cultivo de explantes em regime fotomixotrófico origina plantas com o conteúdo de água elevado, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (KUBOTA & KOZAI, 1992), provocando perdas de mudas e de mão de obra. Além do mais, a disponibilidade de sacarose no meio de cultura contribui para o crescimento de microrganismos, que acabam prejudicando ou impossibilitando o desenvolvimento *in vitro*.

O microambiente existente nos frascos de cultivo tem sido, de uma forma geral, padronizado, de maneira que as variações ambientais neste microambiente sejam evitadas. O uso generalizado de frascos de cultura fechados criam uma inter-relação particular entre substrato/planta/atmosfera condicionado pela alta umidade relativa do ar, baixa intensidade luminosa, grandes concentrações de reguladores de crescimento, excesso de nutrientes e mínimas variações de temperatura. Esses fatores são responsáveis pela inabilidade de algumas plantas de sobreviverem ao transplante para condições *ex vitro* (DANTAS et al., 2001).

Umidade

A temperatura do ar e a umidade relativa dos recipiente de cultivos são fatores importantes no desenvolvimento vegetal (CHEN, 2004). Os frascos de cultivo exercem significativa influência em duas facetas do microambiente *in vitro*, que são a umidade e composição gasosa do espaço interno. Ao contrário da ventilação na sala de crescimento, a qual geralmente é estável, o movimento do ar dentro dos frascos de cultura pode variar de quase estagnado a uma circulação-independente. Esse movimento do ar nos frascos varia principalmente dependendo do tipo de tampa utilizada no cultivo (possuindo maior ou menor porosidade) (CHEN, 2004). De

acordo com Fujiwara *et al* (1995), as trocas gasosas entre o ambiente interno dos frascos de cultivo e a sala de crescimento (expresso em termos de infiltração do ar por hora dividido pelo volume do frasco) é uma constante para um determinado frasco/tampa em uma sala de crescimento com ventilação estável. Por isso, o ar presente nas salas de crescimento pode exercer alguma influência direta na troca gasosa entre o ar do espaço interno dos frascos de cultivo e a sala de crescimento (SMITH *et al*, 1995).

Vários métodos tem sido usados para reduzir a umidade *in vitro*, como o uso de dessecantes, revestindo o meio com materiais oleosos, ajustando a tampa dos frascos, usando tampas especiais que facilitem a transpiração ou resfriando o fundo dos frascos de cultivo (HAZARIKA, 2003).

De acordo com Cassells & Curry, (2001), o resfriamento e a ventilação dos recipientes de cultivo, tem mostrado uma redução nos sinais de hiperidricidade. Isto tem sido atribuído a indução da corrente transpiratória nos recipientes modificados, o que também é correlacionado com o aumento da absorção de cálcio. O cálcio é um contra-íon para o movimento basipetal (HANSENSTEIN e EVANS, 1988) da auxina, e acumulação localizada da auxina em microbrotos não-transpirantes pode estar envolvida na extensão celular associada com a vitrificação. As repostas celulares ao estresse são mediadas pelas vias de sinalização que envolve reguladores de crescimento, Ca^{2+} , sacarose, etc. e estas vias podem ter pontos que se cruzam (crossover points). Entretanto não é surpresa, que o desbalanço dos reguladores de crescimento, açúcar e minerais no meio, interagindo com compostos nos tecidos podem levar a quebra do processo regulatório. De modo semelhante, as condições “não-naturais” *in vitro* como a alta umidade nos frascos de cultivo podem afetar processos fisiológicos como a transpiração, com conseqüências na tomada de cálcio e movimento da auxina (JOYCE *et al*, 2003).

Influencia da sacarose e CO₂ no cultivo *in vitro*

Os sistemas de micropropagação geralmente utilizam fontes de carbono no meio de cultura (como por exemplo, a sacarose). O açúcar no meio de cultura é um componente importante, considerando que a fotossíntese em plantas *in vitro*

geralmente é insuficiente, devido a baixa concentração de CO₂ e troca gasosa nos frascos (PIERIK, 1997; MILLS, 2009). O uso de açúcar no meio de cultura fornece energia para o metabolismo das plantas *in vitro*, e o armazenamento deste açúcar em folhas persistentes, em muitos casos, tem demonstrado um maior ganho de biomassa durante a aclimatização. Também tem se observado em varias espécies que a sacarose no meio de cultura é fundamental para o enraizamento *in vitro* (HAZARIKA, 2003).

Porem, sabe-se que as altas concentrações de sacarose no meio de cultura, a baixa luminosidade e baixa concentração de dióxido de carbono no ar dos frascos de cultivo são fatores limitantes importantes que influenciam na fotossíntese *in vitro* (LEES et al., 1991; FUJIWARA et al, 1995).

Um sistema autotrófico permite a transição da condição *in vitro* para *ex vitro* com mais rapidez e eficiência que no sistema fotomixotrófico (AFREEN et al., 2000; KOZAI et al., 2005). Trabalhando com Erva-de-São-João (*Hypericum perforatum* L.), Couceiro et al. (2006) relataram que as plantas regeneradas *in vitro* em sistema de cultivo fotomixotrófico apresentaram anormalidades anatômicas, desordens fisiológicas e baixa densidade estomática com estômatos não funcionais. Entretanto, as plantas regeneradas *in vitro* de forma fotoautotrófica mostraram funcionamento estomático normal e maior densidade estomática, e cresceram melhor na fase *ex vitro*. Outros trabalhos, com fumo (MOUSSEAU, 1986), batata (KOZAI et al., 1988) e *Eucalyptus* (KIRDMANEE et al., 1995) mostraram que o crescimento das plantas em sistemas enriquecidos com CO₂ foi mais eficiente que em sistemas fotomixotróficos. Kozai et al. (2005) apontaram várias vantagens do uso de um sistema de cultivo *in vitro* fotoautotrófico, através do qual é possível obter plantas com alta qualidade por meio da otimização dos fatores ambientais.

Plantas *in vitro* geralmente possuem quantidade reduzida de clorofila e baixa atividade ou inatividade das enzimas responsáveis pela fotossíntese, como a ribulose 1,5 bifosfato carboxilase (Rubisco). Essa baixa atividade pode estar relacionada com a presença de açúcar durante o desenvolvimento foliar (Hazarika, 2003).

Em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas em sistema fotomixotrófico, se observou um baixo rendimento quântico (ϕ) da fotossíntese, provavelmente devido a baixa eficiência da Rubisco (RODRÍGUEZ et al, 2003).

De acordo com Grout e Donkin (1987), o aparato fotossintético da couve-flor micropropagada *in vitro* não é suficiente para produzir um saldo positivo de carbono *in vitro*. Nessas plantas, os cloroplastos possuem baixos níveis de clorofila e reduzida atividade da Rubisco, resultando em uma baixa assimilação de carbono baixa (figura 3).

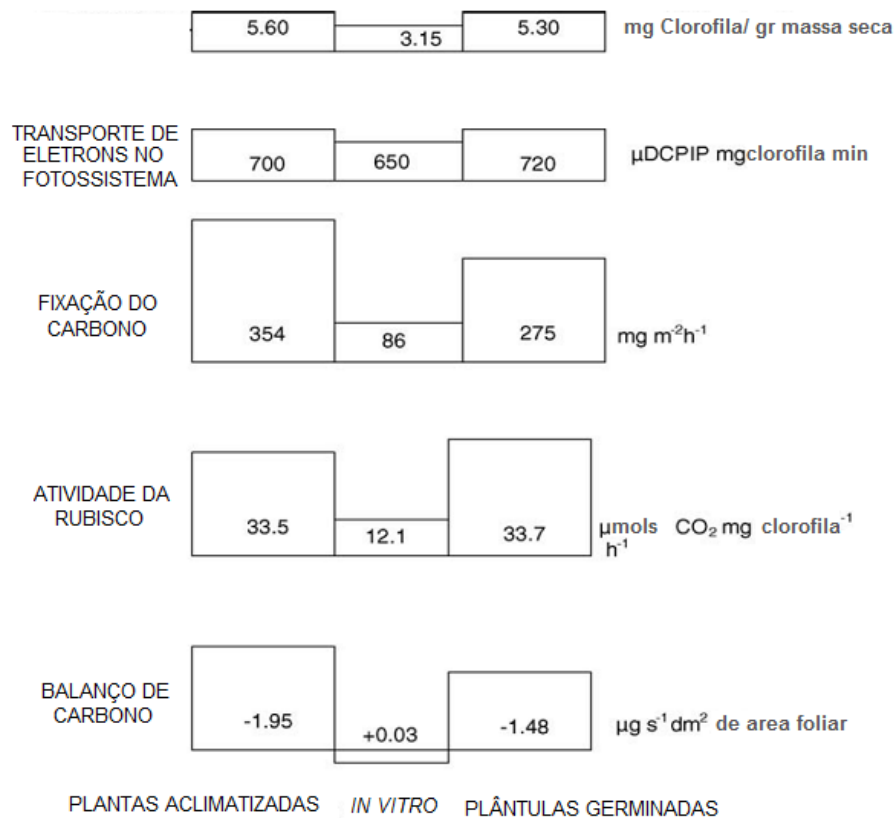


Figura 3. Aspectos do sistema fotossintético de plantas de couve-flor *in vitro*. a) plantas aclimatizadas (4 semanas); b) plantas *in vitro*; c) plântulas com 2 semanas de germinação (Adaptado de GROUT e DONKIN, 1987).

Seon et al. (2000) relatam que em *Rehmannia glutinosa* houve um aumento da capacidade fotossintética pela omissão da sacarose, aumento da intensidade luminosa e concentração de CO_2 *in vitro*. Desta forma as plantas aclimatizaram mais rapidamente nas condições de campo. Esses autores relatam que a maioria dos carboidratos em plantas cultivadas fotomixotroficamente é consumida pela respiração ou usados como fontes de energia até que as plantas desenvolvam sua competência fotossintética. Assim sendo, plantas em cultivo fotoautotrófico possuíam um maior conteúdo de sacarose, glicose e frutose após 15 dias de aclimatização, do que as cultivadas em condições fotomixotróficas.

Vários trabalhos com cultivo fotoautotrófico de cana-de-açúcar foram publicados. No trabalho de Walker et al. (1991) foi possível cultivar plantas de cana de açúcar em sistema fotoautotrófico utilizando um alto fluxo de fótons ($180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e uma alta concentração de CO_2 ($2200 \mu\text{mol mol}^{-1}$), onde as plantas cultivadas nesse sistema apresentaram um aumento de biomassa seca. Por outro lado, Tay et al. (2000), observaram que a taxa fotossintética no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar não aumentou com o suplemento de CO_2 em plantas cultivadas em meio de cultura com açúcar, mas a matéria fresca e seca das culturas enriquecidas com $7400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ foi maior.

Xiao et al (2003) analisaram o efeito do número de trocas gasosas e do fluxo de fótons no frasco de cultivo de cana-de-açúcar em sistema fotomixotrófico e fotoautotrófico. Os autores observaram que no tratamento fotoautotrófico havia um aumento significativo da área foliar (4 vezes), matéria fresca (4,3 vezes) e matéria seca (6,7 vezes) em relação ao tratamento fotomixotrófico. Esse aumento de área foliar e biomassa estava correlacionado com o aumento no número de trocas gasosas de $0,2 \text{ h}^{-1}$ no controle, para 10 h^{-1} no tratamento fotoautotrófico, e com o aumento no fluxo de fótons fotossintéticos de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Além do aumento na biomassa, os autores observaram uma diferença significativa com relação à taxa fotossintética líquida, onde esta foi maior no cultivo fotoautotrófico.

ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS CULTIVADAS *IN VITRO* DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

Após serem propagadas *in vitro*, as plantas são aclimatizadas antes de irem a campo. Na cultura de tecidos, denomina-se de aclimatização o processo de adaptação das plantas do ambiente *in vitro*, para o *ex vitro*.

O processo de aclimatização de plantas cultivadas *in vitro* é um passo crítico para muitas espécies, requerendo tempo e demandando custos, fatos que podem restringir a aplicação comercial da técnica de micropropagação (FILA et al., 1998).

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas se desenvolvem em condições de baixa luminosidade, alta umidade e com uma fonte de carbono no meio de cultura. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento de um fenótipo que não sobrevive as

condições ambientais se transferidos diretamente para o campo. Portanto, as características fisiológicas e anatômicas das plantas micropropagadas necessitam ser gradualmente aclimatizadas ao ambiente *ex vitro* (HAZARIKA, 2003).

A taxa fotossintética *in vitro* é um dos principais fatores que influenciam nos baixos percentuais de aclimatização, provavelmente devido ao baixo fluxo fotossintético de fótons e à baixa concentração de CO₂ encontrada nos frascos de cultivo fechados (SEON et al., 2000). Essa baixa atividade fotossintética *in vitro* faz com que seja necessário um suprimento de carboidratos durante o cultivo, reduzindo ainda mais a atividade de enzimas do sistema fotossintético.

Durante a aclimatização de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas em biorreatores de imersão temporária, Rodríguez et al. (2003) observaram que o cultivo fotomixotrófico destas plantas fazia com que elas apresentassem uma baixa taxa fotossintética líquida (0,47 a 3,10 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, no 0 e 42 dias de aclimatização) quando comparadas as plantas em campo que apresentam cerca de 50 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A alta umidade relativa encontrada nos frascos de cultivo fechados força as plantas cultivadas nessas condições a abrirem os estômatos para manter o equilíbrio com a atmosfera no microambiente (SHACKEL et al., 1990). Essa condição faz com que os estômatos não se desenvolvam corretamente e permaneçam abertos mesmo com mudanças ambientais repentinas (SUTTER et al., 1992). Isso contribui para uma maior transpiração durante a fase de aclimatização gerando assim um estresse hídrico.

O estresse hídrico pode provocar inibição na fotossíntese de plantas C4 (figura 2). De acordo com Ghannoum (2009), vários autores sugerem que esta inibição fotossintética ocorre principalmente devido o fechamento dos estômatos, enquanto outros pesquisadores afirmam que fatores não-estomáticos são o principal motivo da inibição fotossintética.

As conseqüências da inibição não-estomática da fotossíntese em plantas C4 são: redução da atividade das enzimas fotossintéticas e concentração de ATP, inibição da assimilação de nitrato, senescência, mudança na anatomia e ultraestrutura foliar, entre outras (figura 2).

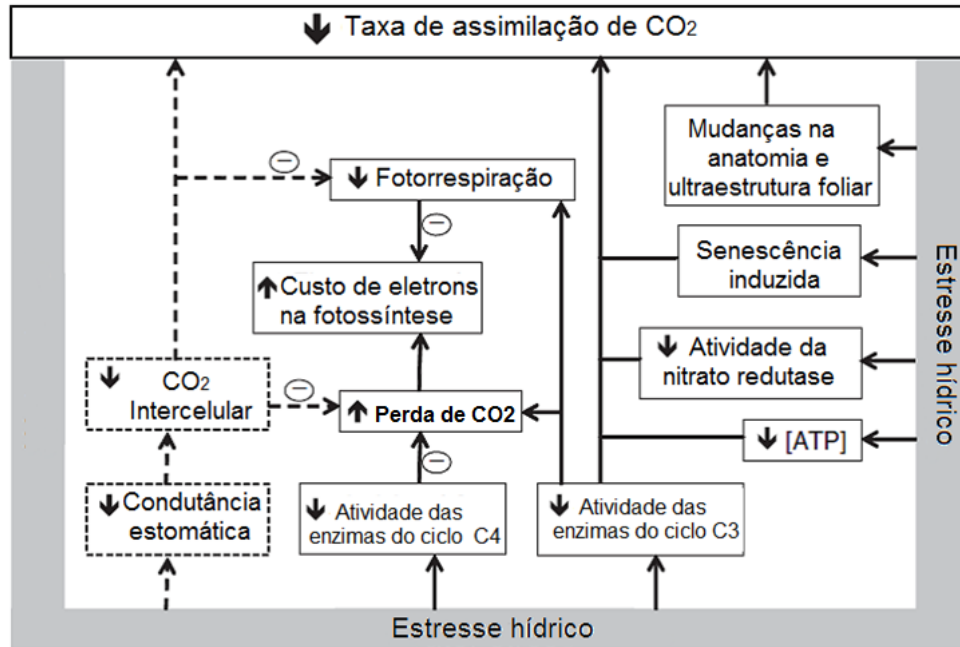


Figura 2. Resumo dos principais efeitos do estresse hídrico nos parâmetros fotossintéticos de folhas de plantas C4. Fatores estomáticos e não estomáticos estão indicados pelas linhas pontilhadas e contínuas, respectivamente. O sinal (-) indica um efeito na direção oposta. (Adaptado de GHANNOUM, 2009).

A redução na atividade enzimática do ciclo C3/C4 em plantas C4, influencia a fixação do CO₂ pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), o qual escapa para fora da bainha, provocando uma perda de CO₂ (GHANNOUM, 2009).

A assimilação e absorção de nitrato são fortemente reduzidas sob estresse hídrico, isso pode explicar a redução na concentração de clorofila e proteína em plantas C4 submetidas a estresse hídrico. A diminuição no conteúdo de clorofila e proteína sob estresse hídrico pode também ser devido à degradação generalizada de proteínas, como resultado da senescência induzida, tal como sugerido pelo aumento do conteúdo de aminoácidos (GHANNOUM, 2009).

Durante a fase de aclimatização em cana de açúcar, observa-se que o conteúdo de sacarose nas folhas das plantas decresce nos 7 primeiros dias e depois aumenta gradativamente ao longo do tempo. Essa queda está relacionada com o consumo de açúcares estocados durante o período *in vitro*, o qual vai sendo consumido durante o período em que a planta está se adaptando às condições fotoautotróficas. Correlacionando o conteúdo de sacarose com a biomassa acumulada durante a aclimatização, observa-se que durante os 7 primeiros dias não há ganho de massa fresca e seca, o que reforça a ideia de que nesse período as plantas estão se adaptando a nova condição (RODRIGUEZ *et al*, 2008).

ESTRESSE *IN VITRO*

Estresse Oxidativo

Desde a inoculação *in vitro* e ao longo dos sucessivos subcultivos, as plantas ou mais freqüentemente os explantes, são submetidos seguidamente e/ou simultaneamente a condições ambientais e culturais incomuns, quando comparadas com os cultivos em casa de vegetação e no campo (GASPAR *et al.*, 2002). O estresse do ambiente do cultivo *in vitro* pode influenciar os padrões fisiológicos de maneira positiva ou negativa. Nesse sentido, o conceito de eu-estresse é atribuído àquela condição de estresse suave e estimulante que ativa o metabolismo celular e incrementa a atividade fisiológica da planta. É um fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal. Por outro lado, o dis-estresse é gerado por qualquer condição desfavorável, seja pela intensidade ou duração, que afeta negativamente o metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal (LICHTENTHALER, 2004).

O estresse *in vitro* reflete-se inevitavelmente na forma de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes *versus* compostos pré-oxidantes que leva ao aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (tais como: íon superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila e peroxila), as quais podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucléicos (CASSELLS & CURY, 2001).

O oxigênio possui um papel muito importante nos organismos aeróbicos, permitindo a produção de energia pela célula, de maneira eficiente. Por outro lado, também pode formar espécies reativas de oxigênio (ROS) as quais podem danificar ou até matar as células. O oxigênio molecular pode se torna reativo (figura 4), se em vez de ser reduzido com 4 elétrons (formando H₂O), ele for reduzido com 1, 2 ou 3 elétrons, formando superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio ($O_2 + 2H + 2e^- \rightarrow H_2O_2$) e radical hidroxila ($O_2 + 2H + 3e^- \rightarrow OH \cdot$). Além disso, o oxigênio no estágio inicial, pode se tornar uma ROS, se for excitado e seus elétrons redistribuídos nos orbitais, formando espécies de oxigênio singlete (singlet oxygen species).

O superóxido ($O_2^{\cdot -}$) é produzido mais significativamente em cloroplastos e na mitocôndria. Já o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) surge durante a fotoredução do

oxigênio nos tilacóides. Contudo, o radical superóxido pode diretamente produzir peróxido de hidrogênio em uma reação de decomposição espontânea ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$).

Ao contrário do superóxido, o peróxido de hidrogênio pode penetrar facilmente nas membranas celulares e causar danos progressivos. A reação mais perigosa do H_2O_2 é a reação de Fenton na qual é produzido o radical hidroxila, que é altamente reativo ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + ^-OH$).

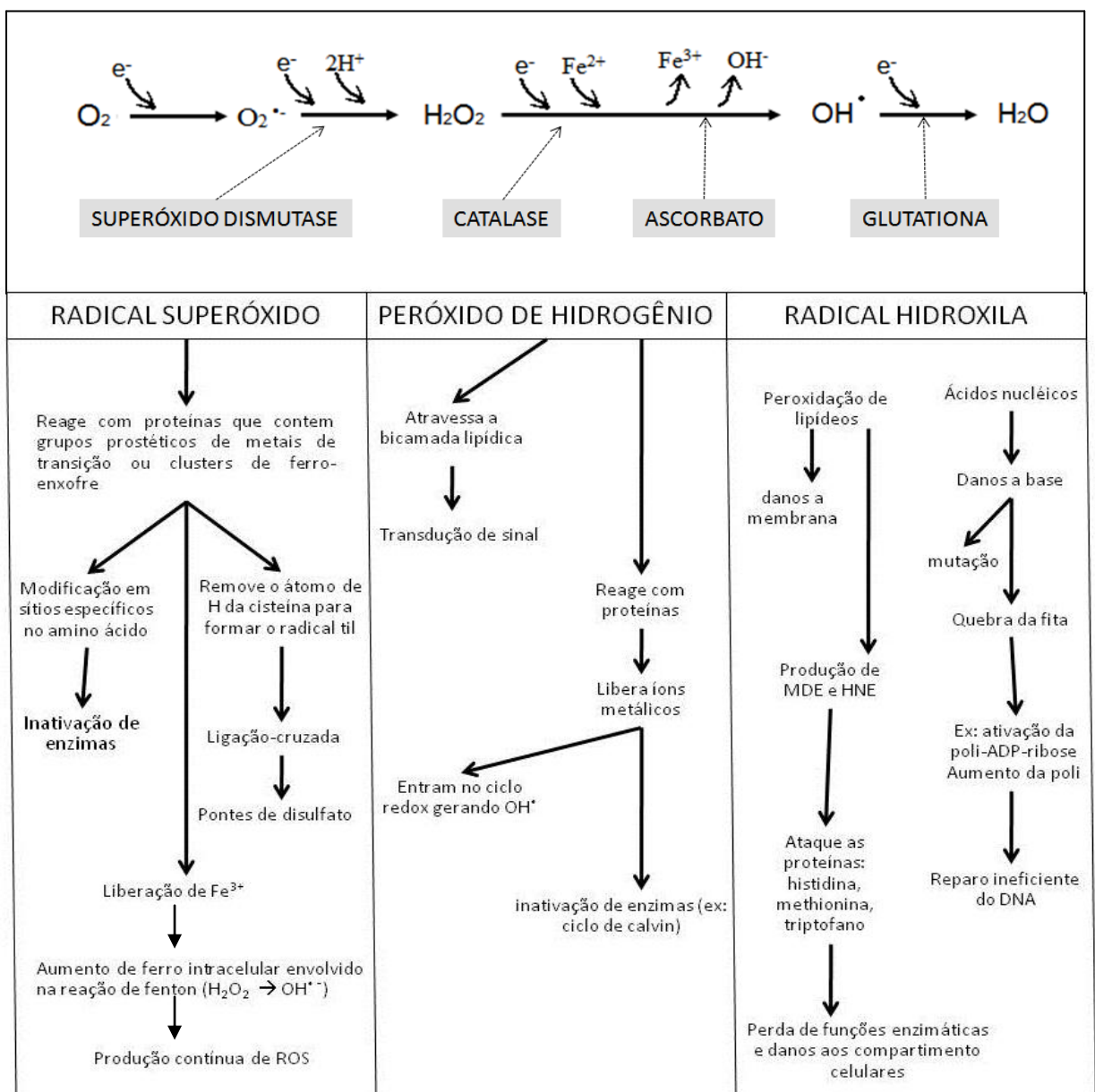


Figura 4. Espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas constitutivamente nas células. No início da figura acima observamos as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, ascorbato e glutationa) usadas para minimizar o efeito tóxico das ROS, e abaixo é mostrado os exemplo dos efeitos das ROS quando o balanço pro e pré-oxidante é perturbado no estresse oxidativo (Adaptado de CASSELLS e CURRY, 2001).

As ROS atuam de forma rápida e não específicas em moléculas orgânicas, produzindo danos a proteínas, enzimas, peroxidação de lipídeos e DNA. Também podem atuar em enzimas que participam da fixação do CO_2 no cloroplasto e nas Ca^{2+} ATPase.

Várias são as fontes das ROS na célula, que podem surgir endogenamente ou indiretamente por ação de fatores exógenos, como a radiação ionizante e UV, ozônio, químicos auto-oxidantes e xenobióticos (BARTOSZ, 1997).

As plantas desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de proteção ao estresse. Os mecanismos não enzimáticos incluem, entre outros, os flavonóides, alcalóides carotenóides (MARCHESE et al, 2008). A defesa primária contra o estresse oxidativo é o sistema celular redox, o qual neutraliza as espécies reativas de oxigênio (ROS). Dependendo do nível de estresse sinalizado por uma ROS, a indução de enzimas do sistema antioxidativo pode lidar com o estresse dentro da faixa de tolerância. Se a faixa de tolerância é excedida, o ciclo celular pode ser desligado para prevenir a transmissão de mutações e facilitar o reparo do DNA. Estresse descontrolado pode ocasionar mutação, morte programada ou não programada da célula (JOYCE et al, 2003).

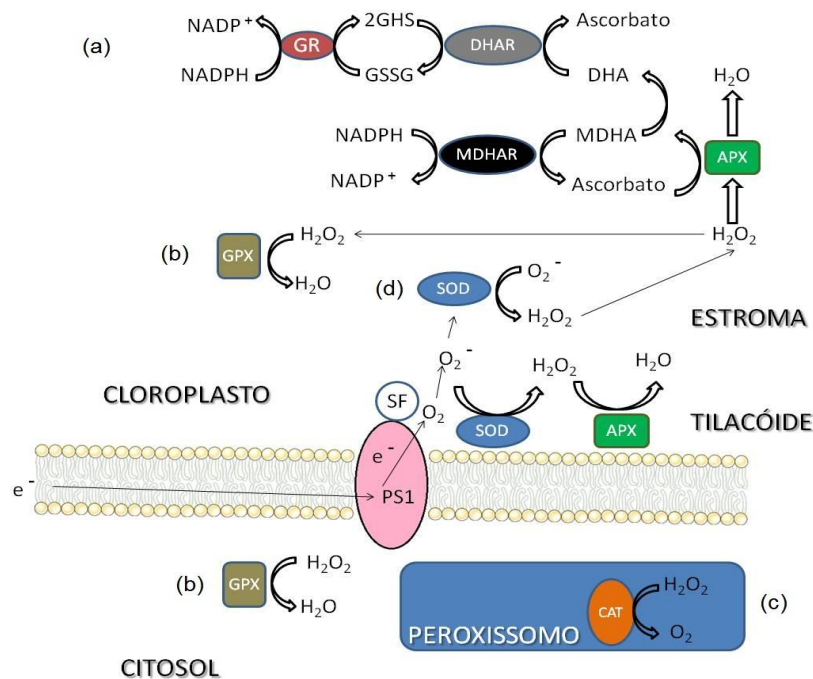


Figura 5. Esquema mostrando os mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS: (a) Ciclo da glutatona-ascorbato. (b) Ciclo da glutatona peroxidase (GPX). (c) Catalase (CAT). (d) Superoxido-dismutase (SOD). Adaptado de Carvalho. 2009.

As células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível de ROS (figura 5). As concentrações de ROS podem sofrer alteração, entre outros motivos, pela ação de várias enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (MITTLER, 2002). Os locais de produção das ROS a forma de remoção e a interferência das ROS no metabolismo vegetal pode ser vista na tabela 1. Entre as enzimas do sistema antioxidativo destacam-se as superóxidos dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), as catalases (CAT, EC 1.11.1), as peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) e a ascorbato-peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e glutathione-redutase (GR, EC 1.6.4.2).

Tabela 1. A tabela abaixo mostra o mecanismo de Produção, Remoção e interferência das ROS nas plantas (MITLER, 2002).

Mecanismo	Localização	ROS
Produção		
Fotossíntese TE e FSI ou II	Chl	O ₂
Respiração TE	Mit	O ₂
Glicolato oxidase	Per	H ₂ O ₂
Clorofila excitada	Chl	O ₂
NAPH oxidase	PM	O ₂
β-oxidação de ácidos graxos	Per	H ₂ O ₂
Oxalato oxidase	Apo	H ₂ O ₂
Peroxidases, Mn ²⁺ e NADH	PC	O ₂
Amino oxidase	Apo	O ₂ , H ₂ O ₂ H ₂ O ₂
Remoção		
Superóxido dismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O ₂
Ascorbato peroxidase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H ₂ O ₂
Catalase	Per	H ₂ O ₂
Glutathione peroxidase	Cyt	H ₂ O ₂ , ROOH
Peroxidases	PC, Cyt, Vac	H ₂ O ₂
Tiorredoxina peroxidase	Chl, Cyt, Mit	H ₂ O ₂
Acido ascórbico	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O ₂ , H ₂ O ₂
Glutathione	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H ₂ O ₂
α-tocoferol	Membranas	ROOH, O ₂ ¹
Carotenoides	Chl	O ₂ ¹
Interferência		
Adaptações anatômicas	Estrutura foliar,	O ₂ , H ₂ O ₂ , O ₂ ¹
Metabolismo C4 ou CAM	epiderme	O ₂ , H ₂ O ₂
Movimento do cloroplasto	Chl, Cyt, Vac	O ₂ , H ₂ O ₂ , O ₂ ¹
Supressão da fotossíntese	Cyt	O ₂ , H ₂ O ₂ ,
Modulação do Fotossinst. e antena	Chl	O ₂ , O ₂ ¹
Oxidases alternativas	Chl	O ₂
	Chl, Mit	

^aAbreviações: Apo, apoplasto; Chl, cloroplasto; PC, parede celular; Cyt, citosol; TE, transporte de elétrons; Mit, Mitocôndria; O₂¹, Oxigênio singlete, Per, Peroxissomo, PM, membrana plasmática; FS, fotossistema, ROS, Espécies reativas de oxigênio; Vac, vacúolo.

Em condições *in vitro*, o desenvolvimento da competência fotossintética dos microbrotos geralmente é baixa, no entanto o fluxo fotossintético de fótons (PPF) das lâmpadas fluorescentes das salas de crescimento podem ocasionar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso em recipientes fechados, o calor gerado pelas lâmpadas podem ocasionar estresse térmico.

O ambiente de alta umidade encontrado nos recipientes fechados, também reduz a transpiração vegetal, a qual é importante para o transporte de sais e reguladores de crescimento por meio do xilema e floema. O cálcio e os reguladores de crescimento estão diretamente envolvidos na transdução de sinal e conseqüentemente, é razoável a hipótese de que a deficiência na absorção de cálcio, desbalanço de reguladores de crescimento, incluindo acumulação de etileno no recipiente de cultivo pode levar a interferência de sinal e a quebra na regulação do ciclo celular. O estresse *in vitro* pode levar a produção de ROS afetando o ciclo celular e causando danos, incluindo inativação de enzimas, proteínas, membrana e danos ao DNA. Falhas no sistema antioxidante celular e mecanismo de reparo, em defesa ao estresse, pode resultar em deficiências nas funções celulares e dos tecidos, mutações, morte celular programada ou não programada (JOYCE *et al*, 2003). Além do mais, o estresse pode ainda induzir variações somaclonais em plantas *in vitro* (BAIRU *et al*, 2011).

O uso de recipientes ventilados para solucionar esses problemas, podem levar a dessecação dos explantes e estresse osmótico, se a umidade não for controlada (JOYCE *et al*, 2003).

As enzimas antioxidativas, tem sido utilizadas para avaliar a produção de ROS e o estresse oxidativo em plantas *in vitro*. No trabalho de Piqueras *et al.* (2002), foi observado que folhas de cravo em estágio hiperídrico tinham altos conteúdos de peroxidase e malondialdeído, e baixa lignificação, todos indicadores de danos oxidativos. No review publicado por Batková *et al.* (2008), são citados vários trabalhos onde a atividade das enzimas Catalase, Ascorbato Peroxidase e Peroxidase são utilizadas para avaliar o estresse *in vitro* de plantas.

Arágon *et al.* (2009), estudaram a resposta antioxidativa de plantas de cana-de-açúcar *in vitro* e durante a aclimatização. Avaliando a atividade da Catalase e Ascorbato peroxidase em folhas destas plantas, concluíram que as plantas em biorreatores apresentavam-se mais semelhantes fisiologicamente com plantas *ex vitro*, do que plantas em meio de cultura semi-sólido.

Assim, as enzimas antioxidativas podem ser utilizadas como marcadores de estresse, auxiliando os estudos dos fatores físicos envolvidos com o estresse *in vitro* e *ex vitro*.

REFERÊNCIAS

- ARAGON, C.; CARVALHO, L. C.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, S. Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) Propagated in Headspace Renovating Systems Shows Autotrophic Characteristics and Develops Improved Anti-oxidative Response. *Tropical plant biology*, Vol. 2, N^o 1, p. 38-50, 2008.
- ARANHA, C.; YAHN, C.A. Botânica da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S. B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 3-14.
- ARENCIBIA, A., Gene transfer in sugarcane. In **Biotechnology of Food Crops in Developing Countries** (Eds HOHN, T.; LEISINGER, K.M.), New York, Springer-Verlag, 1998, p. 79–104.
- BATKOVÁ, P.; POSPÍŠILOVÁ; J. SYNKOVÁ. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biologia Plantarum*, vol. 52, N^o 3, p.413-422, 2008.
- BAIRU, M. W., AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul*, Vol. 63, p. 147–173, 2011.
- BARBIERI, V. **Medidas e estimativas de consumo hídrico em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 1981. 142. Tese (Doutorado em solos e nutrição de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.
- BASTOS, E. **Cana de açúcar, o verde mar de energia**. São Paulo: Editora Ícone, 1987. 130 p. (Coleção Brasil Agrícola).
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta physiologiae plantarum**, Vol. 19. N^o. 1, p. 47-50, 1997.
- BOTTCHER, I.; ZOGLAUER, K.; GORING, H. Inducting and reversion of vitrification of plants cultured in vitro. **Physiol. Plant**, Vol. 66, p. 94-98, 1988.
- CARVALHO, I. S. de. Avaliação de stress oxidativo em bagos de videira (*Vitis vinifera* L.) da casta ‘trincadeira’ em condições de stress hídrico, 2009. 51 p. Dissertação de mestrado. Instituto superior de agronomia/ Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- CARVALHO, L.C.C. Cenário-sucroalcooeiro – após a transição. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, Vol.17, N^o 3, p. 12-13, 1999.

CASSELS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Vol.64, p.145-157, 2001.

CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol.41, N^o 3, p.385-391, 2006.

COUCEIRO, M. A.; AFREEN, S.M.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Enhanced growth and quality of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, Vol. 42, p. 278–282, 2006.

CHEN, C. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems engineering**, Vol. 88, p. 231-241, 2004.

DANTAS, A. K.; MAJADA, J.P., FERNÁNDEZ, B.; CAÑAL, M.J. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, Vol. 33, p. 237-243, 2001.

DEBERGH, P. AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON ARNOL, S.; ZIMMERMA, R. Reconsideration of the therm vitrification as used in micropropagation. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** Vol. 30, p. 135-140, 1992.

DESJARDINS, Y.; HDIDER, C.; RIEK, J. Carbon nutrition *in vitro* – regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; LILA-SMITH, M. (Eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.371-403.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. **Physiol. Plant**. Vol. 102, p. 411-418, 1998.

Fujiwara, K.; Kozai, T. Physical microenvironment and its effects. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; LILA-SMITH, M. (Eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. P. 319-367.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, N^o 43, 27–47, 2004.

GASPAR T.; FRANCK, T.; BISBIS, B; KEVERS, C.; JOUVE, L; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, Vol. 37, p.263-285, 2002

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, V. 103, N. 4, pp. 635-644, 2009.

GROUT, B. W. W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplanting. **Act Hortic**. Vol. 230, p. 129-135, 1988.

HASENSTEIN, K. H.; EVANS, M. L. Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. **Plant Physiol**, Vol. 86, p. 890-894, 1988.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Vol. 85. N^o. 12, pag. 1704-1712, 2003.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201112.pdf>. Acesso em: 09 Fevereiro de 2011.

JOYCE, S. M.; CASSELLS, A. C.; JAIN, S. M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Vol. 74, p. 103-121, 2003.

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

KEVERS, C. & GASPAR, T. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, Vol. 18, p.41-48, 1985.

KEVERS, C.; PRAT, R.; GASPAR, T. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content. **Plant Growth Regulation**, The Hage, Vol.5, p.59-66, 1987.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant**, Vol. 31, p.144-149, 1995.

KOZAI, T.; IWANAMI, Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. **J. Jpn. Soc. Hort. Sci.** Vol. 57, p.279-288, 1988.

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

KOZAI, T.; ALFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Dordrecht, The Netherlands, **Springer**, p. 1-315, 2005.

KUBOTA, C.; KOZAI, T (eds). **Transplant production systems**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. 229p.

LEES, R. P.; EVANS, E. H.; NICHOLAS, J. R. Photosynthesis in clematis, 'The President', during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. **J. Exp. Bot.** Vol. 42, p. 605-610, 1991.

LICHTENTHALER, H. K. El estrés y la medida del estrés en plantas. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. (eds), La Ecofisiología Vegetal – Una Ciencia de Síntesis, p.1017 – 1054. Thomson, Madrid, 2004.

MARCHESE, J. A.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P. F.; MORAES, R. M. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. **Photosynthetica**, Vol. 46, N^o 4, p. 501-505, 2008.

MATSUOKA, S. Benefícios da prática de tratamento térmico de mudas de cana-de-açúcar e eficiência dos métodos existentes no Brasil. *Cadernos Planalsucar*, N^o 3, 1984.

MILLS, D. Effect of sucrose application, minerals, and irradiance on the *in vitro* growth of *Cistus incanus* seedlings and plantlets. **Biologia Plantarum**, Vol. 53, No 3, p. 415-421, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, N^o 7, p.405-410, 2002.

MOUSSEAU, M.; CO₂ enrichment *in vitro*. Effect of autotrophic and heterotrophic cultures of *Nicotiana tabacum* (var. Samsun). **Photosynthesis Research**, Vol. 8, p.187-191, 1986.

NOVARETTI, W.R.T **Efeitos de diferentes níveis de populações iniciais de *Meloidogyne javanica* em duas variedades de cana de açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas no Estado de São Paulo**. 1981. 100p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

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

PHAN, C.T.; LETOUZE, R. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and hydroxycinnamate: CoA ligase activity. **Plant. Sci. Lett.** Vol. 31, p. 323-327, 1983.

PIERIK, R. L. M. *In vitro* culture of higher plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997, 352 p.

PIQUERAS, A.; CORTINA, M.; SERNA, M. D.; CASAS, J. L. Polyamines and hyperhidricity in micropropagated carnation plants, **Plant Sci.** p. 1-8, 2002.

RADOCHOVÁ, B.; TICHÁ, I. Leaf anatomy during leaf development of photoautotrophically *in vitro*-grown tobacco plants as affected by growth irradiance. **Biologia Plantarum**, Vol. 53, N0 1, p. 21-27, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996.

RIDESA. Lançamento de novas variedades de cana-de-açúcar. Editores: Simões-Neto, D.E. e Melo, L.J.O. Imprensa Universitária da UFRPE, Recife, 2005. 28p. (Boletim Técnico; 1).

RODRIGUEZ, R.; CID, M.; PINA, D.; GONZALEZ-OLMEDO, J. L.; DESJARDINS, Y. Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, Vol. 39, p.657–662, 2003.

RODRIGUEZ, R.; ARAGON, C. E.; ESCALONA, M.; GONZALEZ-OLMEDO, J. L.; Desjardins, Y. Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugarcane. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant**. Vol. 44, p.533–539, 2008.

SATHYANARAYANA, B. N.; VARGHESE, D. B. Plant tissue culture: practices and new experimental protocols. New Delhi: International Publishing House Pvt Ltd, 2007. 292 p.

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**, N^o 61, p. 135-142, 2000.

SHACKEL, K. A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E. G.; Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue cultured apple plants. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** Vol. 115, p. 468-472, 1990.

SILVA, J. A. T. da; NAGAE, S.; TANAKA, M. Effect of physical factors on micropropagation of *Anthurium andreaeanum*. **Plant Tissue Culture**, Vol. 1, p. 1-6, 2005.

SMITH, M. A. L.; SPOMER, L. A. Vessels, gels, liquid media, and support systems. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; LILA-SMITH, M. (Eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.371-403.

SUTTER, E., G.; SHACKEL, K.; DIAZ, J. C. Acclimatization of tissue culture plants. **Acta Hort**. Vol. 314, p. 115-119, 1992.

TAY, B.-S.; ONG, B.-L.; KUMAR, P. P. Effect of varying CO₂ and light levels on growth of *Hedyotis* and sugarcane shoot cultures. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**. Vol. 36, p.118–124, 2000.

WALKER, P. N.; HARRIS, J. P.; GAUTZ, L. D. Optimal environment for sugarcane micropropagation. **Transactions of the ASAE**, Vol. 34, p. 2609–2614, 1991.

XIAO, Y.; LOK, Y. H.; KOZAI, T. Photoautotrophic growth of sugarcane plantlets in vitro as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, Vol. 39, p.186–192, 2003

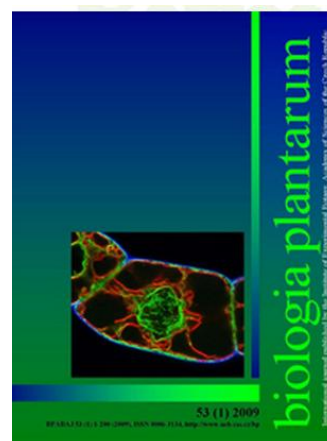
ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*-, implications for hardening. **Plant Science**, Lucknow, Vol. 52, p. 127-134, 1987

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: DEBERGH, P.C. et al (Ed.) Micropropagation. Technology and Application. **Kluwer Academic Publ**, Dordrecht, p. 45-69, 1991.

CAPÍTULO I

EFEITO DAS TROCAS GASOSAS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DA CANA-DE-AÇÚCAR

A ser enviado ao periódico **Biologia Plantarum**



Efeito das trocas gasosas no desenvolvimento da cana-de-açúcar *in vitro*

D. A. da COSTA^{1*}, T. R. CAMARA²

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Biofábrica, Recife, 50740-540 PE, Brazil¹.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife, 52171-900 PE, Brazil²

*costa.deivid@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das trocas gasosas, no desenvolvimento *in vitro* e na resposta antioxidativa das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas. Plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a diferentes condições de troca gasosa (medidas indiretamente através da taxa de evaporação do meio de cultura e expressas em ml d^{-1}) a partir de diferentes tipos de tampas utilizadas nos frascos de cultivo (T0, $0,0787 \text{ ml d}^{-1}$; T1, $0,3446 \text{ ml d}^{-1}$; T2, $0,7330 \text{ ml d}^{-1}$; T3, $1,1970 \text{ ml d}^{-1}$). As plantas de cana-de-açúcar foram inoculadas em meio de cultura MS sólido à temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de $47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. No final de 16 dias de cultivo em meio de multiplicação e após 14 dias em meio de enraizamento, foram analisados os parâmetros biométricos e atividade das enzimas antioxidativas Peroxidase (POD), Catalase (CAT), Polifenoloxidase (PFO) e Ascorbato peroxidase (APX). Os resultados mostraram que as plantas apresentaram um aumento significativo no número de folhas e matéria seca com o aumento da troca gasosa nos frascos. No tratamento que permitia uma taxa de evaporação do meio (T3) as plantas apresentaram alta mortalidade e redução no número de perfilhos e tamanho das plantas. Já o tratamento T1 e T2 apresentaram os maiores valores de matéria fresca e número de folhas. Com relação a atividade das enzimas, o aumento da troca gasosa provocou redução na atividade da CAT, POD e PFO. Os resultados indicam um maior desenvolvimento (crescimento e biomassa) e redução no estresse (baixa atividade de enzimas antioxidativas) nos tratamentos que permitiam trocas gasosa até $0,7330 \text{ ml d}^{-1}$.

Palavras chave: umidade, enzimas antioxidativas, cana-de-açúcar.

Introdução

A micropropagação de plantas é um processo que envolve uma fase *in vitro*, onde as plantas são multiplicadas em condições especiais, e uma fase *ex vitro* na qual as plantas são aclimatizadas às condições ambientais, geralmente em casa de vegetação. O frasco para cultivo de plantas *in vitro*, pode ser considerado como uma mini casa de vegetação, e o explante como uma miniplanta (CHEN, 2004). Contudo, o ambiente físico *in vitro* é particularmente diferente daquele encontrado na casa de vegetação. As taxas de crescimento e de desenvolvimento e muitas das características fisiológicas e morfológicas das plantas formadas *in vitro* são influenciadas pelo ambiente físico e químico dos recipientes (Kozai *et al.* 1997).

Para manter a esterilidade do interior dos frascos de cultivo *in vitro* de plantas, normalmente se utiliza tampas ou materiais que vedam a passagem de ar entre o interior e o exterior dos frascos, no entanto essa medida contribui para o aumento da umidade no interior dos mesmos. De acordo com Joyce *et al.* (2003), as condições de alta umidade nos frascos de cultivo podem afetar processos fisiológicos como a transpiração, ocasionando desordens na tomada de cálcio e movimento da auxina.

As desordens nutricionais geradas pela hiperidricidade podem afetar a formação de biomassa das plantas *in vitro*.

No trabalho de Kozai *et al.* (1991), as plântulas de mostarda apresentaram, de forma significativa, menos massa seca em frasco de cultivo fechado do que em frascos de cultivo que permitiam maior troca gasosa. O menor crescimento foi correlacionado com a provável redução de fotossíntese, transpiração e absorção de nutrientes nas plantas *in vitro*.

O movimento do ar em frascos de cultivo fechado é muito menor do que em condições de casa de vegetação, pois as tampas destes frascos possuem fechamento quase que hermético (Kozai *et al.* 2005). A restrição do movimento do ar saturado ao redor das plantas *in vitro*, diminui a condutância estomática reduzindo a difusão dos gases na epiderme das folhas reduzindo a fotossíntese e taxa de transpiração. A saturação da atmosfera com água provoca limitações na difusão do oxigênio levando os tecidos vegetais afetados a sobreviverem com o metabolismo anaeróbico (fermentativo) (Taiz e Zeiger 2004). Vários trabalhos relatam que tecidos hiperídricos acumulam água no apoplasto, criando uma camada de água ao redor das células que limitam a difusão do oxigênio. Também, tem sido relatado que a hipoxia pode induzir a geração de H₂O₂ a níveis tóxicos e criar um estresse oxidativo na presença de Fe catalítico (Saher *et al.* 2005).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes *versus* compostos pré-oxidantes que leva ao aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS - íon superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila e peroxila), as quais podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucleicos (Cassels e Cury 2001).

As concentrações de ROS podem sofrer alteração, entre outros motivos, pela ação de várias enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (Mittler 2002). Entre as enzimas do sistema antioxidativo destacam-se as superóxidos dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), as catalases (CAT, EC 1.11.1), as peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) e a ascorbato-peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e glutationa-redutase (GR, EC 1.6.4.2).

Vários trabalhos relatam um aumento na atividade de enzimas antioxidativas em plantas hiperídricas quando comparadas a plantas normais *in vitro* (Saher, *et al.* 2005, Dewir *et al.* 2006, Balen *et al.* 2009)

O uso de frascos de cultivo que permitem trocas gasosas, melhoram o crescimento vegetal através da redução da hiperidricidade e pela facilitação do movimento de solutos para as folhas na corrente transpiratória. E ainda, se observa que em frascos fechados, as concentrações de dióxido de carbono reduzem no período de luz. Porém, é possível fornecer adequadamente o dióxido de carbono para favorecer o cultivo fotoautotrófico, quando se utiliza frascos que permitem a troca gasosa (George *et al.* 2008).

É de grande importância entender como o estresse causado pela alta umidade e condições de hiperidricidade afetam a capacidade fotossintética das plantas, e como ocorrem as respostas bioquímicas durante esse estresse. Esse entendimento contribuirá para elucidar os mecanismos fisiológicos de resposta ao estresse *in vitro* e o efeito residual na aclimatização das plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito fisiológico e a resposta antioxidativa da cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes de troca gasosa *in vitro*.

Materiais e métodos

Plantas de cana-de-açúcar (variedade RB 2552) já estabelecidas *in vitro* foram utilizadas para realizar os experimentos. Foram inoculados 5 plantas por pote e 25 repetições (potes) por tratamento. As plantas utilizadas possuíam 3 cm de comprimento e foram cultivadas em meio de multiplicação, o qual era composto por: sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 0,3 mg L⁻¹ de Kinetin, 0,2 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol e gelificado com 8 g L⁻¹ de ágar. E em meio de enraizamento, qual era composto por: sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 1 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 g L⁻¹ de inositol e gelificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, por 20 minutos. Cada frasco recebeu 45 ml de meio de cultura. Os frascos com as plantas foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de 47,6 μmol m⁻² s⁻¹.

Cálculo da perda de água do meio de cultura (medida indireta da troca gasosa): Os potes utilizados tinham 8,8 cm de altura por 6,7 cm de diâmetro. Com tampa de plástico rosqueável. As trocas gasosas entre os frascos de cultura (com diferentes tampas) e o ambiente da sala de crescimento foi calculada em termos de perda de água do meio de cultura, de acordo com o relato de outros trabalhos onde o meio de cultura juntamente com o pote foi pesado antes e depois de intervalos de tempo e a diferença de peso (perda por evaporação) é usada para estimar a perda de água do frasco (Dillen e Buysens 1989, Mills *et al.* 2004, Winarto *et al.* 2004). Frascos com meio de cultura (5 repetições por tratamento) foram pesados a cada 24 horas, durante 7 dias, e a média de perda d'água por dia foi calculada e convertida para ser expressa em mililitros por dia (ml d⁻¹). A temperatura e umidade relativa média durante os 7 dias foi de 23±1°C e 51±1,5%, respectivamente. A taxa de evaporação da água no meio de cultura, calculada a partir dos tratamentos, pode ser vista na tabela 1.

Tratamento utilizados: Os tratamentos utilizados foram: T0, frasco fechado com tampa plástica; T1, frasco fechado com tampa e uma abertura de 94,98 mm²; T2, frasco fechado com tampa e 3 aberturas de 94,98 mm²; T3, frasco fechado com tampa e 7 aberturas de 94,98 mm² (figura 1). Um papel de filtro esterilizado, de poro médio de 13,6 micra (nominal micro rating 3,9 micra) foi colocado embaixo das tampas plásticas, para evitar contaminação.

Determinação da atividade das enzimas antioxidativas: O extrato das folhas foi preparado para as análises pela homogeneização de 0,1 g de matéria fresca em 4,0 mL do tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6.5) com 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP). O homogenado foi centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 10 minutos (Zeraik *et al.* 2008). A solução sobrenadante foi armazenada em freezer a -20°C e utilizada como fonte para determinação das atividades das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e dos teores de proteína solúvel (Bradford, 1976). A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE) por mg de proteína (U mg⁻¹ de proteína). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade de absorvância por minuto.

Para a catalase, a decomposição do peróxido de hidrogênio foi observada pelo declínio da absorbância a 240 nm por minuto (Berris e Sizer 1952). O sistema de reação foi constituído de uma solução contendo 1,39 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0); 0,05 mL do extrato enzimático e 0,06 mL de H₂O₂ 500 mM.

A atividade da peroxidase foi estimada com base no aumento da absorbância pela oxidação do guaiacol e concomitante redução do peróxido de hidrogênio. A mistura analisada continha 1,35 mL de guaiacol (0,05 M); 0,1 mL do extrato enzimático e 0,05 mL de H₂O₂ (10,3 mM) (Fatibello-Filho e Vieira 2002). Depois de 1 minuto de reação, a absorbância do tetraguaiacol formado foi medida em 470 nm.

A atividade da ascorbato peroxidase foi determinada pela diminuição do ascorbato e mensurada pela mudança na absorbância a 290 nm, no intervalo de 1 minuto (Nakano e Asada 1981). A mistura da reação foi constituída de uma solução contendo 1,335 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0); 0,075 mL de ácido ascórbico 10 mM; 0,075 mL do extrato enzimático e 0,015 mL de H₂O₂ 100 mM.

Na determinação da polifenoloxidase foram usados 1,0 mL da solução do pirogalo (50 mM) e 0,25 mL do extrato enzimático. Essa mistura permaneceu no escuro durante 5 minutos, sendo interrompida a reação com a adição de 0,25 mL de ácido sulfúrico a 5%. Posteriormente, a absorbância da reação foi medida a 420 nm em espectrofotômetro (Kar e Mishra 1976).

Análises estatísticas: Após 16 dias de cultivo em meio de multiplicação e após 14 dias em meio de enraizamento, as plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros biométricos: Matéria fresca e seca da parte aérea, número de folhas, tamanho das plantas e número de perfilhos (no final da fase de multiplicação). E avaliou-se também a atividade das enzimas antioxidativas: ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) e catalase (CAT), no final da fase de multiplicação e enraizamento. As plantas matrizes e os seus perfilhos foram analisados de forma separada para cada parâmetro.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e contaram com 25 repetições por tratamento. As análises estatísticas dos dados foram feitas através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Ao final do 16^o dia de cultivo em meio de multiplicação, as plantas matrizes (que foram inoculadas, e das quais partem os perfilhos) (figura 2) apresentaram tamanhos que variavam de forma inversamente proporcional em função do aumento da troca gasosa (tabela 2). Não houve diferença estatística entre os tratamentos T0 e T1 que apresentaram as maiores médias, porém, estes diferiram estatisticamente dos demais tratamentos.

Com relação ao número de folhas, se observou o efeito contrário do que aconteceu com o tamanho, isto é, as médias subiram com o aumento da troca gasosa, porém no tratamento T3 houve uma queda na média (tabela 2). Com isso, os tratamentos T1 e T2 apresentaram as maiores médias, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. O aumento no número de folhas deve ter ocorrido devido ao

aumento da taxa de transpiração das plantas e como consequência disso houve maior absorção de nutrientes para o crescimento das plantas.

A redução significativa no número de folhas no tratamento T3 com relação aos tratamentos T1 e T2 (tabela 2), pode estar associada a uma alta troca gasosa, que provocou uma alta taxa de transpiração provocando estresse. Isto é, apesar do tratamento T3 apresentar menor atividade enzimática na fase de enraizamento, quando comparado a outros tratamentos (figuras 4, 5 e 7), é importante salientar que as análises enzimáticas foram feitas com as plantas sobreviventes (menos de 10% sobreviveram) as quais poderiam ter se adaptado ao estresse alguns dias após a inoculação. Desta forma, nos primeiros dias elas devem ter sofrido estresse (devido a alta taxa de transpiração) que influenciou no desenvolvimento foliar, antes de se adaptarem. A figura 3 mostra o aspecto padrão das plantas no interior dos frascos após 16 dias de cultivo em meio de multiplicação, onde é possível observar que no tratamento T3, poucas touceiras sobreviveram as quais apresentaram pouco desenvolvimento. O reflexo desse pouco desenvolvimento no tratamento T3 pode ser observado, principalmente com relação ao tamanho das plantas e número de perfilhos, como mostra a tabela 2 (considerando apenas as touceiras que sobreviveram). Sallanon & Maziere (1992) estudaram a influência da umidade na sala de crescimento em roseiras e seus resultados indicam que de acordo com a intensidade da transpiração nas plantas, grandes mudanças foram observadas com relação a taxa de multiplicação e alongamento, onde o excesso de ventilação nos frascos de cultura podem provocar efeitos indesejáveis no crescimento das plantas.

No trabalho de Xiao *et al.* (2003), se observa um aumento significativo no número de folhas, relacionado com o aumento da troca gasosa em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Segundo os autores mesmo em alta intensidade luminosa, cerca de 400 PPF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as plantas mostraram a mesma média estatística, para número de folhas, que plantas cultivadas em baixa intensidade luminosa, 60 PPF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). E somente com o aumento da troca gasosa foi possível aumentar a média de folhas por planta.

A matéria fresca e a matéria seca das matrizes apresentaram as menores médias no tratamento T0 (tabela 2). E apesar do tratamento T3 ter a menor média de matéria fresca, diferindo estatisticamente do T1 (maior média), a matéria seca dele apresentou valores estatisticamente semelhantes ao T1.

O número de perfilhos foi semelhante nos tratamentos T0, T1 e T2. Já o tratamento T3 teve uma média muito inferior ao demais (tabela 2).

No estudo de Mills *et al.* (2004), plantas *in vitro* de Jojoba foram micropropagadas em caixas de cultivo (Magenta boxes) equipadas com diferentes tipos de membranas permeáveis na tampa. A maioria dos clones de jojoba utilizados, responderam de forma significativa e positiva ao aumento da troca gasosa. Os resultados mostraram um aumento de biomassa seca, número de folhas, e tamanho das plantas com o aumento da troca gasosa observado nas tampas com poros de 5 a 16 mm de diâmetro. Porém, quando utilizaram tampas com poros maiores que 16 mm de diâmetro ocorreu redução destes parâmetros. No seu trabalho Mills *et al.* (2004) sugerem que a redução dos parâmetros pode ter sido devido ao acúmulo de ABA nos tecidos expostos a desidratação e a redução do potencial hídrico do meio de cultura.

Esses resultados biométricos nas plantas mostram a relação das diferentes trocas gasosa entre o interior do frasco de cultivo e o ambiente da sala de crescimento. Como essa troca gasosa influencia a transpiração das vitroplantas, pode-se concluir que o uso da tampa de 7 furos (tratamento T3) é inviável nestas

condições de cultivo descritas, visto que o perfilhamento das plantas neste tratamento é muito reduzido, como também o seu tamanho. Esses indicadores somado com o fato da mortalidade elevada de plantas no tratamento T3, indica que o uso desta tampa para multiplicação de cana-de-açúcar *in vitro*, nestas condições de cultivo, não é recomendada.

Resposta das enzimas antioxidativas a transpiração das plantas nos diferentes regimes de troca gasosa: O efeito fisiológico *in vitro* da transpiração das plantas foram analisadas a partir da resposta do tecido vegetal a produção de enzimas antioxidativas em resposta a condições de estresse.

As figuras 4, 5, 6 e 7 mostram a comparação das médias estatísticas, (expressas em $U.mg^{-1}$ de proteína) dos resultados das atividades das enzimas Catalase (CAT), Polifenoloxidase (POX), Ascorbato Peroxidase (APX), e Peroxidase (POD) no tecido vegetal (parte aérea) após 16 dias em meio de multiplicação e 14 dias em meio de enraizamento.

A atividade da catalase (figura 4) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos na fase de multiplicação mostrando a menor média em T1 (13,66) e a maior média em T2 (19,09). Já na fase de enraizamento, a catalase apresentou maior atividade no T1 (15,75), não diferindo estatisticamente de T0, mas diferindo do T2 (10,85) e T3 (5,65).

A enzima peroxidase apresentou na fase de multiplicação, diferença estatística somente no tratamento T3 (figura 5). A maior média na fase de multiplicação foi em T0 (405,5) e a menor média foi em T3 (248,3). Quando comparamos a atividade enzimática nas duas fases, observamos uma grande diminuição da atividade na fase de enraizamento, apresentando uma redução de 55% (T0); 61,35% (T1), 41,21% (T2), 40,79% (T3). Nesta fase de enraizamento o tratamento T0 e T3 possuem diferenças estatísticas mas o T1 e T2 não diferem entre si nem dos demais.

A atividade da peroxidase do ascorbato (figura 6) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos tanto na fase de multiplicação como na de enraizamento. Com exceção do tratamento T0, no qual houve aumento da atividade na fase de enraizamento, todos os demais tratamentos apresentaram redução de 14,3% (T1); 25,8% (T2); 37,4% (T3) na atividade desta enzima.

Na figura 7 observamos que a atividade da enzima polifenoloxidase apresentou, na fase de multiplicação, em T1 e T3 a maior e menor média de atividade, respectivamente, diferindo estatisticamente entre si e dos demais tratamentos. O tratamento T0 e T2 não apresentaram diferenças nesta fase. Já na fase de enraizamento o único tratamento que apresentou diferença estatística dos demais foi o T3, apresentando também a menor média de atividade (92,25). Mais uma vez, com exceção do tratamento T0, todos os demais apresentaram redução na atividade entre a fase de multiplicação e enraizamento.

Em praticamente todas as enzimas analisadas (com exceção da catalase), as médias na fase de enraizamento mostram maior atividade no tratamento T0, onde a tampa não facilita a troca gasosa. No final da fase de enraizamento as plantas de cana apresentam tamanhos superiores (21,6% a 65,7% superior) quando comparadas as da fase de multiplicação (dados não revelados).

É possível que o aumento do tamanho dos tecidos (causado pelo acúmulo de água), crie uma relação de maior massa e menor superfície, onde a difusão de gases como O_2 , CO_2 e etileno é reduzida. Essa redução na difusão de gases pode

causar aumento e/ou redução de gases importantes, provocando estresse nas células vegetais, como é o caso da Hipoxia (causado pela baixa disponibilidade de O₂ pelas células).

De acordo com Jackson (2003) o coeficiente de difusão do O₂, etileno e CO₂ na água é cerca de 10.000 vezes menor que no ar. Desta forma a água depositada externamente na epiderme vegetal também pode interferir na difusão dos gases.

Wu *et al.* (2009) ressaltam que as atividades da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) foram significativamente maiores em tecidos hiperídricos do que em tecidos normais de alho. Outro ponto importante a se observar é que na figura 4 (catalase) as atividades das enzimas no frasco totalmente vedado (T0) e nos demais tratamentos, na fase de multiplicação, não apresentou diferença significativa. Porém, na fase de enraizamento, a atividade das mesmas enzimas mostraram-se significativamente menores no tratamento T3. Vale a pena ressaltar, que as plantas inoculadas na fase de multiplicação vieram de potes que estavam totalmente vedados. Isso pode ter influenciado para que nesta fase, as plantas nos tratamentos que permitiam maiores trocas gasosas, estavam ainda se adaptando as condições de transpiração e isso pode ter levado a um aumento na atividade enzimática nessa fase. O aumento da transpiração vegetal em plantas oriundas do cultivo *in vitro* em potes vedados pode gerar inicialmente um estresse hídrico que como resposta produz ROS. Plantas de gérbera aclimatizadas sob umidade relativa de 80-90% durante 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias antes de ir para campo, apresentaram aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidativo nos primeiros dias de aclimatização, e redução da atividade em períodos maiores de aclimatização (Chakrabarty e Datta 2008).

No caso do tratamento T3, a atividade das enzimas na fase de enraizamento foi mais baixa que nos demais tratamentos. Contudo, as plantas utilizadas nas análises enzimáticas deste tratamento foram as que sobreviveram, isto é, mais de 90% das plantas neste tratamento morreram. Certamente, as que sobreviveram conseguiram aclimatizar ao ambiente de alta troca gasosa e apresentaram baixa atividade enzimática. Porém a alta mortalidade, o baixo perfilhamento, e altura reduzida, indicam que a passagem das plantas do ambiente de baixa troca gasosa para o de alta troca gasosa, foi extremamente danoso para a maioria das plantas neste tratamento, as quais não aclimatizaram neste microambiente e morreram.

Os resultados sugerem que a troca gasosa no frasco onde a taxa de evaporação é de 1,19 ml d⁻¹ é danosa para o cultivo *in vitro* de cana, nas condições deste trabalho. Contudo, o aumento da troca gasosa durante a micropropagação da cana permitiu a formação de plantas com incremento de matéria seca e número de folhas, bem como redução do estresse oxidativo.

Tabela 1. Taxa de evaporação (em ml d⁻¹) do meio de cultura calculado a partir dos diferentes tipos de tampas utilizadas.

	Orifícios na tampa			
	0	1	3	7
Taxa de evaporação	0,0787	0,3446	0,7330	1,1970

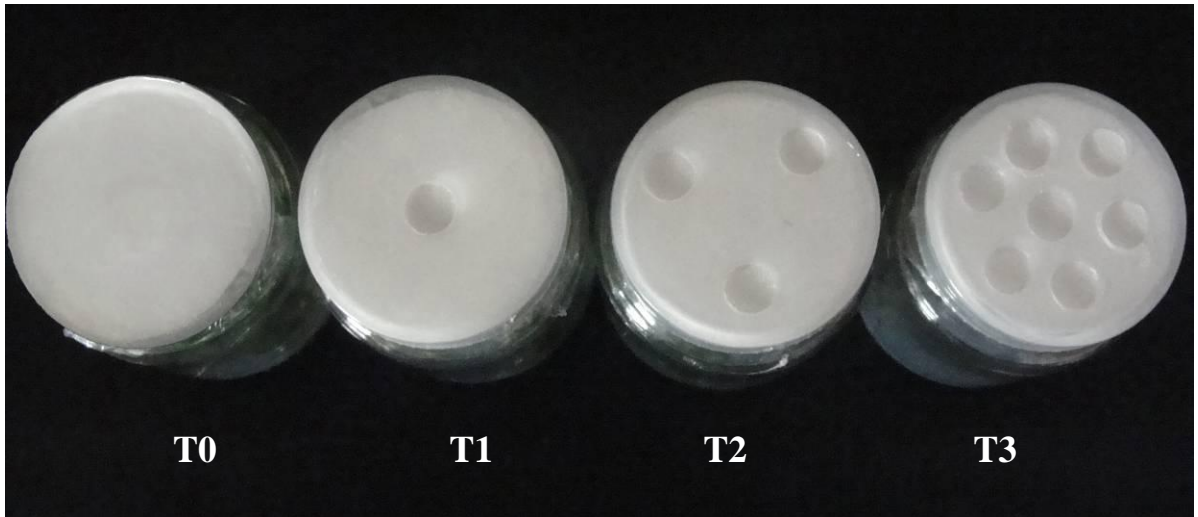


Figura 1. Diferentes tipos de tampas utilizadas no experimento. T0 – tampa sem orifício; T1 – tampa com 1 orifício; T2- tampa com 3 orifícios; T3 – tampa com 7 orifícios.

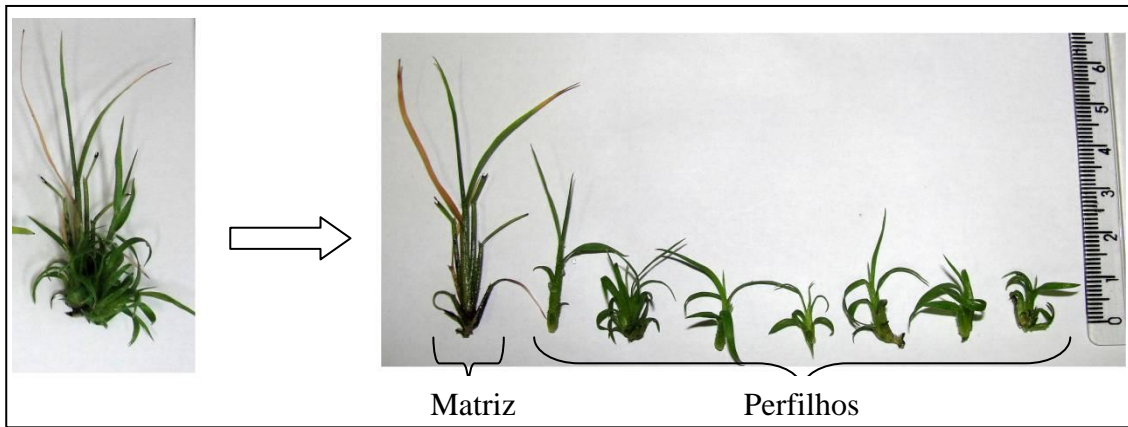


Figura 2. Aspecto de uma touceira no final da fase de multiplicação (à esquerda da seta), e a separação das plantas de uma touceira (à direita da seta).

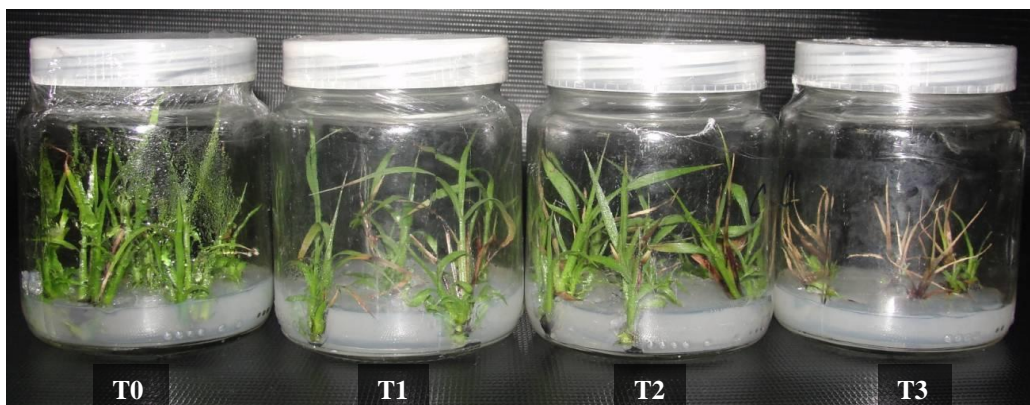


Figura 3. Aspecto das plantas nos frascos de cultivo *in vitro*, 16 dias após a inoculação no meio de multiplicação. T0 – tampa sem orifício; T1 – tampa com 1 orifício; T2- tampa com 3 orifícios; T3 – tampa com 7 orifícios.

Tabela 2. Número médio de folhas expandidas, tamanho, matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria fresca da parte aérea (MFPA) e número de perfilhos, das plantas matrizes após 16 dias de cultivo em meio de multiplicação. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5 %). T0, tampa sem orifício; T1 tampa com 1 orifício; T2 tampa com 3 orifícios; T3 tampa com 7 orifícios.

Variáveis analisadas					
Tratamentos	N ^o de folhas	Tamanho (cm)	MSPA (gr)	MFPA (gr)	Perfilhos
T0	4,071 ^b	6,979 ^a	0,0173 ^b	0,156 ^b	3,480 ^a
T1	7,143 ^a	6,779 ^a	0,0239 ^a	0,208 ^a	4,000 ^a
T2	7,000 ^a	5,529 ^b	0,0236 ^a	0,163 ^b	3,980 ^a
T3	5,143 ^b	3,994 ^c	0,0226 ^{ab}	0,141 ^b	1,286 ^b

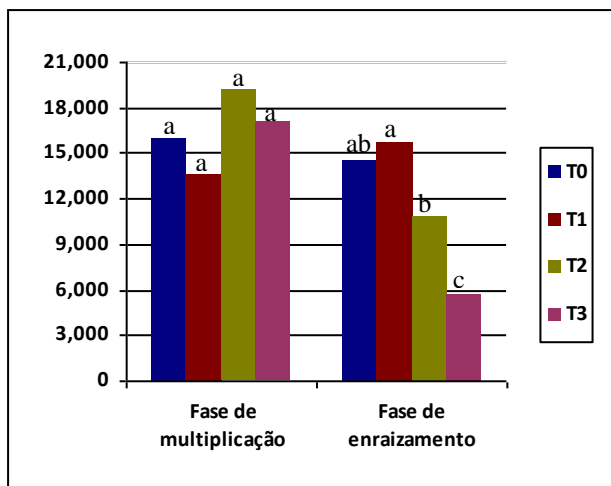


Figura 4. Valores médios da atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) da catalase após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

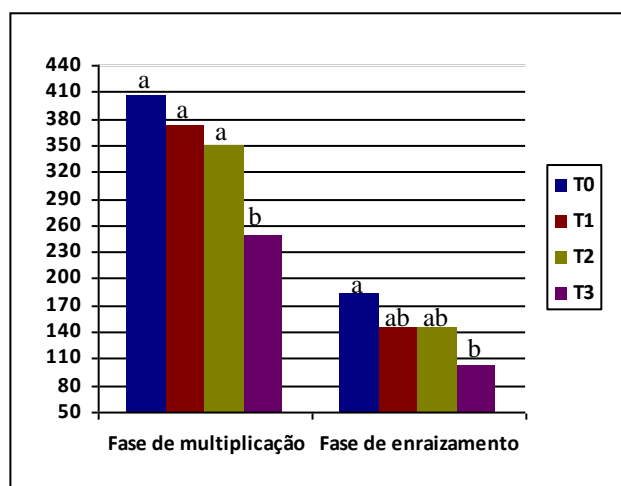


Figura 5. Valores médios da atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) das peroxidases após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

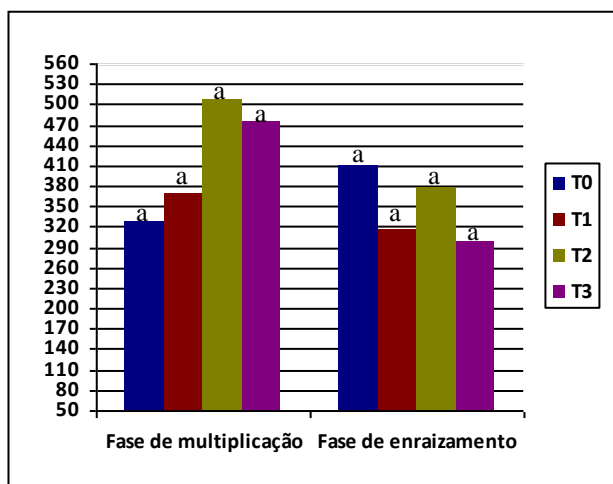


Figura 6. Valores médios da atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) da peroxidase do ascorbato após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

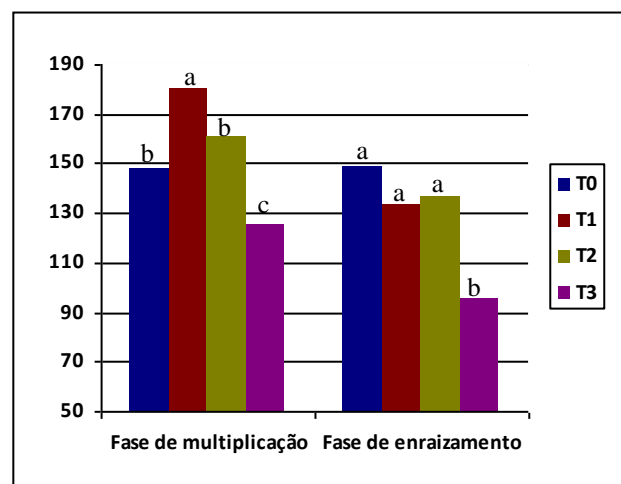


Figura 7. Valores médios da atividade específica (U.mg⁻¹ de proteína) da polifenoloxidase após as fases de multiplicação e enraizamento. Letras iguais não diferem entre si no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

REFERÊNCIAS

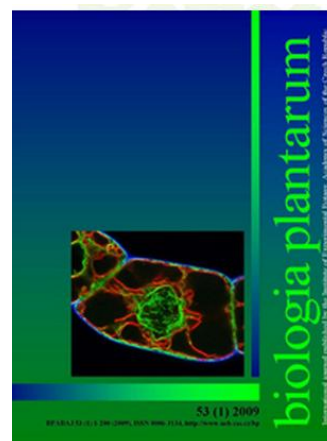
- Balen, B., Taklec, M., Pavokovic, D., Kozlina-Pevalek, B.; Rasol Krsnik. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. **J Plant Growth Regul.** 28: 36–45, 2009.
- Berris, L.S.J., Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry.** 195: 133-140, 1952.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** 72: 248–254, 1976.
- Cassels, A.C., Cury, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 64: 145-157, 2001.
- Chakrabarty, D., Datta, S. K. Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. **Acta physiologiae plantarum.** 30: 325-331, 2008.
- Chen, C. Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering.** 88: 231-241, 2004
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany.** 58: 93–99, 2006.
- Dillen, W., Buysens, S. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.** 19: 181-188, 1989.
- Fatibello-Filho, O., Vieira, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova.** 25: 455-464, 2002.
- Jackson, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulg. J. Plant. Physiol.,** Special issue: 96-109, 2003.
- Joyce, S. M., Cassels, A. C., Jain, S. M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. **Plant cell, Tissue and Organ Culture.** 74: 103-121, 2003.
- Kar, M., Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during pice leaf senescence. **Plant Physiology.** 57: 315-319, 1976.
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, Geert-Jan D. (ed.): The components of plant tissue culture media II. In:_____. (Org.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition: Volume 1. the Background.* Pp 157. Springer, Netherlands 2008.
- Kozai, T., Alfreem, F., Zobayed, S. M. A. (ed.): Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Dordrecht - The Netherlands, **Springer** 2005.
- Kozai, T., Kubota, C., Jjeong, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 51: 49-56, 1997.
- Kozai, T. Ohde, N., Kubota, C. Similarity of growth patterns between plantlets and seedlings of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 24: 181–86, 1991.
- Mills, D.; Yanqing, Z.; Benzioni, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.** 40: 396–402, 2004.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science.** 7: 405-410, 2002.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** 15: 473–497, 1962.
- Nakano, Y., Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology.** 22: 867–880, 1981.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. Olmos. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 81: 149–158, 2005.

- Saher, S., Fernández-García, N., Piqueras, A., Hellín, E., Olmos, E. Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured *in vitro*: a hypoxia stress?. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43: 573-582, 2005.
- Sallanon, H., Maziere, Y. Influence of growth room and vessel humidity on the *in vitro* development of rose plants. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, 30: 121-125, 1992.
- Taiz, L., Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- Winarto, B., Aziz, M. A., Rashid, A. A., Ismail, M. R. Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation. **Indonesian Journal of Agricultural Science**. 5: 11-19, 2004.
- Xiao, Y, Lok, Y. H., Kozai, T. Photoautotrophic grow of sugar cane plantlets *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**. 39: 186–192, 2003.
- Zeraik, A.E., Souza, F.S., Fatibello-Filho, O., Leite, O.D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**. 31: 731-734, 2008.
- Wu, Z., Chen, L. J., Long, Y. J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant**. 45:483–490, 2009.

CAPÍTULO II

INTERAÇÃO ENTRE A SACAROSE E TROCA GASOSA NO CULTIVO *IN VITRO* DA CANA-DE-AÇÚCAR E SUA INFLUÊNCIA NA MICROPROPAGAÇÃO E RESPOSTA OXIDATIVA

A ser enviado ao periódico **Biologia Plantarum**



Interação entre a sacarose e troca gasosa no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar e sua influência na micropropagação e resposta oxidativa

D. A. da COSTA^{1*}, T. R. CAMARA²

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Biofábrica, Recife, 50740-540 PE, Brazil¹.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife, 52171-900 PE, Brazil²

*costa.deivid@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre sacarose e troca gasosa e sua influência no desenvolvimento plantas *in vitro* durante a fase de multiplicação e enraizamento da cana-de-açúcar. As plantas foram inoculadas em meio de cultura MS sólido à temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de $47,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em três concentrações de sacarose (0, 30 e 15 g L^{-1}) e três regimes de troca gasosa ($0,0787 \text{ ml d}^{-1}$; $0,3446 \text{ ml d}^{-1}$ e $0,7330 \text{ ml.d}^{-1}$) obtidos a partir de orifícios na tampa dos frascos. No final de 16 dias de cultivo em meio de multiplicação e após 14 dias em meio de enraizamento, foram analisados os parâmetros biométricos e atividade das enzimas antioxidativas Peroxidase (POD), Catalase (CAT), Polifenoloxidase (PFO) e Ascorbato peroxidase (APX).

Observou-se que a redução da sacarose de 30 g L^{-1} para 15 g L^{-1} promoveu uma redução da biomassa seca e a ausência de açúcar no meio de cultura provocou a morte de todas as plantas no final da fase de multiplicação. Houve um aumento na biomassa seca e número de folhas com o aumento das trocas gasosas. O tamanho das plantas reduziu conforme o aumento das trocas gasosas, e a diminuição da sacarose estimulou o crescimento das plantas. Na fase de enraizamento o aumento da troca gasosa estimulou a produção de raízes. Com relação a atividade enzimática, considerando a troca gasosa (orifícios na tampa) e concentração de sacarose no meio, na fase de multiplicação não houve diferença estatística entre os tratamentos com relação aos orifícios nas tampas (com exceção dos tratamentos com 15 g L^{-1} de sacarose nas análises de CAT). Porém na fase de enraizamento, todas as enzimas mostraram diferenças significativas quanto aos orifícios na tampa e sacarose. O que se observa é que os tratamentos com 1 orifício na tampa (com 15 e 30 g L^{-1} de sacarose) em todas as enzimas analisadas, apresentou significativamente menores médias de atividade enzimática. As menores atividades dessas enzimas foram nos tratamentos com 1 orifício e 30 g L^{-1} de sacarose, o qual também apresentaram os melhores resultados no desenvolvimento vegetal, mostrando que essas enzimas podem ser utilizadas como marcadores de estresse *in vitro* para cana-de-açúcar.

Palavras chave: troca gasosa, sacarose, enzimas antioxidativas, cana-de-açúcar.

Introdução

A agroindústria canavieira responde por aproximadamente 75% da produção mundial de açúcar (Lakshmanan *et al.* 2005). No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar tornou-se mais importante a partir da década de 1970. Atualmente o país destaca-se como maior produtor de cana-de-açúcar e também o maior exportador de açúcar e etanol no mundo (UNICA 2009).

A produção em larga escala de novas variedades com certificação genética e fitossanitária da cana-semente é viabilizada pela adoção dos sistemas de micropropagação (Lakshmanan *et al.* 2005).

Durante esse processo, o uso generalizado de frascos de cultura fechados cria uma inter-relação particular entre substrato/planta/atmosfera condicionado pela alta umidade relativa do ar, baixa intensidade luminosa, grandes concentrações de reguladores de crescimento, excesso de nutrientes e mínimas variações de

temperatura. Esses fatores são responsáveis pela inabilidade de algumas plantas de sobreviverem ao transplante para condições *ex vitro* (Dantas *et al* 2001).

Plantas *in vitro* geralmente possuem pouca clorofila e enzimas responsáveis pela fotossíntese, como a ribulose bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), as quais estão com baixa atividade ou inativas. Essa baixa atividade pode estar relacionada com a presença de açúcar durante o desenvolvimento foliar (Hazarika 2003).

Sabe-se, que as altas concentrações de sacarose no meio de cultura, a baixa luminosidade e baixa concentração de dióxido de carbono no ar dos frascos de cultivo são fatores limitantes importantes que influenciam na fotossíntese *in vitro* (Lees *et al.* 1991, Fujiwara *et al* 1995).

Desde a inoculação *in vitro* e ao longo dos sucessivos subcultivos, as plantas ou mais freqüentemente os explantes, são submetidos seguidamente e/ou simultaneamente a condições ambientais e culturais incomuns, quando comparadas com os cultivos em casa de vegetação e no campo (Gaspar *et al.* 2002).

O estresse *in vitro* reflete-se inevitavelmente na forma de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes *versus* compostos pré-oxidantes que leva ao aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS - íon superóxido, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila e peroxila), as quais podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucléicos (Cassels e Cury 2001), gerando frequentemente estresse.

Considerando que os fatores do microambiente dos frascos de cultura *in vitro* contribuem para uma condição de estresse, é importante avaliar a resposta oxidativa da cana-de-açúcar durante a modificação do microambiente, de modo a entender como as plantas reagem a essas alterações, permitindo a redução do estresse e contribuindo para um melhor desenvolvimento *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito fisiológico e a resposta antioxidativa da sacarose e troca gasosa e a interação entre eles durante a micropropagação da cana-de-açúcar.

Materiais e métodos

Para este experimento foram utilizadas plantas de cana de açúcar (variedade RB 872552) *in vitro*. As plantas utilizadas possuíam 3 cm de comprimento e foram cultivadas durante 16 dias em meio de multiplicação, o qual era composto por: Sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 0,3mg L⁻¹ de Kinetin, 0,2 mg L⁻¹ de BAP, 0, 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol e gelificado com 8 g L⁻¹ de agar. E durante 14 dias em meio de enraizamento, o qual era composto por: sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 1 mg L⁻¹ de ANA, 0, 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol e gelificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, por 20 minutos. Foram inoculadas 5 plantas por pote e cada frasco recebeu 45 ml de meio de cultura. Os frascos com as plantas foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de 47,6 µmol m⁻² s⁻¹.

Foram utilizadas três diferentes regimes de trocas gasosa (troca de gases entre o interior e exterior dos frascos) calculados conforme Mills *et al.* (2004) e convertidos para ser expressa em mililitros por dia (ml d⁻¹). Os tratamentos consistiam de frascos com tampas sem orifício (0,0787 ml d⁻¹), com 1 orifício (0,3446 ml d⁻¹) e com 3 orifícios (0,7330 ml d⁻¹), e em todos os frascos havia papel de filtro para evitar

contaminações. Os três tipos de frascos foram combinadas com 3 tipos de concentrações de sacarose: 30 g L⁻¹; 15 g L⁻¹; 0 g L⁻¹ (tabela 1).

Análises estatísticas: Após 16 dias de cultivo em meio de multiplicação e após 14 dias em meio de enraizamento, as plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros biométricos: Materia fresca e seca da parte aérea e raiz, número de folhas, tamanho das plantas e número de perfilhos. Avaliou-se também a atividade das enzimas antioxidativas: Ascorbato peroxidase (APX), Peroxidase (POD), Polifenol oxidase (PPO) e Catalase (CAT). As plantas matrizes foram analisadas de forma separada dos seus perfilhos para cada parâmetro biométrico e atividade enzimática.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e contaram com 9 tratamentos com 25 repetições por tratamento, gerando um experimento fatorial de 3x3 (3 concentrações de sacarose; 3 regimes de troca gasosa). As análises estatísticas dos dados foram feitas através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Determinação da atividade das enzimas antioxidativas: No final da fase de multiplicação e enraizamento, as folhas das plantas foram congeladas em nitrogênio líquido e o extrato das folhas foi preparado conforme Zeraik *et al.* (2008). A solução sobrenadante foi armazenada em freezer a -20°C e utilizada como fonte para determinação das atividade das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e dos teores de proteína solúvel (Bradford, 1976).

As análises de atividade da catalase foram realizadas conforme Beer e Sizer (1952), de peroxidase conforme Fatibello-filho e Vieira (2002), de ascorbato peroxidase conforme Nakano e Asada (1981) e a determinação da atividade da polifenoloxidase foi realizada conforme Kar e Mishra (1976). A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE) por mg de proteína (U mg⁻¹ de proteína). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade de absorvância por minuto.

Resultados e Discussão

Em todos os tratamentos onde foi retirada a sacarose (T3-0, T3-1 e T3-3) houve perda total das plantas, pois estas apresentaram-se amarelo-esbranquiçadas ou mortas, no final da fase de multiplicação.

No final da fase de multiplicação, a matéria fresca da parte aérea (MFPA) das plantas matrizes não apresentou diferença estatística entre os tratamentos com 30 g L⁻¹ de sacarose (T1-0, T1-1, T1-3), já nos tratamentos com 15 g L⁻¹ de sacarose houve diferenças significativas e o tratamento sem orifício e com 15 g L⁻¹ de sacarose apresentou a maior média (0,2179 gramas) não diferindo do tratamento com um orifício e com 15 g L⁻¹ de sacarose T2-1 (tabela 2)

Já com relação a matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas matrizes, houve uma tendência de aumento no peso a medida que se aumentava a troca gasosa no frasco. O tratamento com 3 orifícios e 30 g L⁻¹ de sacarose apresentou significativamente a maior média (0,0268 gramas). Já nos tratamentos com 15 g L⁻¹ de sacarose, não houve diferença entre os frascos com e sem orifício (tabela 2). Portanto, a redução de sacarose combinado com o aumento da troca gasosa,

parece não ser suficiente para estimular o ganho de biomassa por fotossíntese, e compensar a retirada do açúcar. Uma evidencia disso, é a grande mortalidade de plantas matrizes nos tratamentos com 15 g L^{-1} (tabela 4).

A comparação entre as médias do fator sacarose, tanto para MFPA como para a MSPA apresentaram diferenças estatísticas (tabela 9). Já na comparação do fator troca gasosa (orifícios na tampa), os tratamentos com 3 orifícios diferiram dos demais (tabela 9). Os valores de matéria fresca da parte aérea, podem ter sido maiores nos tratamentos com 15 g L^{-1} de sacarose, devido ao potencial osmótico do meio de cultura ser menos negativo que no meio com 30 g L^{-1} . Portanto, sugere-se que o ganho de massa fresca é devido a maior disponibilidade de água para as plantas.

A relação do aumento na biomassa seca com ao aumento da troca gasosa, também foi relatado em outros trabalhos com jojoba (Mills *et al.*, 2004), *Limonium latifolium* (Xiao e Kozai, 2006) e cana-de-açúcar (Xiao *et al.* 2003).

A fonte de carbono no meio de cultura é importante, pois as plantas cultivadas *in vitro*, geralmente estão em ambiente desfavoráveis à fotossíntese, sendo necessária a suplementação com uma fonte de carbono. Porém, sabe-se que as altas concentrações de sacarose no meio de cultura, a baixa luminosidade e baixa concentração de dióxido de carbono no ar dos frascos de cultivo são fatores limitantes importantes que influenciam na fotossíntese *in vitro* (Lees *et al.* 1991; Fujiwara *et al.* 1995), gerando mais dependência da planta para um cultivo fotomixotrófico.

Com a redução da sacarose e o aumento de troca gasosa esperava-se reduzir a dependência do vegetal ao açúcar do meio de cultura compensando a redução do açúcar com incremento de biomassa pela fotossíntese *in vitro*. Porém a redução na concentração de sacarose, nas condições de luminosidade e CO_2 deste experimento, promoveram uma redução da biomassa seca. Resultados semelhantes foram observados por Langford & Wainwright (1987) durante a micropropagação de rosas em diferentes concentrações de sacarose, onde as concentrações de açúcar inferior a 20 g L^{-1} reduziram o desenvolvimento das plantas.

Contudo, trabalhos relatam que a promoção do aumento da fotossíntese pode ser realizado, em condições *in vitro*, desde que além da sacarose outros fatores importantes sejam ajustados, como a intensidade luminosa e o CO_2 .

Em *Rehmannia glutinosa* houve um aumento da capacidade fotossintética pela omissão da sacarose, aumento da intensidade luminosa e concentração de CO_2 *in vitro* (Seon *et al.*, 2000). No trabalho de Xiao *et al.* (2003), foi analisado o efeito do número de trocas gasosas e do fluxo de fótons no frasco de cultivo de cana-de-açúcar em sistema fotomixotrófico e fotoautotrófico. Os autores observaram que no tratamento fotoautotrófico havia um aumento significativo da área foliar (4 vezes), matéria fresca (4,3 vezes) e matéria seca (6,7 vezes) em relação ao tratamento fotomixotrófico. Esse aumento de área foliar e biomassa estava correlacionado com o aumento no número de trocas gasosas de $0,2 \text{ h}^{-1}$ no controle, para 10 h^{-1} no tratamento fotoautotrófico, e com o aumento no fluxo de fótons fotossintéticos de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Com relação ao número de folhas, houve diferença significativa nos tratamentos com 30 g L^{-1} de sacarose. O tratamento T1-0 (tampa totalmente vedada) apresentou a menor média (2,91) enquanto que os tratamentos que permitiam maior troca gasosa (T1-1 e T1-3) apresentaram quase o dobro de folhas, diferindo do tratamento T1-0 (Tabela 2). As médias do fator sacarose, para o número de folhas (tabela 9), não indicaram diferença estatística. Portanto a referida variável sofreu

maior influência do fator orifícios na tampa do que do fator sacarose (tabela 9). E o número de folhas foi significativamente maior nos tratamentos com maior troca gasosa que o controle (tabela 2)

Os resultados são semelhantes aos observados no trabalho de Xiao *et al.* (2003), que também relatam o aumento no número de folhas com o aumento da troca gasosa em cana-de-açúcar *in vitro*.

O etileno produzido pelas plantas *in vitro* influencia o crescimento e a diferenciação das mesmas, e se acumula no interior dos frascos de cultivo fechados (Matthys *et al.* 1995). É possível que o aumento da troca gasosa tenha reduzido as concentrações de etileno nos frascos de cultivo e favorecido a formação e crescimento das folhas.

Zobayed *et al.* (2002), trabalhando com micropropagação de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes regimes de troca gasosa, relatam que em condições que permitiam maior troca gasosa, as plantas de pinheira produziram significativamente mais folhas. Os autores atribuíram esse aumento no número de folhas, às concentrações reduzidas de etileno no interior dos frascos que permitiam uma maior taxa de troca gasosa.

O tamanho das plantas matrizes no final da fase de multiplicação, variou significativamente, tanto no fator sacarose quanto no fator orifícios na tampa (tabela 9). Já na fase de enraizamento o tamanho das plantas reduziu conforme o aumento da troca gasosa, e a redução da sacarose estimulou o crescimento das plantas (tabela 9). Porém, como já dito anteriormente, a matéria seca da parte aérea foi maior nas plantas com 30 g L⁻¹ de sacarose (tabela 2).

Essa relação entre sacarose, troca gasosa, matéria seca e tamanho das plantas, também foi observado no trabalho de Ermayanti *et al.* (1999), que observaram o desenvolvimento *in vitro* de *Mentha piperita*, em 3 diferentes concentrações de sacarose (0 g L⁻¹; 10 g L⁻¹; 20 g L⁻¹) em potes com alta troca gasosa e baixa troca gasosa (convencional). As plantas de *M. piperita* apresentaram, significativamente maior tamanho no sistema de cultivo em alta troca gasosa e 0 g L⁻¹ de açúcar, porém a matéria seca apresentou até mais de 50% de redução comparados ao sistema de alta troca gasosa e 10 g L⁻¹ de sacarose.

Tanto no trabalho de Ermayanti *et al.* (1999), como neste trabalho a sacarose influenciou o tamanho das plantas, de modo que sua redução ou eliminação no meio de cultura favoreceu o crescimento, porém reduziu a biomassa seca.

Percebe-se na tabela 9, que com o aumento da troca gasosa houve um incremento de biomassa seca e diminuição do tamanho das plantas. Com a redução da sacarose houve um aumento no tamanho das plantas com redução de biomassa seca. O que pode ter ocorrido é que a redução da sacarose no meio tenha estimulado o crescimento das plantas em busca de luz para tentar compensar a redução do açúcar com a fixação do carbono atmosférico, uma vez que a quantidade de energia luminosa neste experimento é considerado baixa (47,6 μmol m⁻² s⁻¹).

O aumento da troca gasosa, na fase de multiplicação, não estimulou o crescimento das plantas, porém na fase de enraizamento o que se observa é o contrário. Os tratamentos T1-0 (30 g L⁻¹ de sacarose e tampa sem orifício) e T1-1 (30 g L⁻¹ de sacarose e tampa com 1 orifício) apresentaram diferenças significativas, onde o aumento da troca gasosa em T1-1 apresentam plantas com mais do dobro de tamanho, matéria fresca e matéria seca (tabela 5).

Sabe-se que o aumento da troca gasosa entre a atmosfera do interior e exterior do frasco, e a redução da umidade, permite incrementar a concentração de

CO₂ nos frascos. (Capellades_queralt *et al.* 1991). Segundo Rodriguez *et al.* (2008), as folhas de cana-de-açúcar provenientes do cultivo *in vitro* são fotossinteticamente competentes e mostram esta atividade durante a fase de aclimatização.

Uma maior troca gasosa, favoreceu significativamente a taxa fotossintética de plantas de cana-de-açúcar *in vitro* (Xiao *et al.* 2003). O aumento da troca gasosa, pode também melhorar o movimento do ar e conseqüentemente a difusão de CO₂ ao redor das plantas, promovendo a fotossíntese, uma vez que com o aumento da troca gasosa há uma redução da umidade relativa que promove a transpiração das plantas.

Nas tabelas 2, 3 e 5, observamos as diferenças no crescimento (biomassa e tamanho) entre os tratamentos T1-0 e T1-1 na fase de multiplicação (onde não houve diferença significativa) e na fase de enraizamento (onde houve diferença significativa entre T1-0 e T1-1). O que pode ter acontecido é uma adaptação às condições de aumento da troca gasosa (uma vez que estas plantas vieram de um cultivo anterior que usava tampas sem orifícios). No final da fase de multiplicação elas ainda estariam se adaptando e então, após mais 14 dias em meio de enraizamento, as plantas já adaptadas apresentaram um grande aumento de biomassa e tamanho devido ao incremento na taxa fotossintética favorecida pelo aumento na troca gasosa.

Com relação à formação de perfilhos (novas plantas a partir da planta matriz), as médias não diferiram significativamente entre os tratamentos do fator orifícios na tampa, nem na fase de multiplicação (tabela 3) nem na fase de enraizamento (tabela 4). Somente com relação ao fator sacarose na fase de enraizamento, existe diferença estatística, e essa diferença mostra que o meio de cultura com 15 g L⁻¹ reduziu o número de perfilhos viáveis.

Contudo, ao observarmos o percentual de enraizamento e a matéria seca da raiz das plantas matrizes (tabela 5) observamos uma diferença significativa entre o tratamento T1-0 e T1-1. Mostrando que o aumento da troca gasosa no frasco favoreceu o enraizamento das plantas matrizes. O aumento do percentual de enraizamento também foi observado no trabalho de Tsay *et al.* (2006), onde plantas de *Scrophularia yoshimurae* cresceram *in vitro* em diferentes condições de troca gasosa. As plantas que cresceram em frascos com tampa de papel que permitia troca gasosa desenvolveram, significativamente, maior número e tamanho de raízes. Em cana-de-açúcar, Xiao *et al.* (2003) observaram que a matéria seca de plantas de cana de açúcar *in vitro*, aumentou significativamente devido ao aumento da troca gasosa entre o interior e o exterior do frasco.

Os perfilhos, assim como as matrizes, apresentaram significativamente maior percentual de enraizamento nos tratamentos que permitiam maior troca gasosa e com concentração de sacarose a 30 g L⁻¹ (tabela 6). Também se observou (dados não revelados) que a média do fator orifícios na tampa foi significativa para biomassa seca da raiz dos perfilhos, de modo que o tratamento com maior troca gasosa (3 orifícios na tampa) apresentou o dobro de biomassa (0,00199).

A mortalidade das plantas matrizes foi significativa (tabela 4) no final da fase de enraizamento, e o aumento da troca gasosa provocou um aumento na mortalidade das plantas matrizes, porém sem afetar o número de perfilhos nesta fase. Essa alta mortalidade pode ter sido devido ao estresse provocado pela redução na sacarose e alta taxa de transpiração das matrizes nos tratamentos com 3 orifícios. Desta forma, somente os perfilhos (os quais já se formaram e desenvolveram nos microambientes utilizados) já estavam adaptados e sobreviveram. Devido a essa alta mortalidade das matrizes na fase de

enraizamento, apenas nos tratamentos T1-0 e T1-1, havia plantas matrizes suficientes para avaliações biométricas na fase de enraizamento.

Efeito da troca gasosa e concentração de sacarose na resposta oxidativa de cana de açúcar *in vitro*.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX), não apresentou diferença significativa entre os tratamentos na fase de multiplicação, com exceção do tratamento com 1 orifício, que mostrou maior atividade em plantas no meio de cultura com 15 g L^{-1} (tabela 8). O fator sacarose influenciou significativamente em ambas as fases de cultivo (tabela 10).

Já na fase de enraizamento, houve diferença estatística com relação ao fator orifícios na tampa (tabela 10). Os dados mostraram que as plantas cultivadas no frasco com tampa com 1 orifício, diferiu estatisticamente dos demais apresentando a menor média de atividade ($459,28 \text{ U.mg}^{-1}$ de proteína). Os frascos com tampa sem orifícios e tampa com 3 orifícios apresentaram atividade média, do fator orifícios na tampa, de $616,25$ e $820,75 \text{ U.mg}^{-1}$ de proteína. É interessante observar que na fase de enraizamento, nos tratamentos com 15 g.L^{-1} de sacarose, a atividade da APX se mostrou significativamente menor nas plantas do frasco com 1 orifício (T2-1).

Se observa resultados semelhantes a APX na atividade das enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT) e polifenoloxidade (PFO) das plantas matrizes (tabelas 10 e 11). Na fase de multiplicação não houve diferença estatística entre os tratamentos com relação ao fator orifícios na tampa. Porém na fase de enraizamento, todas as enzimas mostraram diferenças significativas nos fatores orifícios na tampa e sacarose (tabelas 10 e 11). O que se observa é que os tratamentos com 1 orifício na tampa (T1-1 e T2-1) em todas as enzimas analisadas, apresentou significativamente menores médias de atividade enzimática.

Observando os resultados de mortalidade das plantas no final da fase de enraizamento (tabela 4), verificou-se uma alta mortalidade de plantas no tratamento com 3 orifícios, estes resultado em conjunto com os resultados de atividade enzimática neste tratamento podem indicar que as condições troca gasosa nestes frascos esteja provocando estresse e afetando negativamente o crescimento das plantas nas condições de cultivo deste experimento. Já com relação a sacarose, a redução para 15 g L^{-1} prejudicou a formação de biomassa seca (tabela 9) e provocou aumento na atividade das enzimas (tabelas 10 e 11), também indicando estresse e afetando o crescimento.

De acordo com Cassels e Curry (2001), as condições de alta umidade dentro dos recipientes de cultivo aliada à deficiência da corrente transpiratória dos microbrotos pode provocar hiperhidricidade nos tecidos vegetais. Essa hiperhidricidade está associada com a redução da transpiração e absorção excessiva de água, a qual pode reduzir o nível de oxigênio nos tecidos (Dewir *et al.* 2006), levando as plantas ao estresse em decorrência de condições *in vitro* impróprias (Park *et al.* 2004). Vários trabalhos relatam um aumento na atividade de enzimas antioxidativas em plantas hiperídricas (Balén *et al.*, 2009; Dewir *et al.* 2006; Saher, *et al.* 2005). Portanto, a redução da umidade relativa nos frascos de cultivo pode reduzir a hiperhidricidade (e o estresse oxidativo) como observado no trabalho de Saher *et al.* (2005) com plantas de cravo.

Nas tabelas 7 e 8, observa-se que no meio de cultura com concentração de 15 g.L^{-1} de sacarose, a diferença da atividade enzimática entre os tratamentos na fase de enraizamento (com relação a troca gasosa) fica mais evidente. De modo que

o efeito da troca gasosa é mais acentuado, mostrando diferenças significativas entre os tratamentos. Os tratamentos com 1 orifício e 15 g L⁻¹ apresentaram uma redução na atividade enzimática da fase de multiplicação para enraizamento (com exceção da catalase). Esse comportamento, possivelmente de adaptação ao aumento da troca gasosa, foi verificado no trabalho de Chakrabarty e Datta (2008), com plantas de gérbera.

Os resultados de matéria seca e mortalidade indicam que a remoção da sacarose no meio de cultura deve ser compensada com aumento de luz e/ou outros parâmetros que favoreçam o aumento da fotossíntese *in vitro* e compensem a redução do carboidrato para a nutrição da planta.

Também se observa que o aumento da troca gasosa de 0,0787 ml d⁻¹ (tampa sem orifício) para 0,3446 ml d⁻¹ (tampa com 1 orifício) contribui significativamente na redução do estresse *in vitro* e melhora o desenvolvimento das plantas, contudo as plantas passam por um período de adaptação quando transferidas para um sistema com maior troca gasosa. A menor atividade dessas enzimas, no final da fase de enraizamento, foi nos tratamentos com 1 orifício. A correlação entre os resultados biométricos e enzimáticos sugerem que as enzimas antioxidativas podem ser utilizadas como marcadores de estresse *in vitro* para cana-de-açúcar.

Tabela 1. Combinações de diferentes tipos de tampas e concentrações de sacarose utilizados no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar. F= Orifícios na tampa. S= quantidade de sacarose no meio (g L⁻¹)

TRATAMENTOS								
0F; 30 S	0F; 15 S	0F; 0 S	1F; 30 S	1F; 15 S	1F; 0 S	3F; 30 S	3F; 15 S	3F; 0 S
T1-0	T2-0	T3-0	T1-1	T2-1	T3-1	T1-3	T2-3	T3-3

Tabela 2. Matérias fresca e seca da parte aérea e número de folhas em plantas no final da fase de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre orifícios na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Concentração de sacarose	Variáveis analisadas								
	Matéria fresca da parte aérea (g)			Matéria seca da parte aérea (g)			Número de folhas		
	Orifícios na tampa			Orifícios na tampa			Orifícios na tampa		
	0	1	3	0	1	3	0	1	3
30 g L ⁻¹	0,1642 bA	0,1624 aA	0,1288 aA	0,0178 aB	0,0205 aB	0,0268 aA	2,91 aB	5,25 aA	5,25 aA
15 g L ⁻¹	0,2179 aA	0,1817 aAB	0,1442 aB	0,0169 aA	0,0160 bA	0,0194 bA	3,91 aA	4,08 aA	4,33 aA

Tabela 3. Tamanho e número de perfilhos das plantas matrizes, no final da fase de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre orifícios na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Concentração de sacarose	Variáveis analisadas					
	Tamanho das plantas			Número de perfilhos (fase de multiplicação)		
	Orifícios na tampa			Orifícios na tampa		
	0	1	3	0	1	3
30 g L ⁻¹	6,750 bA	6,475 aAB	5,741 bB	2,50 aA	3,25 aA	4,00 aA
15 g L ⁻¹	8,533 aA	7,166 aB	7,308 aB	3,33 aA	2,66 aA	2,83 aA

Tabela 4. Mortalidade e número de perfilhos das plantas matrizes, no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre orifícios na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Concentração de sacarose	Variáveis analisadas					
	Mortalidade das plantas matrizes			Número de perfilhos(fase de enraizamento)		
	Orifícios na tampa			Orifícios na tampa		
	0	1	3	0	1	3
30 g L⁻¹	8,3% bC	41% bB	83% aA	4,70 aA	5,10 aA	4,30 aA
15 g L⁻¹	83% aA	96% aA	96% aA	3,20 aA	1,90 bA	1,60 bA

Tabela 5. Valores biométricos médios das plantas matrizes (número de folhas, altura, matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), percentual de plantas enraizadas e matéria seca de raiz (MSR)) de cana-de-açúcar após 14 dias em meio de enraizamento, em frascos com 30 g L⁻¹ de sacarose com tampas sem orifício (T1-0) ou com um orifício (T1-1).

Tratamentos	Variáveis analisadas					
	Numero de folhas	Altura das plantas	MFPA	MSPA	% de matrizes enraizadas	MSR
T1-0	3,7 a	8,31 b	0,121 b	0,0137 b	0,181 b	0,00076 b
T1-1	3,42 a	19,85 a	0,280 a	0,0335 a	0,857 a	0,00208 a

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 6. Médias de altura, matéria fresca da parte aérea (MSPA) e percentual de enraizamento dos perfilhos, no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre orifícios na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Concentração de sacarose	Variáveis analisadas								
	Altura (cm) na fase de enraizamento			MSPA na fase de enraizamento (mg)			% de enraizamento		
	Orifícios na tampa			Orifícios na tampa			Orifícios na tampa		
	0	1	3	0	1	3	0	1	3
30 g L⁻¹	5,95 aA	6,49 aA	7,49 aA	0,0090 aA	0,0088 aA	0,0103 aA	48 aB	88 aA	84 aA
15 g L⁻¹	5,64 aA	4,59 bA	5,32 bA	0,0081 aA	0,0055 bA	0,0070 bA	64 aA	32 bB	44 bAB

Tabela 7. Médias da atividade da Polifenoloxidase (PPO) e Catalase (CAT) das plantas matrizes, no final das fases de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre orifícios na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Sacarose	Variáveis analisadas											
	PPO (fase de mult.)			PPO (fase de enr.)			CAT (fase de mult.)			CAT (fase de enr.)		
	Orifícios na tampa			Orifícios na tampa			Orifícios na tampa			Orifícios na tampa		
	0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3
30 g L⁻¹	92,42 aA	91,08 bA	83,93 aA	108,2 7 bA	97,18 aA	98,15 bA	9,19 bA	7,95 aA	6,85 aA	11,86 aA	8,69 aA	10,76 bA
15 g L⁻¹	111,24 aA	124,8 8 aA	92,01 aA	127,6 2 aB	99,78 aC	238,6 1 aA	14,80 aA	9,34 aB	10,08 aAB	15,48 aB	11,56 aB	33,21 aA

Tabela 8. Médias da atividade da peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POD) nas fases de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra (minúsculas entre concentração de sacarose e maiúsculas entre orifícios na tampa), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

		Variáveis analisadas											
sacarose		APX (fase de mult.)			APX (fase de enr.)			POD (fase de mult.)			POD (fase de enr.)		
		Orifícios na tampa			Orifícios na tampa			Orifícios na tampa			Orifícios na tampa		
		0	1	3	0	1	3	0	1	3	0	1	3
		30 g L⁻¹	393,03 aA	379,0 3 bA	406,49 aA	504,1 8 bA	391,9 0 aA	452,0 8 bA	190,84 bA	181,65 aA	165,43 bA	239,60 aA	148,74 bB
15 g L⁻¹	475,24 aA	592,7 5 aA	453,18 aA	728,3 1 aB	526,6 7 aC	1189, 4 aA	240,88 aA	229,63 aA	226,65 aA	278,55 aB	231,96 aB	562,60 aA	

Tabela 9. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), número de folhas, tamanho das plantas no final da fase de multiplicação. E a mortalidade das matrizes no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator sacarose 1= 30gr L⁻¹; 2= 15gr L⁻¹. No fator orifícios na tampa 1= sem orifício; 2= 1 orifício; 3= 3 orifícios

Variáveis analisadas					
MFPA	MSPA	Numero de folhas	Tamanho das plantas	Mortalidade das matrizes	
Fator sacarose					
1	0.15178 b	1	4.47222 a	1	0.44444 b
2	0.18128 a	2	4.11111 a	2	0.94444 a
DMS1 = 0.01868					
Fator Orifícios na tampa					
1	0.19104 a	1	3.41667 b	1	0.45833 b
2	0.17208 a	2	4.66667 a	2	0.70833 a
3	0.13647 b	3	4.79167 a	3	0.91667 a
DMS2=0.02748					

Tabela 10. Comparação entre as médias dos fatores na atividades da Peroxidase do ascorbato (APX) e Peroxidase (POD) no final da fase de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator sacarose 1= 30gr L⁻¹; 2= 15gr L⁻¹. No fator orifícios na tampa 1= sem orifício; 2= 1 orifício; 3= 3 orifícios

Variáveis analisadas			
APX (fase de mult.)	APX (fase de enr.)	POD (fase de mult.)	POD (fase de enr.)
Fator sacarose			
1	392.8989 b	1	179.31000 b
2	507.0567 a	2	232.39000 a
DMS1=66.755			
Fator Orifícios na tampa			
1	434.1367 a	1	215.86500 a
2	485.9583 a	2	205.64170 a
3	429.8383 a	3	196.04330 a
DMS2=100.074			

Tabela 11. Comparação entre as médias dos fatores na atividades da Polifenoloxidase (PFO) e Catalase (CAT) no final da fase de multiplicação e enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator sacarose 1= 30gr L⁻¹; 2= 15gr L⁻¹. No fator orifícios na tampa 1= sem orifício; 2= 1 orifício; 3= 3 orifícios

Variáveis analisadas							
PFO (fase de mult.)		PFO (fase de enr.)		CAT (fase de mult.)		CAT (fase de enr.)	
Fator sacarose		Fator sacarose		Fator sacarose		Fator sacarose	
1	89.14778 b	1	101.20110 b	1	7.99667 b	1	10.44222 b
2	109.38000 a	2	155.33890 a	2	11.40889 a	2	20.08778 a
DMS1= 19.45969		DMS1= 7.08093		DMS1= 2.49457		DMS1= 2.33525	
Fator Orifícios na tampa		Fator Orifícios na tampa		Fator Orifícios na tampa		Fator Orifícios na tampa	
1	101.83170 a	1	117.94500 b	1	11.99833 a	1	13.67667 b
2	107.98670 a	2	98.48167 c	2	8.64500 a	2	10.13167 c
3	87.97334 a	3	168.38330 a	3	8.46500 a	3	21.98667 a
DMS2= 29.17240		DMS2= 10.61516		DMS2= 3.73965		DMS2= 3.50082	

REFERÊNCIAS

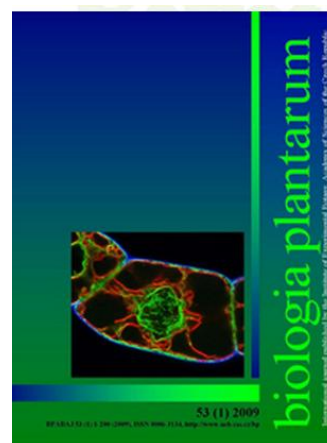
- Berrs, L.S.J., Sizer, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**. 195: 133-140, 1952.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**. 72: 248–254, 1976.
- Capellades-Queralt, M., Beruto, M., Vanderschaeghe, A., Deberg, P. C.. Ornamentals. In: Deberg, P. C.; Zimmerman, R. H. **Micropropagation: Technology and application**. Pp. 215-230. Kluwer Academic Publishers, London - 1991.
- Cassels, A.C., Cury, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 64: 145-157, 2001.
- Chakrabarty, D., Datta, S. K. Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. **Acta physiologiae plantarum**. 30: 325-331, 2008.
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**. 58: 93–99, 2006.
- Ermayanti, M.T., Imelda, M., Tajuddin, T., Kubota, C., Kozai, T. Growth promotion by controlling the in vitro environment in the micropropagation of tropical plant species. In: International Workshop on Conservation and Sustainable Use of Tropical Bioresources, 1998, Tokyo, Anais, 1999, p. 10-25.
- Fatibello-Filho, O., Vieira, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**. 25: 455-464, 2002.
- Fujiwara, K., Kozai, T. Physical microenvironment and its effects. - In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T., Lila-Smith, M. (ed.): Automation and environmental control in plant tissue culture. Pp. 319-367. **Kluwer Academic Press, Dordrecht** - 1995.
- Gaspar T., Franck, T., Bisbis, B, Kevers, C., Jouve, L, Hausman, J.F.; Dommes, J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**. 37: 263-285, 2002
- Hazarika, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**. 85: 1704-1712, 2003.

- Kar, M., Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during pice leaf senescence. **Plant Physiology**. 57: 315-319, 1976.
- Lakshamanan, P., Geijskes, R. J., Aitken, K. S., Grof, C. L. P., Bonnett, G. D., Smith, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 41: 345-363, 2005.
- Langford, P. J., Wainwright, M. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**. 60: 633-640, 1987.
- Lees, R. P., Evans, E. H., Nicholas, J. R. Photosynthesis in clematis, 'The President', during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. **J. Exp. Bot.** 42: 605-610, 1991.
- Mills, D., Yanqing, Z., Benzioni, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**. 40: 396–402, 2004.
- Murashige, T. Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**. 15: 473–497, 1962.
- Park, S. W., Jeon, J. H., Kim, H. S., Park, Y. M., Aswath, C., Joung, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 99: 199-205, 2004.
- Rodriguez, R., Aragon, C. E., Escalona, M., Gonzalez-Olmedo, J., Desjardins, Y. Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugarcane during acclimatization phase. **In vitro Cell Dev. Biol. Plant**. 44: 533-539, 2008.
- 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**. 61:135-142, 2000.
- Matthys D., Gielis, J., Debergh, P. Ethylene. - In: Aitken-Christie, J., Kozai, T., Lila-Smith, M. (ed.): Automation and environmental control in plant tissue culture. Pp.473-491. Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1995.
- Tsay, Hsin-Sheng, Lee, Chen-Yu, Agrawal, D. C., Basker, S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia Yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 42: 445-449, 2006.
- UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Setor sucroenergético – Histórico. 6 – cultivo da cana hoje. Disponível em <<http://www.unica.com.br>>, Acesso em: 20 de fevereiro de 2010.
- Xiao, Y., Kozai, T. *In vitro* multiplication of static plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**. 109: 71-77, 2006.
- Xiao, Y, Lok, Y. H., Kozai, T. Photoautotrophic grow of sugar cane plantlets *in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**. 39: 186–192, 2003.
- Zeraik, A.E., Souza, F.S., Fatibello-Filho, O., Leite, O.D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**. 31: 731-734, 2008.
- Zobayed, S. M. A., Armstrong, J., Armstrong, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**. 69: 155-165, 2002.

CAPÍTULO III

FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS DO MICROAMBIENTE E A RESPOSTA MORFOFISIOLÓGICA DA CANA-DE-AÇUCAR *IN VITRO*

A ser enviado ao periódico **Biologia Plantarum**



Fatores físicos e químicos do microambiente e a resposta morfofisiológica da cana de açúcar *in vitro*.

D. A. da COSTA^{1*}, T. R. CAMARA²

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Biofábrica, Recife, 50740-540 PE, Brazil¹.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife, 52171-900 PE, Brazil²

*costa.deivid@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta antioxidativa da cana de açúcar cultivadas em diferentes regimes de troca gasosa, sacarose e umidade e a influência desses fatores físicos (luz e troca gasosa) e químicos (sacarose) no crescimento e multiplicação da cana-de-açúcar. As plantas foram inoculadas em meio de cultura MS sólido à temperatura de 30 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 horas em 3 diferentes intensidades luminosas ($55,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $100,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $147,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 2 concentrações de sacarose (30 e 15 g L^{-1}) e dois regimes de troca gasosa (0, 11 e $0,59 \text{ ml d}^{-1}$). No final de 16 dias de cultivo em meio de multiplicação e após 16 dias em meio de enraizamento, foram analisados os parâmetros biométricos e atividade das enzimas antioxidativas Peroxidase (POD), Catalase (CAT), Polifenoloxidase (PFO) e Ascorbato Peroxidase (APX).

Os dados biométricos mostraram que o aumento da intensidade luminosa e da troca gasosa promoveu o crescimento da parte aérea, formação de perfilhos e raízes nas plantas de cana-de-açúcar. A análise das atividades enzimáticas mostrou uma redução significativa das médias em todas as enzimas analisadas conforme se promovia maior troca gasosa e aumento de intensidade luminosa. Os melhores resultados de crescimento e redução de atividade das enzimas foram observados nos tratamentos com $100,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz e taxa de evaporação de $0,59 \text{ ml d}^{-1}$. A redução da sacarose de 30 para 15 g L^{-1} , promoveu redução das médias com relação à biomassa da parte aérea e de raiz, tamanho das plantas e número de perfilhos no final da fase de enraizamento. Os resultados sugerem uma redução no estresse oxidativo e melhor desenvolvimento das plantas em condições que promovem maior intensidade luminosa e troca gasosa, quando comparadas com o sistema de cultivo em frascos vedados e com baixa luminosidade.

Palavras chave: intensidade luminosa, troca gasosa, enzimas antioxidativas

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido da Índia, Tailândia e Austrália. No Brasil a cana-de-açúcar ocupa uma área de cerca de 7 milhões de hectares ou 2% de toda a terra arável do País. (Unica 2009). A disponibilidade em larga escala de novas variedades com certificação genética e fitossanitária da cana-semente é viabilizada pela adoção dos sistemas de micropropagação (Lakshamanan *et al.* 2005).

No entanto essa técnica pode levar à formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia anormais devido as condições de crescimento *in vitro*, influenciadas pelas mudanças nos fatores físicos-químicos dos recipientes (Kozai *et al.*, 1997) tais como alta umidade, baixa turbulência do ar, pouca luz e concentração de CO_2 e presença de açúcares no meio de cultura (Batková *et al.*, 2008). Os fatores do microambiente *in vitro* podem provocar estresse oxidativo nos tecidos vegetais. Uma característica comum imposta pelos estresses é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido, oxigênio singleto e radicais hidroxila (Batková *et al.*, 2008). As principais fontes de ROS são o cloroplasto, mitocôndria, peroxissomos e o citossol (Miszalski *et al.* 2007).

As células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos para regular o nível de ROS. As concentrações de ROS podem sofrer alteração, entre outros motivos, pela ação de várias enzimas antioxidantes, que são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (Mittler, 2002).

A produção de ROS e o estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de plantas, tem sido associado com a recalcitrância de plantas em se desenvolver e formar novos tecidos (Tang *et al.* 2004; Obert *et al.* 2005; Batková *et al.*, 2008).

Em estudos com cana-de-açúcar tem se avaliado a atividade de várias enzimas antioxidativas (catalase, superóxido dismutase, peroxidases, glutathione redutase, peroxidase do ascorbato) para se detectar o nível de estresse e adaptação *in vitro*, durante a aclimatização e sob condições de estresse (Aragon *et al.*, 2009; Munir e Aftab, 2011; Fornazier, *et al.*, 2002;).

A redução do estresse *in vitro* e a promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal são fatores importantes na produção de mudas micropropagadas, uma vez que reduzem perdas *in vitro* e durante a aclimatização. Além do mais as ROS podem causar danos ao DNA (Cassels e Cury, 2001) e causar morte celular ou até mesmo variações genéticas.

Entender a resposta oxidativa durante a manipulação dos fatores físicos do microambiente permite promover o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*, produzindo indivíduos com uma morfofisiologia mais próxima das condições *ex-vitro*, reduzindo assim o estresse *in vitro*.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da sacarose, troca gasosa e intensidade luminosa na resposta fisiológica e antioxidativa da cana-de-açúcar.

Materiais e métodos

Plantas de cana-de-açúcar *in vitro*, da variedade RB867515, foram utilizadas neste experimento. As plantas mediam 1,5 cm de comprimento e foram cultivadas em meio de multiplicação, o qual foi composto por: Sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 0,3 mg L⁻¹ de Kinetin, 0,2 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de inositol e gelificado com 8 g L⁻¹ de agar. E em meio de enraizamento, qual era composto por: Sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 1 mg L⁻¹ de ANA, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 g L⁻¹ de inositol e gelificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, por 20 minutos. Cada frasco recebeu 45 ml de meio de cultura. Os frascos com as plantas foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 30 ± 1 °C, com umidade da sala a 50,3% e fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade luminosa de 55,2 ou 100,8 ou 147,9 μmol m⁻² s⁻¹. Foram utilizadas dois diferentes regimes de trocas gasosa (troca de gases entre o interior e exterior dos frascos) calculados conforme Mills *et al.* (2004) e convertidos para ser expressa em mililitros por dia (ml d⁻¹). Os tratamentos consistiam de frascos com tampas sem orifício (0,11 ml d⁻¹) ou com 1 orifício (0,59 ml d⁻¹). Os dois tipos de frascos foram combinados com 2 tipos de concentrações de sacarose (30 g L⁻¹; 15 g L⁻¹) e 3 intensidades luminosas (nível 1 = 55,2 μmol m⁻² s⁻¹; nível 2 = 100,8 μmol m⁻² s⁻¹; nível 3 = 147,9 μmol m⁻² s⁻¹), conforme tabela 1.

Avaliações: Após 16 dias de cultivo em meio de multiplicação e após 16 dias em meio de enraizamento, as plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros

biométricos: matéria fresca e seca da parte aérea e raiz, número de folhas, tamanho das plantas e número de perfilhos. Também avaliou-se a atividade das enzimas antioxidativas: ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO) e catalase (CAT). As plantas matrizes foram analisadas de forma separada dos seus perfilhos para cada parâmetro biométrico e atividade enzimática.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e contaram com 12 tratamentos com 15 repetições por tratamento, gerando um experimento fatorial 3x2x2 (3 níveis de intensidade luminosa; 2 concentrações de sacarose e 2 diferentes regimes de trocas gasosas). As análises estatísticas dos dados foram feitas através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Determinação da atividade das enzimas antioxidativas: O extrato das folhas foi preparado conforme Zeraik *et al.* (2008). A solução sobrenadante foi armazenada em freezer a -20°C e utilizada como fonte para determinação das atividades das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e dos teores de proteína solúvel (Bradford, 1976). A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade de absorvância por minuto.

As análises da atividade da catalase foram realizadas conforme Beer e Sizer (1952), a de peroxidase conforme Fatibello-filho e Vieira (2002), a de ascorbato peroxidase conforme Nakano e Asada (1981) e a determinação da atividade da polifenoloxidase foi realizada conforme Kar e Mishra (1976).

Resultados

Biometria das plantas: No final da fase de multiplicação, a matéria fresca da parte aérea (MFPA) foi significativamente maior nas plantas cultivadas em 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mas sem apresentar diferenças significativas com relação ao fator sacarose. O fator troca gasosa apresentou maior médias nos tratamentos com menor troca gasosa (0,11 ml.d^{-1}), conforme mostra a tabela 2.

A matéria seca da parte aérea (MSPA) apresentou-se maior, para o fator luz, nos tratamentos com 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Com relação ao fator sacarose houve diferença significativa, e as médias do tratamento com 30 g L^{-1} foram superiores. Porém não houve diferença significativa nas médias do fator troca gasosa com relação a MSPA (Tabela 2).

Esses resultados indicam uma tendência de acúmulo de biomassa da parte aérea nas plantas cultivadas em intensidade luminosa de 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 g.L^{-1} de sacarose e 0,11 ml.d^{-1} de troca gasosa, no final da fase de multiplicação.

Já no final da fase de enraizamento o que se observa é um aumento significativo com relação ao peso fresco e seco da parte aérea tanto nas plantas matrizes (tabela 3) como nos perfilhos (tabela 4) a medida em que se aumentava a intensidade luminosa. Os valores de biomassa das plantas matrizes nos tratamentos com alta intensidade luminosa foram quase 2 vezes maiores do que os de baixa luminosidade (tabela 3). Com relação ao fator sacarose, a matéria seca e fresca das plantas matrizes foi significativamente maior nos tratamentos com 30 g L^{-1} . Com relação ao fator troca gasosa, observa-se uma diferença significativa na MFPA e MSPA de modo que a média dos tratamentos com maior troca gasosa apresentou

as maiores médias (0,0665 para MFPA e 0,00937 para MSPA), conforme mostra a tabela 3..

A altura das plantas matrizes e dos perfilhos foram significativamente maior a medida que se elevava a intensidade luminosa (tabelas 2, 3 e 4) apresentando quase o dobro de altura no tratamento de maior intensidade luminosa. O fator troca gasosa apresentou significativamente maior média nos tratamentos com maior troca gasosa, com um incremento de 19% a mais de altura.

Com relação ao número de perfilhos na fase de multiplicação, as plantas matrizes apresentaram maiores médias de perfilhos na condição de média e alta intensidade luminosa (100,8 e 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente), porém não diferindo com relação ao fator sacarose ou troca gasosa (tabela 2). Após a fase de enraizamento, a quantidade de perfilhos continua sendo maior nos tratamentos de intensidade luminosa média e alta, e o fator sacarose mostrou a maior média nos meios de cultura com 30 g L⁻¹ (tabela 3)

A matéria fresca (MFR) e seca (MSR) das raízes apresentaram aumento significativo nos tratamentos de alta intensidade luminosa (tabela 4), chegando a apresentar cerca de 5 vezes mais biomassa nos tratamentos de maior intensidade, comparados com o de menor intensidade. De modo semelhante, o percentual de touceiras enraizadas foi superior no tratamento com maior intensidade luminosa (147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), chegando a 100% de enraizamento. O fator troca gasosa (tabela 4) também influenciou o enraizamento, apresentando as maiores médias nos tratamentos com maior troca gasosa (87,77%).

Atividade enzimática: A atividade enzimática das enzimas peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POD), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO) apresentaram redução conforme o aumento da intensidade luminosa e troca gasosa (Tabela 5). A APX apresentou uma redução de aproximadamente 25% para cada aumento no nível de intensidade luminosa (tabela 5). Já a POD apresentou redução de aproximadamente 50% para cada aumento no nível de luz, resultando em 75% menor atividade específica entre o nível mais baixo e mais alto de luz (tabela 5). A polifenoloxidase, apresentou uma redução de mais de 50% de atividade comparando-se o menor e maior nível de intensidade luminosa (tabela 5). A catalase apresentou diferença estatística, no fator luz, apenas entre o tratamento de maior intensidade e o de média e baixa intensidade, mostrando uma redução significativa de mais de 50% da atividade específica.

Discussão

Vários trabalhos relatam a micropropagação da cana-de-açúcar em intensidades luminosas em torno de 25-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Aragon *et al.* 2009, Lee 1987, Dibax *et al.* 2011).

As plantas utilizadas para montagem deste experimento foram anteriormente cultivadas em uma intensidade em torno de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O aumento repentino da intensidade luminosas nos tratamentos de 100 e 147 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pode ter induzido uma situação de estresse que influenciou no crescimento das plantas durante a fase de multiplicação de modo que as diferenças biométricas foram menores do que as da fase de enraizamento. Essa fase de adaptação das plantas a condição de maior luminosidade e/ou menor umidade foi citada em trabalhos de aclimatização, onde

ocorre uma mudança no ambiente de cultivo das plantas, saindo de uma condição de alta umidade e baixa luminosidade para um ambiente de baixa umidade e alta luminosidade. Na aclimatização de plantas de *Spathiphyllum floribundum* se observa duas fases: um período de adaptação, caracterizado por um crescimento lento da parte aérea e raiz, seguido de um período de rápido crescimento (Van Huylbroeck and De Riek, 1995). Em plantas de pimenta chilena (Estrada-Luna *et al.* 2001) e *Calathea* (Van Huylbroeck *et al.* 1998) observa-se um aumento de do peso seco e fresco após 12 e 20 dias de aclimatização. Durante a aclimatização de cana-de-açúcar Rodríguez *et al.* (2003) relatam que o peso seco e fresco das mudas após 7 dias de aclimatização não diferiu do inicial (0 dia de aclimatização), contudo entre 7 e 14 dias de aclimatização o peso fresco dobrou e o seco quadruplicou. Durante os 14 primeiros dias, os autores consideram um período de aclimatização da fotossíntese para cana-de-açúcar em casa de vegetação.

Nossos resultados mostram que no final da fase de enraizamento, havia transcorrido 32 dias de cultivo em alta intensidade luminosa e maior troca gasosa, de modo que as plantas possivelmente estavam adaptadas e responderiam com maior crescimento. A habilidade fotossintética de plantas *in vitro* não é restringida pelo aparato fotossintético das plantas e sim devido a baixas concentrações de gases, luz e presença de carboidrato no meio de cultura (Kozai *et al.* 1991). Os frascos de cultura fechados criam um ambiente de alta umidade e limitam a entrada de CO₂ e saída de gases produzidos pelas plantas (Pospíšlová *et al.* 1999). A alta umidade no interior dos frascos, baixa luminosidade e presença de açúcares proporciona um cultivo fotomixotrófico das plantas. (Silva, *et al.*, 2005). Trabalhos relatam que o aumento da troca gasosa e intensidade luminosa foi correlacionado com incremento de biomassa em plantas *in vitro* (Xiao *et al.* 2003, Mills *et al.* 2004, Xiao e Kozai 2006). Nos trabalhos de Walker *et al.* (1991) e Xiao *et al.* (2003) plantas de cana-de-açúcar apresentaram aumento de biomassa quando cultivadas em altas intensidades luminosas (acima de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Esse incremento de biomassa foi correlacionado com o aumento da fotossíntese devido a maior intensidade luminosa e promoção da transpiração (pelo aumento da troca gasosa) que permitiu uma maior circulação de ar e difusão de CO₂ ao redor das plantas. Quando comparamos os tratamentos (figura 1) o aumento dos parâmetros biométricos (biomassa aérea e de raiz, altura, número de perfilhos, percentual de enraizamento) nos tratamentos de maior intensidade luminosa e troca gasosa, demonstra a importância do aumento da luz e promoção de maior troca gasosa entre o interior e exterior dos frascos de cultivo, para um maior crescimento e desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar *in vitro*.

Apesar da luz ser fonte de energia para que a planta possa realizar fotossíntese e crescer, o excesso de luz pode levar a fotoinibição (Powles, 1984). De acordo com Osmond (1994), plantas cultivadas em condições de pouca luz são mais susceptíveis a fotoinibição, que as cultivadas em condições de alta luminosidade. Devido às condições de baixa luminosidade, alta umidade e a presença de açúcar no meio de cultura, geralmente as plantas *in vitro* apresentam poucos pigmentos fotossintéticos e baixa taxa fotossintética. Em plantas de *Spathiphyllum* aclimatizadas em 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observou-se fotoinibição devido a fotoxidação da clorofila (Huylbroeck *et al.*, 1995). Plantas de *Alocasia amazônica* micropropagadas em 15 ou 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram melhor crescimento (peso fresco e seco) e conteúdo de clorofila e carotenóides do que as crescidas em 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (Jo, *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostram que, no final da fase de enraizamento, as plantas de cana-de-açúcar cresceram mais sob intensidade luminosa de $147,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a menor atividade enzimática nesses tratamentos são evidências de que não ocorreu fotoinibição.

O aumento da troca gasosa certamente contribuiu para melhor difusão de gases entre o interior e exterior dos frascos, provavelmente permitindo um suprimento mais adequado de CO_2 , e evitando o acúmulo de O_2 e outros gases no interior dos frascos. A importância da troca gasosa entre o interior e exterior dos frascos foi citada no trabalho de Serret, *et al* (2001), o qual relata fotoinibição em plantas crescidas em alta intensidade luminosa *in vitro* ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e atribui esse fato ao fechamento hermético dos frascos de cultivo que faz com que a concentração de CO_2 caia rapidamente. Em plantas de nem (*Azadirachta indica*) cultivadas em frascos com tampas totalmente vedadas e com membranas que permitiam trocas gasosa, Rodrigues *et al.* (2012) observaram que o número de brotos foram maiores nas plantas dos frascos com membranas, e ainda relatam menos clorose e senescência nos frascos com maior troca gasosa.

O que observamos nos nossos resultados é que a promoção de maior troca gasosa favoreceu tanto a biomassa, quanto o enraizamento.

Nos tratamentos que permitiam maior troca gasosa, as enzimas antioxidativas apresentaram redução significativa de sua atividade, bem como observou-se que os tratamentos de maiores trocas gasosas permitiram também um incremento de biomassa no final da fase de enraizamento.

Pode-se correlacionar a redução da atividade enzimática com o incremento de biomassa aérea e de raiz, número de perfilhos e altura das plantas, observando-se os dados das tabelas 2,3,4 e 5. Os tratamentos que apresentaram menor atividade enzimática, também mostraram incremento desses resultados biométricos, indicando que a redução das ROS pode estar relacionada com esse incremento biométrico. A promoção do crescimento e enraizamento de plantas recalcitrantes foi observada a partir da remoção de espécies reativas de oxigênio ROS em tecidos de *Pinus virginiana* (Tang *et al.* 2004) e linho (Obert *et al.* 2005).

A redução na atividade de enzimas antioxidativas (glutathione redutase, guaiacol peroxidase e syringaldazine peroxidase) em frascos que permitem maior troca gasosa também foi observado em plantas de tabaco (Synková e Popíšilova, 2002).

A alta umidade do ar é considerada o fator mais importante na redução da transpiração, troca gasosa de CO_2 e O_2 e acúmulo excessivo de água nos tecidos de plantas micropropagadas (Batková *et al.*, 2008). O acúmulo de água nos tecidos e a saturação da superfície das plantas com água (provocado pela alta umidade dos frascos) pode provocar hipóxia pela baixa difusão de gases, e como consequência gerar estresse oxidativo pela produção de ROS (Jackson, 2003). Em tecidos hiperídricos de alho as atividades da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) foram significativamente maiores (Wu *et al.* 2009).

O estresse *in vitro* pode provocar redução no ganho de biomassa, como observado em plantas de arroz crescidas em meio de cultura contendo 0.35 M de NaCl. Estas plantas apresentaram maior atividade da SOD e menor Biomassa do que as que cresceram em meio sem 0.35 M (Fadzilla *et al.*, 1997).

Fornazier, *et al* (2002) avaliando a resposta ao estresse em cultura de calos de cana-de-açúcar, observaram a atividade da CAT e SOD em calos crescidos em diferentes concentrações de cádmio. Eles relatam que os calos crescidos em

concentrações de 1 mM de cádmio possuíam cerca de metade da biomassa dos tratamentos controle, apresentando uma atividade da catalase 14 vezes maior que o controle. A redução da atividade da CAT em nossos resultados também foi correlacionado com aumento de biomassa.

Há poucos trabalhos publicados avaliando o efeito dos fatores físicos do meio de cultura com a resposta do sistema antioxidativo e correlacionando essa resposta a dados de crescimento vegetal.

No nosso trabalho, a redução da atividade da POD, CAT, APX e PFO nos tratamentos de maior intensidade luminosa e troca gasosa, somado aos melhores resultados biométricos nesses tratamentos, é um indicativo de redução de estresse *in vitro*. Esses resultados mostram a importância do ajuste dos fatores físicos do microambiente *in vitro* de modo a promover uma redução do estresse e/ou melhorar o desenvolvimento *in vitro* da *cana-de-açúcar*.

Tabela 1. Combinações entre diferentes regimes de troca gasosa, concentrações de sacarose e intensidade luminosa utilizados no cultivo *in vitro* da *cana-de-açúcar*.

		Concentração de sacarose (g.l ⁻¹) / troca gasosa (ml.d ⁻¹)			
		30 g.l ⁻¹ / 0,11 ml.d ⁻¹	30 g.l ⁻¹ / 0,59 ml.d ⁻¹	15 g.l ⁻¹ / 0,11 ml.d ⁻¹	15 g.l ⁻¹ / 0,59 ml.d ⁻¹
Intensidade e luminosa (μmol m ⁻² s ⁻¹)	55,2	T1	T2	T3	T4
	100,8	T5	T6	T7	T8
	147,9	T9	T10	T11	T12

Tabela 2. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, altura, número de folhas e número de perfilhos das plantas matrizes no final da fase de multiplicação. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator luz 1= 55,2 μmol m⁻² s⁻¹; 2 = 100,8 μmol m⁻² s⁻¹; 3 = 147,9 μmol m⁻² s⁻¹. No fator sacarose 1= 30g L⁻¹; 2= 15 g L⁻¹. No fator troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹.

Variáveis analisadas				
MFPA	MSPA	Altura	Numero de folhas	Número de perfilhos
Médias do fator Luz	Médias do fator Luz	Médias do fator Luz	Médias do fator Luz	Médias do fator Luz
1 0.05875 a	1 0.00579 a	1 3.56923 b	1 4.55769 a	1 3.44231 b
2 0.04417 b	2 0.00405 b	2 3.59615 b	2 3.76923 b	2 4.94231 a
3 0.05035 b	3 0.00506 a	3 4.14423 a	3 3.92308 b	3 4.36539 a
DMS1 = 0.00620	DMS1 = 0.00091	DMS1 = 0.33225	DMS1 = 0.43569	DMS1 = 0.64879
Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose
1 0.05024 a	1 0.00534 a	1 3.99487 a	1 4.24359 a	1 4.25641 a
2 0.05193 a	2 0.00460 b	2 3.54487 b	2 3.92308 b	2 4.24359 a
DMS2 = 0.00422	DMS2 = 0.00062	DMS2 = 0.22624	DMS2 = 0.29668	DMS2 = 0.44180
Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa
1 0.05387 a	1 0.00509 a	1 3.53462 b	1 4.23077 a	1 4.34615 a
2 0.04830 b	2 0.00485 a	2 4.00513 a	2 3.93590 a	2 4.15385 a
DMS3 = 0.00422	DMS3 = 0.00062	DMS3 = 0.22624	DMS3 = 0.29668	DMS3 = 0.44180

Tabela 3. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), número de folhas, altura das plantas matrizes e número de perfilhos no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30 g L⁻¹; 2= 15 g L⁻¹. No fator troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹.

Variáveis analisadas				
MFPA	MSPA	Numero de folhas	Altura	Numero de perfilhos
Médias do fator Luz				
1 0.03978 b	1 0.00591 c	1 4.80000 a	1 4.33000 c	1 6.94445 b
2 0.06778 a	2 0.00913 b	2 4.75000 a	2 6.20750 b	2 9.19445 a
3 0.07520 a	3 0.01125 a	3 3.67500 b	3 8.16750 a	3 9.41667 a
DMS1 = 0.01103				
Médias do fator sacarose				
1 0.07135 a	1 0.01114 a	1 4.33333 a	1 7.01000 a	1 9.51852 a
2 0.05049 b	2 0.00639 b	2 4.48333 a	2 5.46000 b	2 7.51852 b
DMS2 = 0.00751				
Médias do fator troca gasosa				
1 0.05534 b	1 0.00816 b	1 4.60000 a	1 5.56667 b	1 8.37037 a
2 0.06650 a	2 0.00937 a	2 4.21667 a	2 6.90333 a	2 8.66667 a
DMS3 = 0.00751				

Tabela 4. Comparação entre as médias das análises de matéria fresca (MFR) e seca (MSR) das raízes das plantas da touceira, percentual de touceiras enraizadas, matéria seca (MSPA) da parte aérea dos perfilhos e altura dos perfilhos no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30 g L⁻¹; 2= 15 g L⁻¹. No fator troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹.

Variáveis analisadas				
MFR	MSR	% touceiras enraizadas	MSPA dos perfilhos	Altura dos perfilhos
Médias do fator Luz				
1 0.00277 b	1 0.00056 b	1 0.78333 b	1 0.00406 c	1 4.78500 c
2 0.00460 b	2 0.00111 b	2 0.63333 b	2 0.00509 b	2 5.37144 b
3 0.01383 a	3 0.00256 a	3 1.00000 a	3 0.00665 a	3 6.36888 a
DMS1 = 0.00224				
Médias do fator sacarose				
1 0.00555 b	1 0.00220 a	1 0.76667 a	1 0.00639 a	1 6.68642 a
2 0.00858 a	2 0.00062 b	2 0.84444 a	2 0.00414 b	2 4.33046 b
DMS2 = 0.00152				
Médias do fator troca gasosa				
1 0.00938 a	1 0.00144 a	1 0.73333 b	1 0.00533 a	1 5.23058 b
2 0.00475 b	2 0.00138 a	2 0.87778 a	2 0.00520 a	2 5.78629 a
DMS3 = 0.00152				

Tabela 5. Comparação entre as médias dos fatores na atividades da Peroxidase do ascorbato (APX), Peroxidase (POD), Catalase (CAT) e Polifenoloxidase (PFO) no final da fase de enraizamento. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 No fator luz 1= 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 = 100,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 = 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No fator sacarose 1= 30 g L⁻¹; 2= 15 g L⁻¹. No fator troca gasosa 1= 0,11 ml d⁻¹; 2= 0,59 ml d⁻¹.

Variáveis analisadas			
APX	POD	CAT	PFO
Médias do fator Luz	Médias do fator Luz	Médias do fator Luz	Médias do fator Luz
1 590.84060 a	1 225.76450 a	1 14.71789 a	1 274.72730 a
2 444.44470 b	2 98.82565 b	2 12.59099 a	2 205.14870 b
3 286.15730 c	3 54.78417 c	3 5.11506 b	3 104.86370 c
DMS1 = 80.63448	DMS1 = 15.14222	DMS1 = 2.46664	DMS1 = 32.19199
Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose	Médias do fator sacarose
1 447.81710 a	1 122.19570 a	1 11.49044 a	1 197.37110 a
2 433.14470 a	2 130.72050 a	2 10.12551 a	2 192.45540 a
DMS2 = 54.71653	DMS2 = 10.27513	DMS2 = 1.67380	DMS2 = 21.84467
Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa	Médias do fator troca gasosa
1 495.50490 a	1 163.73570 a	1 12.52039 a	1 213.81610 a
2 385.45680 b	2 89.18053 b	2 9.09557 b	2 176.01050 b
DMS3 = 54.71653	DMS3 = 10.27513	DMS3 = 1.67380	DMS3 = 21.84467



Figura 1. Comparação entre as touceiras no final da fase de multiplicação. T1 = tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,11 ml d⁻¹ de troca gasosa e 55,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. T10 = tratamento com 15 g L⁻¹ de sacarose, 0,59 ml d⁻¹ de troca gasosa e 147,9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

REFERÊNCIAS

- Aragon, C, Luísa, C. C., González, J. Escalona, M., Amâncio, S. Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) Propagated in Headspace Renovating Systems Shows Autotrophic Characteristics and Develops Improved Anti-oxidative Response. - *Tropical Plant Biol.* 2:38-50, 2009.
- Batková, J., Pospíšilová, J., Synková, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. - *Biologia Plantarum.* 3:413-422, 2008.
- Berris, L.S.J., Sizer, I.W. A espectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. - *Journal of Biological Chemistry.* 195: 133-140, 1952.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. - *Anal Biochem.* 72: 248–254, 1976.
- Bor, M., Ozdemir, F., Turkan, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. - *Plant Science.* 164: 77–84, 2003.
- Cassels, A. C., Cury, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 64:145-157, 2001.
- Dibax, R., Alcântara, G. B., Filho, J. C. B., Machado, M. P., Oliveira, Y., Silva, A. L. Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. - *Journal of Biotechnology and Biodiversity.* 2:32-37, 2011.
- Estrada-Luna, A. A., Davies, F. T., Jr., Egilla, J. N. Physiological change and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post acclimatization. - *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 66:17–24; 2001.
- Fadzilla, N. M., Robert, F. P., Burdon, R. H. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. - *Journal of Experimental Botany.* 48:325-331, 1997.
- Fatibello-Filho, O., Vieira, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. - *Química Nova.* 25: 455-464, 2002.
- Fornazier, R. f., Ferreira, R. R., Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Smith, R. J., Lea, P. J., Azevedo, R. A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant Enzymes. - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 71: 125–131, 2002.
- Huylenbroeck, J. M. V., Huygens, H., Debergh, P. C. Photoinhibition during acclimatization of micropropagates *spathiphyllum* “petite” plantlets. - *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 31:160-164, 1995.
- Jackson, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. - *Bulg. J. Plant. Physiol., Special issue:* 96-109, 2003.
- Jo, Eun-A, Tewari, R. K., Hahn, Eun-Joo, Paek, Kee-Yoeup. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. - *Plant Biotechnol Rep.* 2:207–212, 2008.
- Joyce, S. M., Cassels, A. C., Jain, S. M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant cell, Tissue and Organ Culture.* 74: 103-121, 2003.
- Kar, M., Mishra, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during pice leaf senescence. *Plant Physiology.* 57: 315-319, 1976.
- Kozai, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions.- In: Deberg P.C.; Zimmerman, R. H.; (eds): *Micropropagation, Technology and Application.* Pp. 449-47. 1Kluwer. Academic Publishers, Dordrecht, 1991.
- Lakshamanan, P., Geijskes, R. J., Aitken, K. S., Grof, C. L. P., Bonnett, G. D., Smith, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 41: 345-363, 2005.
- Lee, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 10: 47-55, 1987.

- Mills, D., Yanqing, Z., Benzioni, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* 40: 396–402, 2004.
- Mitter, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. - *Trends in Plant Science.* 7:405-410, 2002.
- Miszalski, Z., Kornas, A., Gawronska, K., Ślesak, I., Niewiadomska, E., Kruk, J., Christian, A.L., Fischer-Schliebs, E., Krisch, R., Lüttge, U.: Superoxide dismutase activity in C3 and C3/CAM intermediate species. - *Biol. Plant.* 51: 86-92, 2007.
- Munir, N., Aftab, F. Enhancement of salt tolerance in sugarcane by ascorbic acid pretreatment. - *African Journal of Biotechnology* Vol. 10:18362-18370, 2011.
- Murashige, T. Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473–497, 1962.
- Obert, B., Benson, E.E., Millam, S., Preťová, A., Bremner, D.H.: Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. - *J. Plant Physiol.* 162: 537-547, 2005.
- Osmond, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowter JR (eds) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field.* - BIOS Scientific Oxford, pp.1–24, 1994.
- Rodrigues, M., Costa, T. H. F., Festucci-Buselli, R. A., Silva, L. C., Otoni, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). - *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 48: 67-72, 2012.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., Plzáková, S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. - *Biologia Plantarum.* 4:481-497, 1999.
- Powles, S.B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. - *Annu Rev Plant Physiol* 35:15–44, 1984.
- 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.* 39:245-255, 2001.
- Silva, J. A. T. da, Nagae, S., Tanaka, M. Effect of physical factors on micropropagation of *Anthurium andreaeanum*. - *Plant Tissue Culture.* 1:1-6, 2005.
- Synková, H, Pospíšilová, J. *In vitro* precultivation of tobacco affects the response of antioxidative enzymes to ex vitro acclimation. - *J. Plant Physiol.* 159: 781–789, 2002.
- Tang, W., Harris, L.C., Outhavong, V., Newton, R.J.: Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) - *Plant Cell Rep.* 22: 871-877, 2004.
- UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Setor sucroenergético – Histórico. 6 – cultivo da cana hoje. Disponível em <<http://www.unica.com.br>>, Acesso em: 10 de dezembro de 2011.
- 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 Sci.* 134:21–30; 1998.
- Van Huylenbroeck, J.M., De Riek, J.: Sugar and starch metabolism during ex vitro rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. - *Plant Sci.* 111: 19-25, 1995.
- Zeraik, A.E., Souza, F.S., Fatibello-Filho, O., Leite, O.D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. - *Química Nova.* 31: 731-734, 2008.

ANEXOS

NORMAS DO PERIÓDICO

Notice to contributors

BIOLOGIA PLANTARUM is an international journal for experimental botany. It publishes original scientific papers and brief communications, reviews on specialized topics, and book reviews in plant physiology, biochemistry, physiological anatomy, ecophysiology, genetics, molecular biology and pathophysiology. Only papers presenting generally valid findings are usually accepted. Papers should not be published or under consideration for publication elsewhere.

The manuscripts in English should be prepared in electronic version (text in MS Word for Windows, figures and photographs as JPG or TIF files). The authors are strongly recommended to get their papers checked by a native English speaker to avoid language inaccuracies. The manuscripts have to be submitted on-line (new submission on [new submission](#)). Other correspondence should be sent to editorial office by e-mail: biol.plant@ueb.cas.cz. Please, do not forget to use manuscript number.

Every manuscript is reviewed by at least two reviewers familiar with the relevant field of research, being from a different country or at least from different institution from the author (one of them can be associate editor).

When accepted and at the date of issuing, the corresponding author receives a PDF file with a final version of the paper free of charge.

FOLLOWING SECTIONS:

[\[Original papers\]](#)

[\[Brief communications\]](#)

[\[Review articles\]](#)

[\[Book reviews\]](#)

[\[Announcements\]](#)

[\[SI units and symbols\]](#)

[\[Examples of figure design\]](#)

[\[Most common abbreviations\]](#)

ORIGINAL PAPERS

The length of a paper including figures, tables and references should not exceed 12 pages (final size in the journal). The paper should be arranged as follows:

- title
- names and addresses of the author(s)
- abstract with additional key words
- abbreviations
- acknowledgements
- introduction
- materials and methods
- results
- discussion
- references
- tables with a heading
- figure legends.

The results and discussion might be joined together. Units, dimensions, terms, symbols, abbreviations, *etc.*, recommended by the *Système International d'Unités* (SI) (see the section [SI units and symbols](#)) should be used.

Line drawings should be surrounded by a frame which forms their axes. Grid marks should point inwards. As far as possible, different curves should be individually labelled. Alongside the scale of the ordinate and abscissa the quantity measured should be given, followed by appropriate dimension in SI units in brackets, *e.g.*: TRANSPIRATION RATE [mg(H₂O) m⁻² s⁻¹] (see the [Examples of figure design](#)).

Photographs must be of the press quality with a full range of tones and of good contrast. Colour photographs are printed on authors' expenses (*ca.* 120 EUR per page).

References in the text should contain the authors' names followed by the year of publication, *e.g.* Amesz (1989) or (Lüttge *et al.* 1989, Herbert and Nilson 1991). References at the end of the paper should be arranged alphabetically (by authors' names) (for abbreviations of journal titles see the section [Most common abbreviations](#)):

Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C.: Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. - Biol. Plant. **44**: 41–46, 2001.

Tausz, M.: The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. - In: Grill, D., Tausz, M., De Kok, L.J. (ed.): Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment. Pp. 101–122. Kluwer Academic Press, Dordrecht - Boston - London 2001.

Koch, G.W., Mooney, A.A. (ed.): Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems. - Academic Press, San Diego - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto 1996.

Gribova, Z.P., Antonovskii, V.L.: [Ultraviolet radiation effect on paramagnetic centres of plant leaves and chloroplasts.] - Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 1991(1): 51–58, 1991. [In Russ.]

Titles of articles written in languages other than English are given only in English translation (see the above example). However, book titles should be given also in the original language.

Additional key words (10 or less) best characterizing the contents of article and not contained in its title follow the abstract. The list of abbreviations in alphabetical order is also necessary.

The length of a paper including figures, tables and references should not exceed 12 pages (final size in the journal). The paper should be arranged as follows: title, names and addresses of the author(s), abstract with additional key words, abbreviations, acknowledgements, introduction, materials and methods, results, discussion, references, tables with headings and figure legends. The results and discussion might be joined together. Units, dimensions, terms, symbols, abbreviations, *etc.*, recommended by the *Système International d'Unités* (SI) (see the section [SI units and symbols](#)) should be used.

First page

Title fittingly describes the paper and it is as brief as possible. It is written in lower case letters. Names of authors are in capitals (*e.g.* J. MARAS¹, K.G. XUE² and W.-C. CHEN^{1*}). Addresses are in italics and followed by respective numbers.

Abstract briefly describes the aim and all important results. Please, avoid of discussion and speculations.

Additional key words (10 or less) best characterizing the contents of article and not contained in its title follow the abstract. They are usually used in the Subject Index. The list of abbreviations in alphabetical order is also necessary. After that, the acknowledgements can be presented. Finally, corresponding author (marked by an asterisk) should be indicated together with his/her fax and e-mail.

Introduction

The introduction should be a qualified short review of the problem referencing most relevant papers on the subject. The goal of the paper should be outlined. After the first use of a term with its abbreviation [*e.g.* net photosynthetic rate (P_N)] use only the abbreviation (P_N) in the following text.

Materials and methods

A detailed and correct description of experimental conditions is a prerequisite of reliable and reproducible results.

The names of plants should be given in full when appearing for the first time in the manuscript (*e.g.* *Picea abies* [L.] Karst., *Hordeum vulgare* L. cv. Dvoran) and in a shorter version in the following text (*e.g.* *P. abies*).

The conditions of plant growth in nature, greenhouse or growth chamber should be described in detail. The ontogenetic stage of the plant should be also mentioned.

When presenting instruments or specific materials (chemicals) usually 4 parameters should be given: type, producer, town, state (*e.g.* *Portable Photosynthesis System LI-6400, LI-COR.*, Lincoln, NE, USA).

Statistical treatment should be described in detail. More than 3 replicates are quite necessary for a reliable statistical treatment and hence at least 5 replicates are recommended. Usually means and SD (standard deviation) or SE (standard error) are evaluated. If statistical tests are performed, name of the tests and description of the software used must be given. In case of a series of experiments, a note on reproducibility of the trends or dependences should be given.

Results

All results obtained should be clearly described and logically arranged. References to respective tables or figures should be in brackets after statement *e.g.* (Table 1) or (Fig. 3A). Use subheadings only when the text is too long and complicated. Avoid of discussion in Results when the both parts are not joined together.

Discussion

Reasonable compromise between length and depth of discussion has to be found to prevent futile words or mere speculations. However, appropriate comparisons of results obtained with those found previously should be presented. Also if some unusual results appeared, they should be explained. Stimulating and well based hypotheses also may be incorporated.

References

References in the text should contain the authors' names followed by the year of publication, *e.g.* Amesz (1989) or (Lüttge *et al.* 1989, Herbert and Nilson 1991). References at the end of the paper should be arranged alphabetically (by the first authors' name) and edited as exemplified below (for abbreviations of journal titles see the section Most common abbreviations):

Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C.: Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. - Biol. Plant. 44: 41-46, 2001.

Tausz, M.: The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. - In: Grill, D., Tausz, M., De Kok, L.J. (ed.): Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment. Pp. 101-122. Kluwer Academic Press, Dordrecht - Boston - London 2001.

Koch, G.W., Mooney, A.A. (ed.): Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems. - Academic Press, San Diego - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto 1996.

Gribova, Z.P., Antonovskii, V.L.: [Ultraviolet radiation effect on paramagnetic centres of plant leaves and chloroplasts.] - Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol. 1991(1): 51-58, 1991. [In Russ.]

Titles of articles written in languages other than English are given only in English translation (see the above example). However, book titles should be given also in the original language.

Tables and figures

The legends to Tables and Figures should be self-explanatory without reference to a text. Meaning of the points or curves in the graphs (*e.g.* means) and statistical bars (*e.g.* SD or SE) should be shown together with the number of replicates (*e.g.* $n = 10$).

A single table should not exceed one printed page and it is written as real MS Word table.

Line drawings should be surrounded by a frame formed by their axes. Grid marks (ticks) should point inwards. As far as possible, different curves should be individually labelled. Alongside the scale of the ordinate and abscissa the quantity measured should be given, followed by appropriate dimension in SI units in brackets, *e.g.*: **TRANSPIRATION RATE** [mg(H₂O) m⁻² s⁻¹] (see the Examples of figure design). The lettering should be in capitals, in Arial or a similar sans-serif type. Lettering for labels and inside legends should be of a consistent size. The same holds for all figures in the same paper. If possible, figures should be combined together and signed as A, B, C, *etc.*

Photographs must be of the press quality with a full range of tones and of good contrast. All photographs are usually arranged on one or two plates and marked by A, B, C, *etc.*, similarly as line drawings. Colour photographs are printed on authors' expenses (*ca.* 150 EUR per page). Use the resolution of 200 dpi for gray scale and colour photographs and 600 dpi for line drawings.

Please, check your figure style with recent issue of the journal and try to print all figures to be sure that they are really of printing quality.

BRIEF COMMUNICATIONS

Papers not longer than 4 - 5 pages (final size in the journal) including abstract, text, references, one table and one figure, or two figures, or two tables are usually published more rapidly than the longer papers.

REVIEW ARTICLES

Short but comprehensive reviews with full bibliography are accepted after preliminary discussion of the intended topics with the editors. Reviews should not exceed 14 pages (final size).

BOOK REVIEWS

Reviews of new books up to 1 page (final size in the journal) dealing with experimental botany or related fields, sent to the Editor, are published as soon as possible.

ANNOUNCEMENTS

The journal can publish announcements of conferences, symposia, *etc.* in the respective fields on the organizers' expense. A limited number of advertisements on the products used in plant experimental research can also be published on the commercial base.